

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

TESE DE DOUTORADO

MARÍLIA BARBOSA DO NASCIMENTO

**Mapeamento de motivos antigênicos e caracterização de
novas proteínas de *Leishmania infantum* com potencial
para uso no diagnóstico contra a Leishmaniose Visceral.**

Recife

2014

MARÍLIA BARBOSA DO NASCIMENTO

Mapeamento de motivos antigênicos e caracterização de novas proteínas de *Leishmania infantum* com potencial para uso no diagnóstico contra a Leishmaniose Visceral.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientador: Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Recife

2014

Catálogo na Fonte:
Elaine Cristina Barroso
CRB 1728

Nascimento, Marília Barbosa do

Mapeamento de motivos antigênicos e caracterização de novas proteínas de *Leishmania infantum* com potencial para uso no diagnóstico contra a Leishmaniose Visceral/ Marília Barbosa do Nascimento. – Recife: O Autor, 2014.

137 f.: il., fig., tab.

Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Genética, 2014.

Inclui bibliografia

1. Leishmaniose Visceral 2. Proteínas 3. Leishmania I. Melo Neto, Osvaldo Pompílio (orientador) II. Título

616.9364

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-138

MARÍLIA BARBOSA DO NASCIMENTO

Mapeamento de motivos antigênicos e caracterização de novas proteínas de *Leishmania infantum* com potencial para uso no diagnóstico contra a Leishmaniose Visceral.

Aprovado em 21/02/2014

Banca Examinadora:

Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM

Dr. Antônio Mauro Rezende
Departamento de Genética – UFPE

Dr^a Valéria Rêgo Alves Pereira
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM

Dr^a Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM

Dr. Rafael Dhália
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM

Recife

2014

Dedico esta Tese aos meus pais, João Victor do Nascimento Filho e Maria da Guia Barbosa, que sempre acreditaram em mim e fizeram de tudo para me incentivar e educar. E ao meu marido Ronaldo Nunes Porto, por todo incentivo.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Dr. Osvaldo, pela confiança em mim depositada e pela orientação sempre prestadas e ao meu co-orientador, Dr. Franklin Magalhães, pela amizade, incentivo e todos os conhecimentos que me foram passados;

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães pela infra-estrutura e disponibilidade de recursos e os órgãos de fomento (FIOCRUZ e FACEPE), pela bolsa e pelo apoio financeiro para a realização dos experimentos;

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz, pela ajuda e materiais cedidos para a realização dos experimentos;

Aos colegas dos laboratórios de Imunologia, Entomologia e Lavite pela paciência e pela ajuda nunca recusadas;

Aos meus colegas do laboratório da Microbiologia (Christian, Dani, Franklin, Janaína, Mari Marques, Rodrigo Pontes, Tamara, Maria, Rômulo, João, Ludmila, Wagner, Artur, Camila, Diego, Kleison) e funcionários, pelo convívio diário, pelas risadas e conhecimentos trocados, dos quais nunca esquecerei;

Aos meus amigos de bancada, Rodrigo e Janaína, pelas alegrias e tristezas divididas durante os experimentos por todos esses anos;

Ao meu grupo da turma de Biomedicina 2007.1 (Ana, Fábiana, Mi, Naty, Rodrigo e Susu), pela amizade, pelos conhecimentos compartilhados e pelas alegrias que foram muitas e ainda serão;

A Deus, principalmente por permitir que eu conquistasse todas as realizações que obtive até hoje em minha vida, e por me dar forças e saúde para realizá-las.

Aos meus pais por sempre terem acreditado em mim e me incentivado. À minha família, por sempre me apoiar em minhas decisões. Ao meu marido, pelas alegrias e incentivos constantes, pelo amor, amizade e suporte presentes em todos os momentos bons ou ruins.

Obrigada a todos, pois sem vocês a construção desta tese, e mais ainda, da minha vida, não seria possível.

Resumo

A Leishmaniose Visceral (LV) é a forma mais grave da doença causada por patógenos do gênero *Leishmania*, problema agravado pela falta de métodos eficientes de diagnóstico. Este trabalho buscou contribuir para a caracterização funcional de cinco proteínas hipotéticas de *L. infantum*, identificadas previamente como potenciais ferramentas para o diagnóstico da LV. As proteínas selecionadas (Lci5, Lci9, Lci11, Lci10 e Lci12), são em sua maioria ricas em motivos repetitivos e foram analisadas por bioinformática e em ensaios de “western-blot”, fracionamento celular, imunofluorescência e imunocitoquímica associada à microscopia eletrônica. Todas as proteínas são expressas constitutivamente em ambas as formas de *L. infantum*, uma delas (Lci10) é exclusiva das espécies de *Leishmania* e as demais são pouco ou moderadamente conservadas em *Trypanosoma*. Três destas apresentaram um padrão pontual de localização intracitoplasmático (Lci10 e Lci12) ou flagelar (Lci5), enquanto as Lci9 e Lci11 se dispersam por todo o citoplasma. Através de ensaios de ELISA indireto, utilizando soros de cães e humanos com LV, todas, com exceção da Lci5, foram mais antigênicas em cães do que em humanos. Quando se buscou investigar a importância dos motivos repetitivos para a antigenicidade das Lci10 e Lci12, não se observou uma correlação entre a sua presença e maior ou menor antigenicidade. Os resultados sugerem que estas proteínas devem ser utilizadas diferentemente para cães e humanos no diagnóstico da LV.

Palavras-chave: motivos repetitivos; antigenicidade; caracterização; *Leishmania*

Abstract

The Visceral Leishmaniasis (VL) is the most severe form of the disease caused by pathogens of the genus *Leishmania*, a medical problem compounded by lack of efficient diagnostic methods. This study aimed to contribute to the functional characterization of five hypothetical proteins from *L. infantum*, previously identified as potential tools for the diagnosis of VL. The selected proteins (Lci5, Lci9, Lci11, Lci10 and Lci12) are mostly rich in repetitive motifs and were analyzed by bioinformatics as well as “western-blot” assays, cell fractionation, immunofluorescence and immunocytochemistry associated with electron microscopy. All proteins are constitutively expressed in both forms of *L. infantum*, one (Lci10) is unique to *Leishmania* species and the others are slightly or moderately conserved in *Trypanosoma*. Three of these proteins displayed a punctual pattern of cytoplasmic (Lci10 and Lci12) or flagellar (Lci5) localization, whilst Lci9 and Lci11 were dispersed throughout the cytoplasm. Through indirect ELISA assays, using sera from dogs and humans with LV and with the exception of, all proteins were more antigenic in dogs than in humans. When we sought to investigate the importance of repetitive motifs for the antigenicity of Lci10 and Lci12, no correlation between their presence and greater or lesser antigenicity was observed. The results generated suggest that these proteins should be used differentially for the diagnosis of VL from dogs and humans.

Keywords : repetitive motifs , antigenicity ; characterization; *Leishmania*

Lista de Ilustrações

Figura1: Cerâmica pré – colombianas indicando lesões causadoras de deformações em caso de Leishmaniose.	4
Figura2: Classificação de espécies representativas de <i>Leishmania</i> sp. nos seus três subgêneros.....	7
Figura3: Formas evolutivas de <i>Leishmania</i> sp.	10
Figura4: Ultraestrutura do flagelo dos tripanossomatídeos.	12
Figura5: Flebotomíneos (<i>Lutzomia</i> sp. (a) E <i>Phlebotomus</i> sp.(b) se alimentando em um homem.	13
Figura6: Ciclo biológico do parasito no inseto vetor.	15
Figura7: Ciclo biológico geral de <i>Leishmania</i> sp.	16
Figura8: Crianças com Leishmaniose Visceral apresentando hepatoesplenomegalia.	21
Figura9: Mapas ilustrando a distribuição geográfica das Leishmanioses Cutânea (A) e Visceral (B).	27
Figura10: Distribuição da Leishmaniose Visceral no Brasil por municípios (2009).	29
Figura11: Microscopia identificando a presença de parasitos.	37
Figura12: Esquema parcial do gene Lci5 e fragmentos recombinantes obtidos.	61
Figura13: Alinhamento da proteína Lci5-A de <i>L. infantum</i> com seus prováveis ortólogos na família Trypanossomatidae:.....	62
Figura14: Localização subcelular da proteína Lci5 em <i>L. infantum</i>	63
Figura15: Localização subcelular por imunocitoquímica em microscopia eletrônica da proteína Lci5 de <i>L. infantum</i>	64
Figura16: ELISA indireto das proteínas Lci5-A e Lci5-B com soros caninos com LV:.....	65
Figura17: ELISA indireto para as proteínas Lci5-A e Lci5-B com soros humanos com LV:	66
Figura18: ELISA indireto da proteína Lci5-A com soros humanos:	67
Figura19: Esquema do gene Lci9 e fragmentos recombinantes obtidos.	68
Figura20: Alinhamento da proteína Lci9-A de <i>L. infantum</i> com seus prováveis ortólogos na família Trypanossomatidae:.....	70

Figura21: Análise da expressão da proteína Lci9 ao longo do ciclo de vida de <i>L. infantum</i> .	70
Figura22: Comparação da expressão da proteína Lci9 na família Trypanosomatidae:	71
Figura23: Localização celular da proteína Lci9 em <i>L. infantum</i> :	72
Figura24: Localização subcelular da proteína Lci9 após fracionamento por ciclos de congelamento/descongelamento:	73
Figura25: Localização subcelular da proteína Lci9 após fracionamento por gradiente de digitonina:	73
Figura26: Localização subcelular por imunocitoquímica da proteína Lci9 em <i>L. infantum</i> :	74
Figura27: ELISA indireto das proteínas Lci9-A e Lci9-B com soros caninos com LV:	75
Figura28: ELISA indireto das proteínas Lci9-A e Lci9-B com soros humanos com LV:	76
Figura29: ELISA indireto da proteína Lci9-A com soros humanos:	77
Figura30: Esquema do gene Lci10 e fragmentos recombinantes obtidos.	78
Figura31: Análise da expressão da proteína Lci10 ao longo do ciclo de vida de <i>L. infantum</i> .	79
Figura32: Comparação da expressão da proteína Lci10 na família Trypanosomatidae:	79
Figura33: Alinhamento da sequência proteica Lci10-A de <i>L. infantum</i> com seus ortólogos no gênero <i>Leishmania</i> .	80
Figura34: Detecção de modificação do tipo fosforilação na proteína Lci10:	81
Figura36: Localização subcelular da proteína Lci10 após fracionamento por ciclos de congelamento/descongelamento:	82
Figura37: Localização subcelular da proteína Lci10 após fracionamento em gradiente de digitonina:	83
Figura38: ELISA indireto das proteínas Lci10-A e Lci10-B com soros caninos:	84
Figura39: ELISA indireto das proteínas Lci10-A e Lci10-B com soros humanos:	85
Figura40: ELISA indireto da proteína Lci10-A com soros humanos:	86
Figura41: Esquema da sequência do inserto Lci11:	87
Figura42: Alinhamento da proteína Lci11 de <i>L. infantum</i> e seus prováveis ortólogos na família Trypanosomatidae:	88

Figura43: Análise da expressão da proteína Lci11 ao longo do ciclo de vida de <i>L. infantum</i>	89
Figura44: Comparação da expressão da proteína Lci11 na família Trypanosomatidae.....	89
Figura45: Localização celular da proteína Lci11 em <i>L. infantum</i> :.....	90
Figura46: Localização subcelular da proteína Lci11 após fracionamento por ciclos de congelamento/descongelamento:.....	91
Figura47: Localização subcelular da proteína Lci11 após fracionamento com gradiente de digitonina.	91
Figura48: Gráfico do ELISA indireto para a proteína Lci11-A com soros caninos:	92
Figura49: ELISA indireto da proteína Lci11-A com soros humanos:	93
Figura50: Esquema da sequência do gene Lci12.	95
Figura51: Alinhamento da proteína Lci12 de <i>L. infantum</i> e seus prováveis ortólogos na família Trypanosomatidae:.....	96
Figura52: Análise da expressão da proteína Lci12 ao longo do ciclo de vida de <i>L. infantum</i> :	97
Figura53: Comparação da expressão da proteína Lci12 na família Trypanosomatidae:.....	97
Figura54: Localização celular da proteína Lci12 em <i>L. infantum</i> :.....	98
Figura55: Localização subcelular da proteína Lci12 após fracionamento por ciclos de congelamento/descongelamento.	99
Figura56: Localização subcelular da proteína Lci12 após fracionamento com gradiente de digitonina:	99
Figura57: Gráfico do ELISA indireto para a proteína Lci12-B com soros caninos:	100
Figura58: ELISA indireto da proteína Lci12-B com soros humanos:	101
Figura59: Imagem esquemática dos genes otimizados para expressão das proteínas Lci2, Lci10 e Lci12.....	103
Figura60: Expressão das proteínas sintéticas e sub-regiões:	104
Figura61: ELISA indireto das proteínas otimizadas com soros caninos:.....	106
Figura62: ELISA indireto das proteínas otimizadas com soros humanos:	107

Lista de Tabelas

Tabela 1: Classificação taxonômica do Gênero Leishmania.	6
Tabela 2: Espécies de Leishmania e principais reservatórios	17
Tabela 3: Análise estatística do desempenho das proteínas Lci5-A e Lci5-B no reconhecimento dos soros de cães acometidos e sadios para LV.....	65
Tabela 4: Análise estatística do desempenho da proteína Lci5-A no reconhecimento dos soros humanos acometidos e sadios para LV.....	66
Tabela 5: Análise estatística do desempenho das proteínas Lci9-A e Lci9-B no reconhecimento dos soros de cães acometidos e sadios para leishmaniose visceral.	75
Tabela 6: Análise estatística do desempenho das proteínas Lci9-A e Lci9-B no reconhecimento dos soros humanos acometidos e sadios para leishmaniose visceral.	76
Tabela 7: Análise estatística do desempenho das proteínas Lci10-A e Lci10-B no reconhecimento dos soros de cães acometidos e sadios para LV.....	84
Tabela 8: Análise estatística do desempenho das proteínas Lci10-A e Lci10-B no reconhecimento dos soros humanos acometidos e sadios para leishmaniose visceral.	85
Tabela 9: Análise estatística do desempenho da proteína Lci11-A no reconhecimento dos soros de cães acometidos e sadios para LV.....	92
Tabela 10: Análise estatística do desempenho da proteína Lci11-A no reconhecimento dos soros humanos acometidos e sadios para leishmaniose visceral.	93
Tabela 11: Análise estatística do desempenho da proteína Lci12-B no reconhecimento dos soros de cães acometidos e sadios para LV.....	100
Tabela 12: Análise estatística do desempenho da proteína Lci12-B no reconhecimento dos soros humanos acometidos e sadios para LV.....	101
Tabela 13: Descrição estatística do desempenho das proteínas otimizadas no reconhecimento dos soros caninos acometidos e sadios para LV.	106
Tabela 14: Descrição estatística do desempenho das proteínas otimizadas no reconhecimento dos soros humanos acometidos e sadios para LV.....	107

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos.

BSA	B ovine S erum A lbumin – Albumina sérica bovina
CDC	Centro de Controle de Doenças
cDNA	DNA complementar
CPqGM	Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> – Ácido Desoxirribonucléico
DO	Densidade Ótica
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i> – Ensaio imunoenzimático
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IPTG	Isopropil-tio- β -D-galactopiranosídeo
ITS	Região espaçadora do DNA
kDa	KiloDalton
LB	Luria Bertani
LC	Leishmaniose Cutânea
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LMW	<i>Low molecular weight marker</i> – Marcador de baixo peso molecular
LPG	Complexo Glicofosfoglicano
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose visceral ou Calazar
NNN	Neal, Novy, Nicolle
OMS	Organização Mundial de Saúde
ON	Óxido Nítrico
OPD	Orthophenilenediamino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em Cadeia da Polimerase
pBK	vetor de clonagem pBK-CMV
PBS	Tampão Fosfato Salino
PFR	<i>Paraflagellar Rod</i> – Bastão Paraflagelar.
PKDL	<i>Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis</i> – leishmaniose Dérmica pós–Calazar
PMSF	<i>Phenyl-Methyl-Sulfonyl Fluoride</i> – Fluoreto de Fenilmetilsulfonil

PVDF	Fluoreto Polivinidileno
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
Rpm	Rotações por minuto
RT	Repetições em Tandem
SDS-PAGE	Sodium <i>Dodecyl Sulfate</i> – <i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> Dodecil sulfato de sódio – Eletroforese em gel de poliacrilamida
SFB	Soro Fetal Bovino
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
TAD	Teste de Aglutinação Direta
TBS	Tampão Tris Salino
TCA	Ácido Tricloroacético
Th1	Linfócito T Auxiliar tipo 1
Th2	Linfócito T Auxiliar tipo 2
TRALd	Teste Rápido de Anticorpo contra <i>Leishmania donovani</i>

SUMÁRIO

Resumo	vi
Abstract	vii
Lista de Ilustrações	viii
Lista de Tabelas	xi
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos.	xii
1.INTRODUÇÃO	1
2.REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. Gênero Leishmania: Histórico e Taxonomia	4
2.1.1. Taxonomia.	5
2.2. Aspectos morfológicos e ciclo biológico de Leishmania sp.	9
2.2.1. Morfologia do parasito.	9
2.2.1.1 Morfologia flagelar.	11
2.2.2. Características do vetor invertebrado	12
2.2.3. Ciclo biológico no hospedeiro invertebrado	13
2.2.4. Ciclo biológico no hospedeiro vertebrado	15
2.3. Características clínicas das formas de Leishmanioses.	17
2.3.1. Leishmaniose Tegumentar humana:	18
2.3.2. Leishmaniose Visceral humana:	19
2.3.3. Leishmaniose Visceral canina:	21
2.3.4. Coinfecção Leishmania/HIV.	23
2.4. Imunopatogenia das Leishmanioses.	24
2.5. Quadro atual das Leishmanioses.	26
2.5.1. Leishmanioses no Brasil.	27
2.6. Tratamento da Leishmaniose Visceral humana e canina.	30
2.7. Desenvolvimento de vacinas contra as Leishmanioses.	33
2.8. Técnicas de diagnóstico para as Leishmanioses.	35
2.8.1. Demonstração (microscópica) e isolamento do parasito (cultura).	36
2.8.2. Diagnóstico Molecular por PCR.	38
2.8.3. Diagnóstico por métodos sorológicos da Leishmaniose Visceral.	39
2.8.3.1. Utilização de Antígenos recombinantes em diagnóstico sorológico.	40
2.8.3.2. Antigenicidade e sequências repetitivas.	43
2.9. Novos antígenos de L. infantum com potencial uso no diagnóstico da Leishmaniose Visceral.	44
3.1 OBJETIVO GERAL	47
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
4. METODOLOGIA	48
4.1 Cultivo de parasitos.	48

4.2 Purificação dos anticorpos por imunoadsorção.	48
4.3 Ensaios de “Western-blot”.	49
4.4 Imunofluorescência.	50
4.5 Imunocitoquímica.	51
4.6 Ensaio de purificação de fosfoproteínas	52
4.7 Fracionamento celular por ciclos de congelamento/descongelamento	53
4.8 Fracionamento celular por gradiente de Digitonina.	54
4.10 Ensaio imunoenzimático (ELISA indireto) com antígenos recombinantes.	57
4.11 Descrição dos soros utilizados nos ensaios imunoenzimáticos.	58
5. RESULTADOS	60
5.1 Caracterização e análise antigênica indireta da proteína Lci5.	60
5.1.1 Descrição do gene.	60
5.1.2 Determinação da localização subcelular da proteína Lci5.	62
5.1.3 Análise da antigenicidade indireta da proteína.	64
5.2 Caracterização e análise antigênica da proteína Lci9.	67
5.2.1 Descrição do gene.	67
5.2.2 Análise da expressão e conservação da proteína Lci9 na família Trypanosomatidae.	68
5.2.3 Determinação da localização subcelular da proteína Lci9.	71
5.2.3 Análise da antigenicidade indireta da proteína Lci9.	74
5.3 Caracterização e análise antigênica da proteína Lci10.	77
5.3.1 Descrição do gene.	77
5.3.2 Análise da expressão e conservação na família Trypanosomatidae.	78
5.3.3 Identificação de modificações pós-traducionais do tipo fosforilação.	80
5.3.4 Determinação da localização subcelular da proteína Lci10-A.	81
5.3.5 Análise da antigenicidade indireta da proteína Lci10-A.	83
5.4 Caracterização e análise antigênica da proteína Lci11.	86
5.4.1 Descrição do gene.	86
5.4.2 Análise da conservação na família Trypanosomatidae.	87
5.4.3 Localização subcelular da proteína Lci11.	90
5.4.4 Análise indireta da antigenicidade da proteína Lci11	91
5.5 Caracterização e análise antigênica da proteína Lci12.	94
5.5.1 Descrição do gene.	94
5.5.2 Análise da conservação na família Trypanosomatidae.	95
5.5.3 Localização subcelular da proteína Lci12.	98
5.5.4 Análise da antigenicidade indireta da proteína Lci12	99
5.6 Descrição das proteínas recombinantes e genes otimizados de Leishmania infantum.	102
5.6.1 Subclonagem e expressão das proteínas otimizadas de L. infantum.	103
5.6.2 Análise da antigenicidade dos motivos repetitivos por ELISA.	104
6. DISCUSSÃO	109
7. CONCLUSÕES	116

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
9. CURRICULUM VITAE (LATTES)	130

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários pertencentes à família Trypanosomatidae e ao gênero *Leishmania* que apresentam ciclo de vida heteroxeno e vivem alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores. Dentre as diferentes formas de manifestação das leishmanioses descritas, somente a do tipo visceral promove o aparecimento de aproximadamente 500.000 novos casos por ano em todo o mundo, sendo uma importante causa de morbidade e mortalidade em áreas endêmicas.

Por ser considerada um grave problema de saúde pública, o desenvolvimento de agentes quimioterápicos, testes diagnósticos eficientes e viáveis e de vacinas eficazes que possam inibir ou impedir o desenvolvimento da doença em seres humanos e cães, além de bloquear a transmissão para o vetor, são condições essenciais para o combate eficiente da Leishmaniose Visceral. Além disso, torna-se essencial também desenvolvimento de estratégias de combate que possam ser utilizadas tanto para o homem quanto para o cão acometido seja na forma de diagnóstico ou plataforma vacinal. Mesmo com avanços nas áreas de sequenciamento genômico, o projeto genoma destes parasitos ainda apresentam um grande número de genes hipotéticos, possivelmente codificantes, cujo estudo e identificação podem vir a contribuir para um melhor entendimento da biologia destes, e facilitar o desenvolvimento de formas de combate aos parasitos e conseqüentemente às Leishmanioses. Por estas razões grupos de pesquisa vêm estudando novos antígenos recombinantes a fim de obter novos testes sorológicos mais sensíveis e específicos, como também vacinas recombinantes capazes de gerar resposta imune protetora e bloqueio da transmissão para o vetor.

Dentro dessa área de atuação, e em trabalhos que precederam à presente tese, foram identificados e construídos novos antígenos recombinantes de *L. infantum*, através da triagem de bibliotecas genômica e de cDNA. Apesar destas proteínas se mostrarem antigênicas, pouco ou nada se sabia sobre elas, visto que algumas estão anotadas nos bancos de dados de sequências genômicas (de *L. infantum* e *L. major*) como proteínas hipotéticas. Dentre essas se destacam algumas que não apresentam homologia em outros tripanossomatídeos, sugerindo serem exclusivas de *Leishmania*. Outro aspecto curioso sobre estas proteínas é que a maioria apresenta motivos antigênicos repetitivos. Essa característica é provavelmente responsável pela alta resposta imune humoral em humanos e em cães, tendo em vista que motivos repetitivos são freqüentemente potente ativadores de linfócitos B. Portanto, era necessário uma caracterização destas proteínas (em um número mínimo de quatro de um total de 13 inicialmente isoladas) que se mostram promissoras tanto para o diagnóstico quanto para uma vacina contra a Leishmaniose Visceral.

Neste trabalho foi possível identificar diferentes regiões antigênicas destas proteínas e diferentes sensibilidades na identificação de homens e cães infectados, facilitando o direcionamento para o desenvolvimento de um novo kit diagnóstico eficaz tanto para a Leishmaniose visceral humana quanto a canina. Foi também possível caracterizar estas proteínas contribuindo para o enriquecimento de informações sobre o genoma destes parasitos bem como analisar a conservação das proteínas o que permitiu a identificação de novas proteínas com potencial como marcadores para a diferenciação das formas tegumentar e visceral da Leishmaniose bem como de outras parasitoses. Outros fatos inéditos aqui apresentados foram a determinação da expressão constitutiva

e não estágio-específica destas proteínas bem como suas localizações celulares bem peculiares, o que pode direcionar futuras caracterizações funcionais das mesmas e mudar seus status como hipotéticas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Gênero *Leishmania*: Histórico e Taxonomia

As Leishmanioses são doenças endêmicas que acompanham o homem desde a Antiguidade e causam grandes transtornos para os indivíduos acometidos, existindo relatos e descrições encontrados na literatura desde o século I d.C. Evidências de lesões causadas pelos parasitos do gênero *Leishmania* podem ter sido historicamente reportadas em figuras, papiro, estatuetas e cerâmicas (Figura 1) (Altamirano-Enciso *et al.*, 2003; Camargo e Barcinski, 2003).

A primeira descrição dessas doenças, já conhecidas como Leishmanioses, na América do Sul, foi feita por Migone no Paraguai e data de 1911. Já no Brasil, o primeiro registro data de 1913 (Costa *et al.*, 1995), mas somente em 1934, após a identificação de 41 casos, essas doenças passaram a despertar interesse científico no país (Lainson e Rangel, 2005).



Figura 1: Cerâmica pré – colombianas indicando lesões causadoras de deformações em caso de Leishmaniose. Escultura em cerâmica mostrando mutilação do nariz sugestiva de Leishmaniose Mucocutânea (Altamirano-Enciso *et al.*, 2003).

Os parasitos do gênero *Leishmania* provavelmente surgiram durante o período Mesozóico e por muito tempo após sua descoberta foram considerados como tripanossomos (Shaw, 1994). O primeiro a observar o parasito do gênero *Leishmania* foi Cunningham (1885), na Índia, onde descreveu formas amastigotas em casos de Leishmaniose Visceral (Basano e Camargo, 2004). Estas formas foram estudadas por Leishman em 1903, que reconheceu a semelhança deste protozoário com as formas arredondadas do *Trypanosoma*. No mesmo ano Donovan os descreveu na moléstia chamada Dum-Dum ou calazar. Laveram e Mesnil, examinando alguns preparados de Donovan, chamaram-os de *Pinoplasma donovani*. Ross em 1903 demonstrou, entretanto, que os organismos evidenciados na preparação de Donovan não eram esporozoários como este havia pensado e lhes estabeleceu um novo gênero, o gênero *Leishmania*. Assim, o nome correto do agente etiológico do calazar ficou sendo *Leishmania donovani* (Momen e Cupolillo, 2000; Tuon 2008).

2.1.1. Taxonomia.

O parasito *Leishmania*, responsável pelas Leishmanioses, foi alocado no grupo dos chamados eucariotos protozoários e são taxonomicamente classificados na Ordem *Kinetoplastida* (Basano e Camargo, 2004), por apresentarem uma mitocôndria única modificada com a presença de uma estrutura chamada cinetoplasto (do inglês “kinetoplast”) (Grimaldi e Tesh, 1993). Pertencem ainda à Família Trypanosomatidae, Gênero *Leishmania*, e aos Subgêneros *Leishmania*, *Viannia* e *Sauroleishmania* (Michalick, 2002; Rey, 2008a; Carvalho, 2003; Bates, 2007) (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação taxonômica do Gênero *Leishmania*.

	Classificação	Autores
Domínio	<i>Eucariota</i>	Chatton (1925)
Reino	<i>Protozoa</i>	Goldfuss (1818), Rowen (1858)
Sub-reino	<i>Biciliata</i>	
Infrareino	<i>Excavata</i>	Cavalier-Smith (2002)
Filo	<i>Euglenozoa</i>	Cavalier-Smith (1981)
Subfilo	<i>Saccostoma</i>	Cavalier-Smith (1998)
Classe	<i>Kinetoplastea</i>	Honigberg (1963) Emend. L. Margulis (1974)
Ordem	<i>Kinetoplastida</i>	Honigberg (1963) Emend. Vickerman (1976)
Família	<i>Trypanosomatidae</i>	Doflein (1901); Emend. Grobbs (1905)
Gênero	<i>Leishmania</i>	Ross (1903)
Subgêneros	<i>Leishmania</i>	Laison & Shaw (1982)
	<i>Viannia</i>	Laison & Shaw (1982)
	<i>Sauroleishmania</i>	Croan (1997); Noyes (1997)

Fonte: ([http:// www.taxonomy.nl/Taxonomicocn/](http://www.taxonomy.nl/Taxonomicocn/))

Baseado nos diversos métodos de caracterização genética, como eletroforese isoenzimática e análise de DNA, além de estudos da morfologia e desenvolvimento do protozoário dentro do inseto vetor e do hospedeiro, várias classificações já foram propostas para os subgêneros de *Leishmania*. Atualmente, existem três grupos de parasitos, classificados em subgêneros diferentes (Figura 2) e que variam de acordo com a localização do parasito no intestino do inseto vetor (Bates, 2007; Lukes *et al.*, 2007)

➤ Subgênero *Leishmania*: constituído pelas espécies que são encontradas no intestino médio do vetor.

➤ Subgênero *Viannia*: constituído pelas espécies que se desenvolvem na região pilórica do intestino médio do inseto vetor.

➤ Subgênero *Sauroleishmania*: constituído pelas espécies que se desenvolvem no intestino posterior do inseto vetor.

Acredita-se que o gênero *Leishmania* surgiu após a extinção dos dinossauros e a emergência dos primeiros mamíferos placentários, sendo estes últimos, em sua maioria, os seus hospedeiros definitivos atuais. Nessa época o ancestral do parasito *Leishmania* foi separado no subgênero *Sauroleishmania*, o qual infecta répteis, e *Leishmania* e *Viannia* que infecta mamíferos (Momen e Cupolillo, 2000; Tuon 2008).

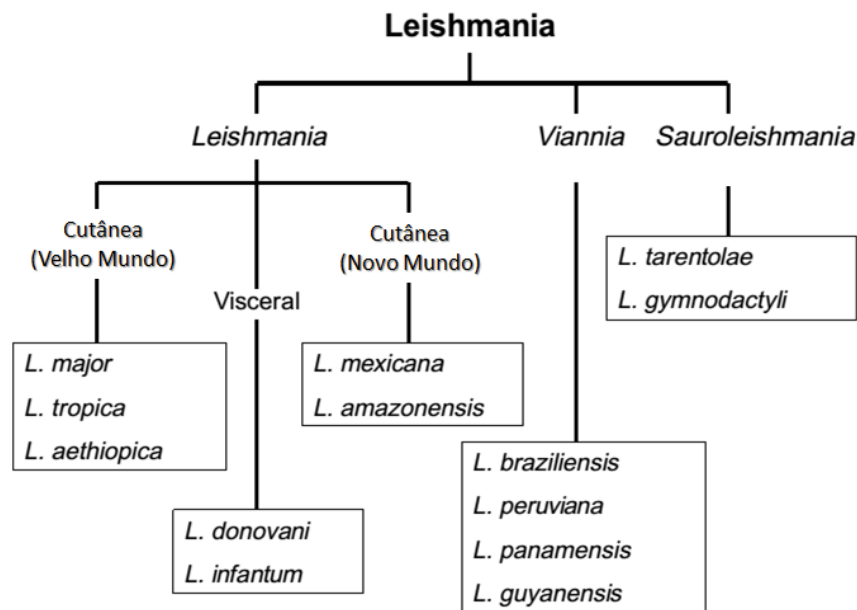


Figura 2: Classificação de espécies representativas de *Leishmania* sp. nos seus três subgêneros. As espécies citadas acima incluem algumas das espécies mais conhecidas que são o foco de pesquisas biomédicas. Os parasitos nos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* infectam mamíferos, enquanto os do *Sauroleishmania* infectam répteis como seus hospedeiros vertebrados. Adaptado de Bates, 2007.

O subgênero *Leishmania* inclui os complexos *donovani*, com duas espécies principais (*L. donovani* e *L. infantum/chagasi*), o complexo *mexicana* com três espécies principais (*L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. venezuelensis*) e as *L. tropica*, *L. major* e *L. aethiopica*. O subgênero *Viannia* tem como principais representantes as seguintes espécies patogênicas: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* e *L. peruviana*. Já o subgênero *Sauroleishmania* inclui as espécies *L. tarentolae* e *L. gymnodactyli* (Bates, 2007; C.D.C., 2008).

Existem mais de 30 espécies conhecidas de *Leishmania*, das quais 10 estão presentes no Velho Mundo e as outras 20 nas Américas. Dentre todas estas espécies, especula-se que aproximadamente 20 infectam o homem, podendo ocasionar doenças e cerca de 10 espécies tem relevância médica (Bates And Ashford, 2006; Lainson e Shaw, 2006; Fraga *et al.*, 2012). Até recentemente, não existia um consenso quanto ao número de espécies do subgênero *Leishmania*, pois alguns autores não consideravam *L. chagasi* e *L. infantum* como sendo a mesma espécie, enquanto outros sugeriam que *L. chagasi* seria originada de linhagens da *L. infantum* que foram trazidas para o Novo Mundo. Neste trabalho, em vista da literatura mais recente, foram adotadas as denominações *L. chagasi* e *L. infantum* apenas para diferenciar as cepas utilizadas, de origem no Velho Mundo (*L. infantum*) ou do Brasil (*L. chagasi*), mas ambas são de fato *L. infantum* (Momen e Cupolillo, 2000; Lukes *et al.*, 2007; FRAGA, *et al.*, 2012).

2.2. Aspectos morfológicos e ciclo biológico de *Leishmania* sp.

O ciclo de vida das espécies de *Leishmania* envolve a alternância entre um hospedeiro mamífero e um hospedeiro flebotomíneo, permitindo que os parasitos apresentem assim características biológicas distintas durante seu ciclo de vida digenético.

2.2.1. Morfologia do parasito.

Do ponto de vista de sua morfologia os protozoários do gênero *Leishmania* possuem duas formas evolutivas principais: amastigota e promastigota. As formas amastigotas são as formas presentes no hospedeiro vertebrado. Estas são arredondadas, apresentando um curto flagelo, com aproximadamente 1,5 a 3 µm de comprimento por 3 a 6 µm de diâmetro. Estas formas apresentam-se como intracelulares obrigatórias, desenvolvendo-se em células do sistema fagocítico mononuclear. As formas promastigotas são formas extracelulares móveis, alongadas e flageladas, encontradas no intestino do vetor invertebrado. Normalmente classificadas como formas procíclicas e metacíclicas, possuem uma variabilidade muito grande nas suas dimensões, variando entre 10,0 a 40,0 µm de comprimento por 1,5 a 3,0 µm de diâmetro (Figura 3) (Teixeira, 2002; Neves, 2011; Besteiro *et al.*, 2006).

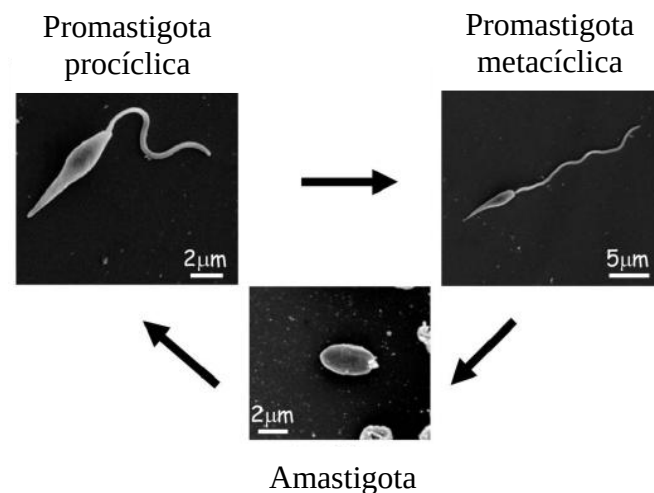


Figura 3: Formas evolutivas de *Leishmania* sp. Na figura estão ilustradas algumas das formas promastigotas encontrada no trato digestivo do hospedeiro invertebrado, a forma procíclica e a forma metacíclica. No painel inferior é ilustrada a forma amastigota presente no hospedeiro vertebrado. Adaptado de Besteiro *et al.*, 2007.

A grande variabilidade de dimensão das formas promastigotas se deve a subtipos dessas formas classificados mais recentemente. Trabalhos da última década sobre *L. (L.) mexicana* forneceram evidências claras para a classificação de uma nova fase do ciclo de vida, o promastigota leptomonas, sendo uma forma precursora de desenvolvimento para forma promastigota metacíclica. Este estudo definiu então quatro formas principais de desenvolvimento de promastigotas: promastigotas procíclicas, promastigotas nectomonas, promastigotas leptomonas e promastigotas metacíclicas. Em adição, foi descrita também a forma haptomonas que possui uma base flagelar expandida, presente também no hospedeiro invertebrado (Rogers *et al.*, 2002; Awasthi *et al.*, 2004; Thiel *et al.*, 2008) (Figura 6).

2.2.1.1 Morfologia flagelar.

Duas características distintas na biologia celular dos tripanossomatídeos é a presença de um flagelo em certos estágios do seu ciclo biológico e a existência de uma invaginação proeminente da membrana plasmática denominada bolsa flagelar. O flagelo é a organela clássica de motilidade que permite a movimentação do parasito através de movimentos ondulares gerados pelo axonema flagelar, baseado em microtúbulos. O mesmo também está envolvido em atividades biológicas adicionais como ligação do parasito ao endotélio do inseto vetor e ainda age como uma organela sensorial especializada. A bolsa flagelar se constitui de uma invaginação profunda na base do flagelo, sendo responsável pela absorção de nutrientes através de endocitose mediada por receptores, pela secreção de proteínas no meio extracelular e pela integração de proteínas de membrana à superfície celular do parasito (Webster e Russel, 1993; Landfear e Ignatushchenko, 2001). Apesar da forma amastigota do parasito apresentar apenas um resquício flagelar, esse ainda desempenha outras funções como percepção sensorial e apresenta papel crítico na organização celular (Silverman e Liroux, 2009).

Além das estruturas convencionais da organela, o flagelo das espécies de *Leishmania* também contém um corpo fibroso denominado bastão paraflagelar (PFR) constituído de filamentos dispostos ao longo de todo o comprimento do flagelo e ligado ao axonema flagelar (Figura 4). O PFR, em *Leishmania*, é constituído principalmente pelas proteínas denominadas PFR-1, PFR-2 e PAR-2 e PAR-3 que participam no intrincado transporte intracelular de proteínas ao longo do flagelo, indispensável para sua viabilidade (GULL, 1999; Gluenz 2010).

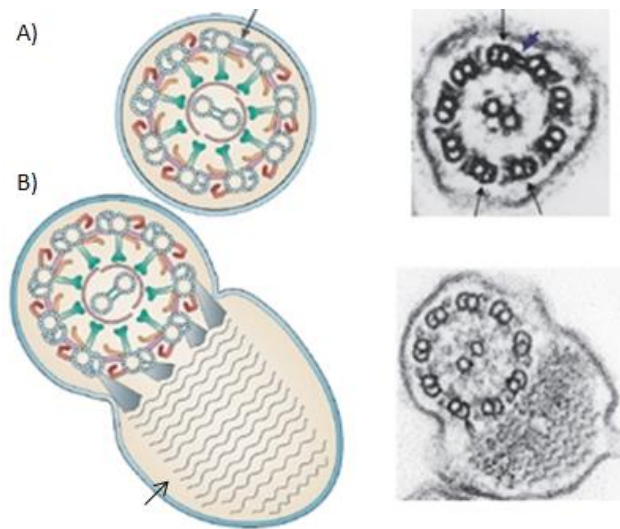


Figura 4: Ultraestrutura do flagelo dos tripanossomatídeos. A figura mostra as principais estruturas do flagelo dos tripanossomatídeos. A) Visualização do axonema, estrutura cilíndrica altamente organizada, composta por nove duplas periféricas de microtúbulos em torno de um par central, e de um certo número de apêndices. B) Seção transversal do flagelo, permitindo visualização do bastão paraflagelar (PFR) e sua colocação com o axonema. Adaptado de Ginger, *et. al.*, 2009.

2.2.2. Características do vetor invertebrado

Os hospedeiros invertebrados de todas as espécies de *Leishmania* são insetos dípteros flebotomíneos (subfamília *Phlebotominae*) do gênero *Phlebotomus* (distribuído no Velho Mundo) e do gênero *Lutzomyia* (distribuído no Novo Mundo) (Figura 5) (Brandão-Filho *et al.*, 1994; Azevedo *et al.*, 1996). Duas espécies bastante estudadas e que podem ser encontradas no Brasil transmitindo os parasitos são: *L. longipalpis* (que possui a denominação popular de “mosquito palha”) e *L. whitmani*. Esses insetos são pequenos e medem de 1 a 3 mm de comprimento. Possuem o corpo revestido por pêlos de coloração clara (castanho

claro ou cor de palha), grandes asas pilosas dirigidas para trás e para cima, cabeça flexionada para baixo, aspecto giboso do corpo e longos palpos maxilares. São facilmente reconhecíveis pelo seu comportamento, ao voar em pequenos saltos e pousar com as asas entreabertas. Estes insetos na fase adulta estão adaptados a diversos ambientes, porém na fase larvária desenvolvem-se em ambientes terrestres úmidos e ricos em matéria orgânica e de baixa incidência luminosa (Brandão-Filho *et al.*, 1994; Azevedo *et al.*, 1996; Ministério Da Saúde, 2006). Seu habitat normalmente é o domicílio e o peridomicílio humano, onde se alimentam de sangue do cão, do homem, de outros mamíferos e aves. As fêmeas têm hábitos antropofílicos, pois necessitam de sangue para desenvolvimento dos ovos (Brandão-Filho *et al.*, 1994; Azevedo *et al.*, 1996; Mutebi, 1999; Uribe, 1999).

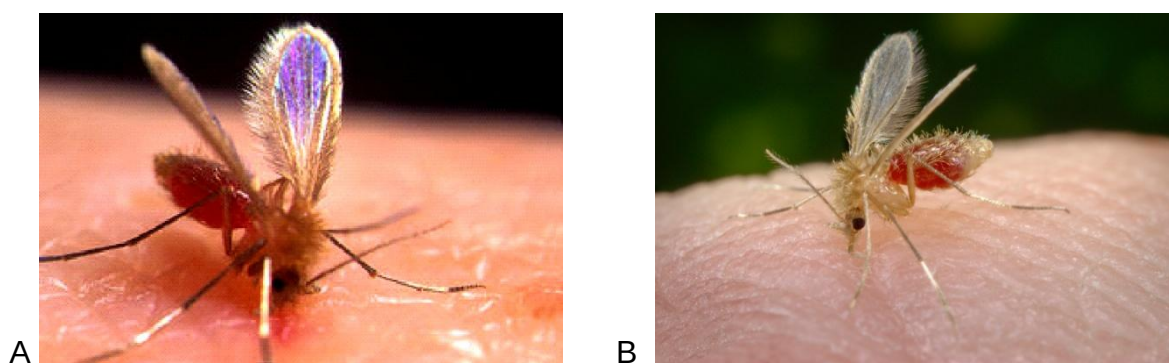


Figura 5: Flebotomíneos (*Lutzomia* sp. (a) E *Phlebotomus* sp.(b) se alimentando em um homem. Estão representados os hospedeiros invertebrados dos parasitos *Leishmania* sp, estando o gênero *Phlebotomus* presente no Velho Mundo e *Lutzomia* nas Américas. Fonte: Sharma e Singh, 2008.

2.2.3. Ciclo biológico no hospedeiro invertebrado

Durante o repasto sanguíneo sobre o hospedeiro infectado o inseto vetor ingere as formas amastigotas do hospedeiro vertebrado, as quais se reproduzem intensamente por divisão binária se transformando em promastigotas procíclicas

(Roberts e Janovy, 1996; Michalick, 2002). Inicialmente, as formas em divisão, juntamente com o sangue ingerido, vão se localizar no intestino médio do inseto, protegidas pela matriz peritrófica, composta de proteínas e quitina secretadas pelo endotélio do vetor. Após alguns dias, os parasitos começam a diminuir sua taxa de divisão e se diferenciam nas formas promastigotas nectomonas, sendo formas migratórias que se acumulam na região anterior da matriz. Em seguida, a matriz peritrófica se degenera e as promastigotas migram para o segmento anterior do tubo digestivo onde sofrem mais divisões e diferenciação em formas leptomonas que são menores e se dividem mais rapidamente. Os parasitos então migram para a região do esôfago, faringe e válvula estomodeal onde se diferenciam nas formas metacíclicas, infectantes aos hospedeiros mamíferos. Devido à intensa multiplicação ocorre uma obstrução mecânica, a qual dificulta a ingestão de sangue pelo inseto. Após cada novo repasto sanguíneo, os músculos responsáveis pela sucção relaxam provocando o refluxo das formas promastigotas que, assim, infectam um novo hospedeiro (Figura 6). Além destas formas bem descritas de *Leishmania*, acredita-se que algumas formas promastigotas metacíclicas e leptomonas podem ainda se diferenciar em promastigotas haptomonas e se aderir ao endotélio intestinal por mecanismo ainda não bem esclarecido (Michalick, 2002; Rogers *et al.*, 2002; Wakid e Bates, 2004; Secundino *et al.*, 2005; Bates, 2007).

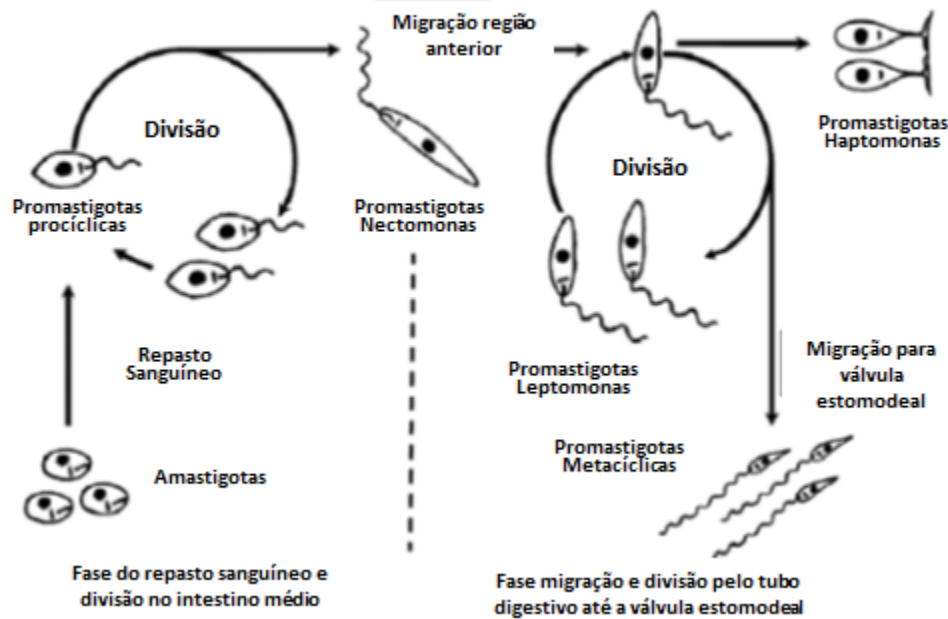


Figura 6: Ciclo biológico do parasito no inseto vetor. Durante o ciclo biológico no inseto vetor os parasitos *Leishmania sp.* assumem diversas formas evolutivas ao longo de todo intestino e probóscida do inseto vetor. Adaptado de Bates, 2007.

2.2.4. Ciclo biológico no hospedeiro vertebrado

Nos hospedeiros vertebrados (homem, cão, raposa, roedor, etc.), ainda no local da inoculação pelo inseto vetor, as formas promastigotas metacíclicas se utilizam de mecanismos que lhes permitem resistir à ação de elementos presentes no sangue, principalmente o sistema complemento, e estimular sua adesão e endocitose pelos macrófagos. Moléculas de superfície, como a GP63 (glicoproteína de 63 kDa) e LPG (complexo glicofosfoglicano) são indicadas como importantes nestes processos. Após a internalização das promastigotas em fagossomos, estes se fundem a lisossomos. Para sua adaptação às condições do novo ambiente, o parasito sofre então uma transformação dentro de 12 a 24 horas para a forma amastigota, intracelular obrigatória e capaz de se desenvolver e se

multiplicar no meio ácido encontrado no vacúolo gerado. As amastigotas se multiplicam intensamente por divisão binária até que provocam o rompimento do macrófago, caindo no espaço intercelular e vindo a ser fagocitadas por novos macrófagos e células do SFM (Sistema Fagocítico Mononuclear), quer no local da infecção cutânea ou em órgãos linfóides secundários, com eventual parasitemia. Durante o repasto sanguíneo o inseto vetor ingere as formas amastigotas livres ou internalizadas em macrófagos e monócitos, sendo liberadas dentro do intestino médio e se diferenciando nas formas promastigotas flageladas completando assim seu ciclo (Figura 7) (Akopyants *et al.*, 2004; Ramos *et al.*, 2004; Singh, 2006).

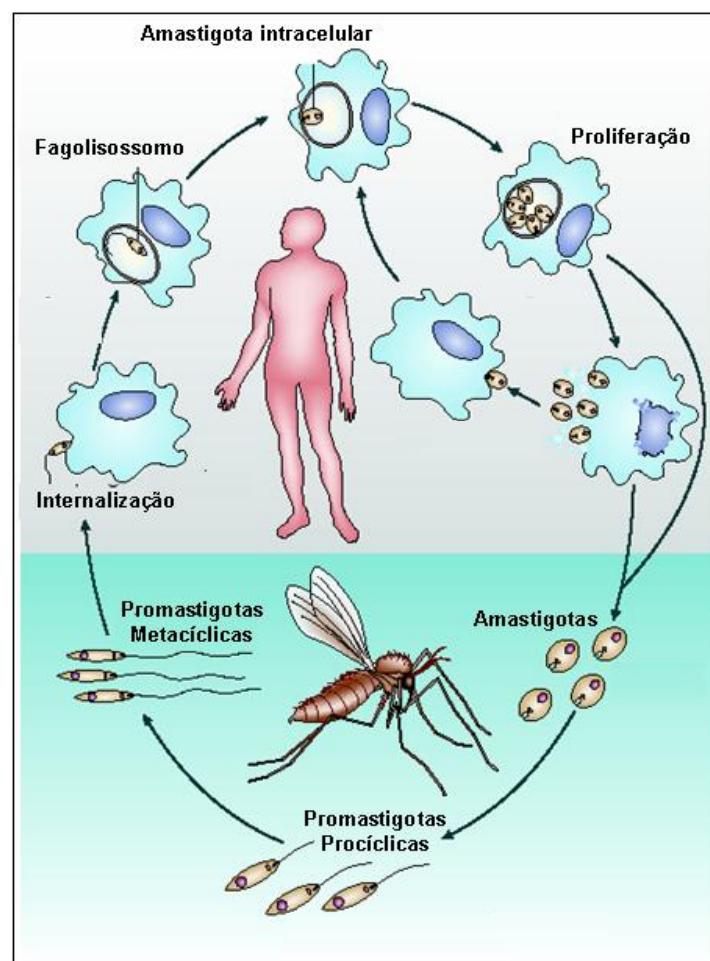


Figura 7: Ciclo biológico geral de *Leishmania* sp. Fonte: Nature -

http://www.nature.com/nrmicro/journal/v5/n11_suppl/thumbs/nrmicro1748-f3.jpg

O período de incubação da doença varia de 10 dias a 24 meses, sendo em média 2 a 4 meses. A principal transmissão se faz a partir dos reservatórios animais enquanto persistir o parasitismo na pele ou no sangue circulante (Tabela 2) (Funasa, 2000).

Tabela 2: Espécies de *Leishmania* e principais reservatórios

<i>Espécie de Leishmania envolvida</i>	<i>Principais reservatórios</i>
<i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	Cão (<i>Canis familiaris</i>) na área urbana; Raposa e marsupial didelfídeo no ambiente silvestre.
<i>Leishmania (Viannia) brasiliensis</i>	Animais domésticos: cães, eqüinos e mulas, e roedores domésticos e sinantrópicos.
<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	Animais da classe dos desdentados e marsupiais.
<i>Leishmania (Viannia) naiffi</i>	Tatu como reservatório natural.
<i>Leishmania (Viannia) shawi</i>	Animais silvestres como macacos, preguiças e procionídeos.
<i>Leishmania (Viannia) lainsoni</i>	Paca como animal suspeito.
<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	Roedores e marsupiais.

(Adaptado de GONTIJO e CARVALHO, 2003).

2.3. Características clínicas das formas de Leishmanioses.

Os parasitos do gênero *Leishmania* causam doenças geralmente de evolução crônica, e apresentam um grande polimorfismo clínico, variando de características clínicas e epidemiológicas diferentes em cada área geográfica. Essas características vão depender do estado imunológico do hospedeiro

infectado, da espécie e da cepa do parasito envolvido, da espécie do vetor e de fatores genéticos que estão diretamente ligados a resistência dos hospedeiros à infecção e a virulência do parasito. Em humanos existem duas formas dessas doenças conhecidas como Leishmanioses sendo classificadas como: Leishmaniose Tegumentar (que inclui Leishmaniose Cutânea localizada, Cutânea Difusa e Mucocutânea) e Leishmaniose Visceral (LV) ou Calazar, foco desse trabalho (Genaro, 2002; Rey, 2008b ;Goto, et AL, 2012; Mcgwire e Satoskar, 2013).

2.3.1. Leishmaniose Tegumentar humana.

A Leishmaniose Cutânea (LC) é a forma menos grave da doença, sendo causada por várias espécies, tais como *L. major* e *L. tropica* no Velho Mundo e *Leishmania mexicana*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* e *L. braziliensis* em várias regiões da América Central e da América do Sul. Esta forma clínica apresenta-se como úlcera singular ou lesões nodulares próximas ao local de exposição à picada do inseto vetor. Estas são normalmente encontradas em regiões não cobertas do corpo como o rosto, braços e pernas e evoluem ao longo de semanas a meses. Na forma difusa da doença, encontram-se lesões nodulares de tamanho variável irrompendo em vários locais, muitas vezes, distantes do local de exposição. Lesões cutâneas simples são mais frequentemente autocuradas, mas em alguns casos podem evoluir para a forma Mucocutânea (David e Craft, 2009; Goto e Laulleta, 2012).

A Leishmaniose Mucocutânea (LM) acomete os tecidos mucocutâneos dependendo do nível da metástase dos parasitos ou pela extensão da lesão no

tecido cutâneo-mucoso. A LM pode se manifestar de meses a anos após a resolução das lesões primárias. Apresenta frequentemente uma infecção terrivelmente desfigurante resultando na destruição local de tecido do nariz, boca, oro-naso-faringe e pálpebras e pode progredir para danos à função respiratória e dificultar a nutrição. A patogênese subjacente resultante da LM não é bem compreendida e é provavelmente resultado de uma complexa interação entre parasito e o hospedeiro (De Oliveira e Brodskyn, 2012; Goto e Laulleta, 2012).

2.3.2. Leishmaniose Visceral humana:

A Leishmaniose Visceral (LV) ou Calazar é a forma mais grave das Leishmanioses, sendo letal se não tratada, acometendo as vísceras devido ao acentuado tropismo dos parasitos pelo SFM. A LV é resultante da infecção de fagócitos do SFM devido à metástase dos parasitos e células infectadas do sítio inicial da infecção cutânea. No Velho Mundo é causada pelas espécies *L. donovani* e *L. infantum*. Já nas Américas é causada apenas pela espécie *L. infantum* (Ramos-e-Silva e Jacques, 2002; Zijlstra, 2003; Ter Horst, *et al.*, 2008).

A LV humana (LVh) apresenta-se sob a forma de doença crônica, sistêmica, caracterizada por febre de longa duração, perda de peso e fraqueza, entre outras manifestações. O número de casos graves é relativamente pequeno em relação ao de infectados, sendo mais frequentes os casos inaparentes ou oligossintomáticos. Na forma inaparente, observa-se apenas sorologia positiva, pela reação de Montenegro, ou presença de parasito em tecidos, sem sintomatologia clínica manifesta. A forma oligossintomática tem quadro intermitente, com febre baixa ou ausente e fraqueza muscular. Além disso,

hepatomegalia (aumento do fígado) está presente e esplenomegalia (aumento do baço) quando detectada é discreta. (McGwire e Satoskar, 2013).

Do ponto de vista didático e considerando a evolução clínica da Leishmaniose Visceral, a atual classificação da LVh, aceita pelo Ministério da saúde, compreende três períodos:

Período inicial: Esta fase da doença, também chamada de “aguda” por alguns autores, caracteriza o início da sintomatologia que pode variar de paciente para paciente, mas na maioria dos casos inclui febre com duração inferior a quatro semanas, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia (aumento do fígado e baço). Frequentemente, esses pacientes apresentam-se ao serviço médico fazendo uso de antimicrobianos sem resposta clínica e muitas vezes com histórico de tosse e diarreia.

Período de estado: Caracteriza-se por febre irregular, geralmente associada a emagrecimento progressivo, palidez cutâneo-mucosa e aumento da hepatoesplenomegalia (Figura 8). Apresenta um quadro clínico arrastado geralmente com mais de dois meses de evolução, na maioria das vezes associado ao comprometimento do estado geral.

Período Final: Caso não seja feito o diagnóstico e tratamento, a doença evolui progressivamente para o período final, com febre contínua e comprometimento mais intenso do estado geral. Instala-se a desnutrição (cabelos quebradiços, cílios alongados e pele seca) e edema dos membros inferiores que pode evoluir para edema generalizado. Outras manifestações importantes incluem hemorragias, icterícia e ascite (acúmulo de fluidos no abdômen). Nestes pacientes, o óbito geralmente é

determinado por infecções bacterianas e/ou sangramentos (Ministério Da Saúde, 2006).



Figura 8: Crianças com Leishmaniose Visceral apresentando hepatoesplenomegalia. A partir do período intermediário da gravidade da doença, conhecido como período de estado, já é possível observar um quadro intenso de desnutrição e acentuada hepatoesplenomegalia. Fonte: Manual de Vigilância e controle da Leishmaniose Visceral (Ministério da Saúde, 2006).

Adicionalmente a essas formas clínicas descritas, vários pesquisadores destacam também a existência de uma importante forma de lesão imunologicamente mediada, que pode configurar uma complicação da Leishmaniose Visceral. Esta nova forma de lesão, denominada de Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar (do inglês “Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis” – PKDL), é caracterizada por erupções maculares, maculopapulares e nodulares na pele de pacientes tratados e supostamente curados da Leishmaniose Visceral (Antinori *et al.*, 2007; Singh, *et al.*, 2011).

2.3.3. Leishmaniose Visceral canina:

A LV no cão é de evolução lenta e início insidioso. Esta é uma doença sistêmica severa cujas manifestações clínicas são intrinsecamente dependentes do tipo de resposta imunológica expressa pelo animal infectado. O quadro clínico dos cães infectados apresenta um espectro de características clínicas que varia do aparente estado sadio a um severo estágio final. Inicialmente, os parasitos estão presentes no local da picada, mas posteriormente ocorre a infecção de vísceras e eventualmente tornam-se distribuídos através da derme. A perda de pêlos causada pela infecção expõe grandes áreas da pele extensamente parasitada (Saridomichelakis, 2009).

Podemos agrupar os animais com Leishmaniose Visceral canina em três categorias: assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. Os cães assintomáticos podem viver anos sem apresentar sinais da doença. No Brasil, a forma assintomática geralmente representa de 40 a 60% de uma população soropositiva. Os cães oligossintomáticos podem apresentar ou não perda de peso, com sinais dermatológicos, geralmente com opacidade de pêlo, alopecia e espessamento na extremidade das orelhas (Moreira, 2007). Na forma sintomática, os sinais clínicos comuns incluem lesões na pele tal como, dermatite esfoliativa, pápulas e pequenos nódulos, úlceras indolentes, crostas, hipotricose, distúrbios disqueratóticos generalizados. Os sinais sistêmicos desta forma incluem fadiga, linfadenopatia generalizada, lesões oculares (bulftalmia) e diarreia crônica. Na fase final da infecção, ocorre em geral a perda da força muscular das patas posteriores, perda de peso, inanição e morte. Apesar do grande número de sinais clínicos, cães infectados podem permanecer sem esses sinais por um longo período de tempo (Noli e Auxilia, 2005; Miró *et al.*, 2008; Baneth *et al.*, 2008).

2.3.4. Coinfecção *Leishmania*/HIV.

Durante a era do HIV, a LV se tornou uma importante doença oportunista na coinfecção com a doença principalmente em áreas endêmicas. A LV pode modificar a progressão da doença pelo HIV e a imunodepressão causada por este vírus facilita a progressão da LV. A avaliação do conjunto de manifestações clínicas da LV em pacientes portadores de HIV indica que não existe uma definição de um perfil clínico que possa ser indiscutivelmente associado à coinfecção. Em pacientes com LV observa-se também maior frequência de envolvimento de órgãos não pertencentes ao sistema fagocítico-mononuclear e maior frequência de recidivas. Existem, no entanto, casos de indivíduos coinfectados cuja Leishmaniose evolui sem nenhum impacto aparente da infecção pelo HIV. A gravidade das manifestações clínicas, a resposta ao tratamento, a evolução e o prognóstico estão diretamente associados à condição imunológica do paciente, avaliada por meio da contagem de linfócitos T CD4⁺ (Rosenthal, *et al.*, 2000; Alvar, *et al.*, 2008).

Todas as formas de apresentação da infecção por *Leishmania* sp. já foram descritas em pessoas infectadas pelo HIV. A tríade clássica da LV é também a manifestação mais comum da doença na coinfecção: hepato-esplenomegalia, febre e pancitopenia são observadas em 75% dos casos. Relatos na literatura descrevem frequências relativas das manifestações clínicas nos pacientes, variando a apresentação de febre, emagrecimento, anemia, esplenomegalia e hepatomegalia, dentre outras sintomatologias. As manifestações pouco usuais ocorrem em, aproximadamente, 10 a 16% dos casos, mas a maioria delas é conhecida há décadas em pacientes imunocompetentes. Pode ainda haver

acometimento do trato gastrointestinal e do trato respiratório para a coinfeção LV/AIDS (Couppié *et al.*, 2004; Soong, 2012).

O diagnóstico da coinfeção HIV tem implicações na abordagem das Leishmanioses em relação ao diagnóstico, à indicação terapêutica e ao monitoramento de efeitos adversos, à resposta terapêutica e à ocorrência de recidivas. Portanto, recomenda-se oferecer a sorologia para HIV para todos os pacientes com LV, independentemente da idade, conforme as recomendações do Ministério da Saúde (Ministerio Da Saúde; 2006; Lodge, *et al.*, 2012; Soong, 2012).

2.4. Imunopatogenia das Leishmanioses.

A patogenia das Leishmanioses é fortemente influenciada por fatores inerentes ao hospedeiro, como suas características genéticas e resposta imunológica; por fatores inerentes ao parasito, como a virulência da espécie de *Leishmania* infectante; e por fatores inerentes ao vetor, como sua capacidade vetorial. Como resultado dessa interação entre as diferentes espécies do parasito, do vetor e os mecanismos da resposta imunológica do hospedeiro vertebrado, um espectro de manifestações clínicas, histopatológicas e imunopatológicas é observado no homem (Alexander e Bryson, 2005; Lodge, *et al.*, 2012).

A inoculação de formas promastigotas pelo inseto vetor no hospedeiro vertebrado desencadeia mecanismos de defesa anteriores à resposta imune específica, através do desenvolvimento de resposta inflamatória inespecífica com a participação de componentes séricos e celulares. Em relação aos elementos celulares que participam da resposta inflamatória aguda inicial, os leucócitos

polimorfonucleares mostram-se importantes na fagocitose dos parasitos, com o auxílio de imunoglobulinas e do sistema complemento. Em relação à imunidade adquirida ou específica nas Leishmanioses, trabalhos experimentais têm mostrado que a resposta imune associada à resistência está relacionada à proliferação e ativação de células T CD4⁺ do tipo Th1 e T CD8⁺ que são responsáveis pela ativação de macrófagos e conseqüente morte dos parasitos intracelulares e/ou através da lise de células infectadas mediada por uma complexa rede de citocinas. Em contraste, a suscetibilidade estaria relacionada à expansão das células T CD4⁺ do tipo Th2, associada a uma ativação policlonal de células B (Scharton-Kersten e Scott, 1995; Himmelrich, *et al.*, 2000; Sacks e Nobem, 2002; Alexander e Bryson, 2005;).

A correlação entre as sub-populações Th1 e Th2 de células T CD4⁺ com suscetibilidade ou resistência à infecção foi descrita pela primeira vez em modelos experimentais de Leishmaniose (Mosmann *et al.*, 1986; Locksley *et al.*, 1988). Quando camundongos foram inoculados com *L. major*, verificou-se que as células T CD4⁺ da linhagem BALB/c, consideradas suscetíveis, secretavam preferencialmente IL-4, IL-5 e IL-10, citocinas que caracterizam a sub-população Th2. No entanto, células T CD4⁺ de camundongos C57BL/6, considerados resistentes, secretavam preferencialmente IL-2, IFN- γ e TNF- α , citocinas que caracterizam a sub-população Th1 (Afonso e Scott, 1993; McMahon-Pratt 2004; Van-Assche, 2011).

Atualmente define-se que para a cura das Leishmanioses são requeridos três eventos sequenciais, incluindo ativação de células dendríticas, a produção das citocinas das células Th1 (IL-12, IL-18, e IL-27), bem como a liberação dos fatores IFN- γ /TNF- α pelas células Th1 e a clássica ativação dos macrófagos. As

vias bioquímicas bem como o papel crucial dos radicais reativos de oxigênio (ROS) e do óxido nítrico (NO) na depuração dos parasitos já foram bem descritos. Entretanto não há um consenso para os mecanismos de suscetibilidade do hospedeiro, nem para eventos que desencadeariam as diferentes formas clínicas (Mukbel, *et al.*, 2007; Van-Assche, 2011; Bhattacharya e Ali, 2013).

2.5. Quadro atual das Leishmanioses.

As Leishmanioses apresentam, atualmente, comportamento endêmico em países tropicais e subtropicais com vasta distribuição mundial. Diversos trabalhos de pesquisadores vinculados a OMS (Organização Mundial da Saúde) reconhecem que as Leishmanioses ocorrem em 98 países, dos quais 77 são do Velho Mundo e 21 do Novo Mundo (Figura 9). Mais especificamente, a LV ocorre em 76 países (sendo 65 do Velho Mundo e 11 do Novo Mundo). Aproximadamente 12 milhões de pessoas são acometidas mundialmente pelas Leishmanioses e 350 milhões de pessoas vivem em situação de risco. A incidência anual global da doença está estimada em 1,5 a 2 milhões de novos casos e o número de mortos associados a estas doenças chega a 70 000 mortos por ano. Enquanto que as formas de Leishmaniose Tegumentar tem uma tendência à cura espontânea, a forma visceral é fatal quando não tratada, causando uma mortalidade anual global estimada em 59 000 casos (Who, 2010; Palatnik-De-Sousa e Day, 2011; Wang *et al.*, 2012).

Dentre os diversos tipos de Leishmanioses descritas, somente a Leishmaniose do tipo visceral promove o aparecimento de aproximadamente 500.000 novos casos de indivíduos doentes por ano em todo o mundo. Cerca de

90% ocorrem nas áreas rurais mais pobres e suburbanas de Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão. Em vista da sua distribuição geográfica, dos fatores ambientais e comportamentais destes países, as Leishmanioses permanecem como doenças negligenciadas (Desjeux, 2004; Den Boer, *et al*, 2011).

Nos últimos 20 anos, um progresso considerável foi feito no desenvolvimento de diagnósticos e tratamentos altamente eficazes, seguros e de fácil aplicação úteis no controle das Leishmanioses. No entanto, a maioria dos pacientes ainda têm pouco ou nenhum acesso a cuidados. A maioria dos países endêmicos são muito pobres ou não reconhecem as Leishmanioses como uma prioridade de saúde. Com exceção do sul da Europa, os serviços públicos de saúde não oferecem tratamentos satisfatórios, diagnósticos e controle efetivo das doenças em áreas endêmicas, permitindo que as Leishmanioses ainda representem um crescente problema de saúde pública (Who, 2010; Den Boer, 2011; Palatnik-De-Sousa e Day, 2011; Wang *et al.*, 2012).

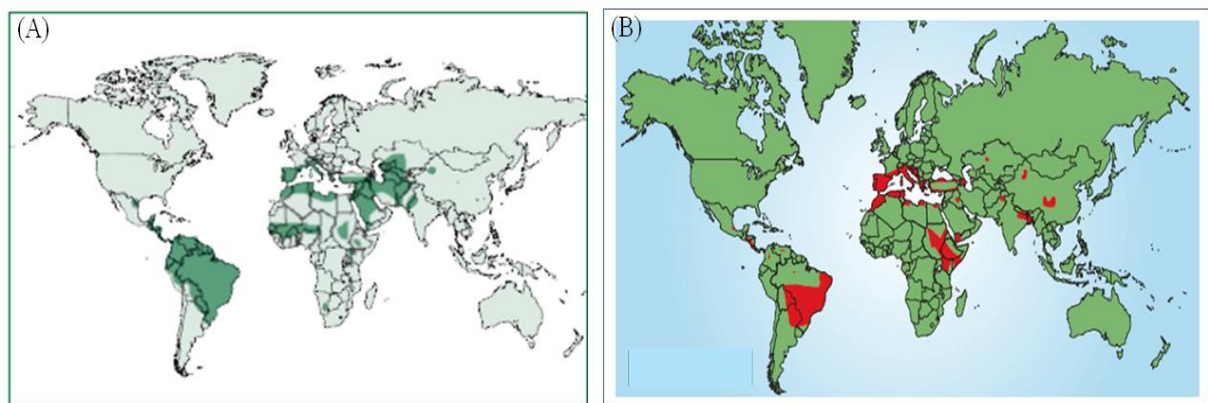


Figura 9. Mapas ilustrando a distribuição geográfica das Leishmanioses Cutânea (A) e Visceral (B). Fonte: Adaptado de chappuis *et al.*, 2007; Reithinger *et al.*, 2007.

2.5.1. Leishmanioses no Brasil.

No Brasil, foram notificados, no período de 1990 a 2007, 561.673 casos de Leishmanioses, sendo 508.193 (90,5%) casos de LT pelas espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi* e *L. (L.) amazonensis* e 53.480 (9,5%) pela espécie *L. (L.) infantum* (Alves, *et al.*, 2006; BEPA, 2009;).

Segundo a Fundação Nacional de Saúde, foram confirmados casos de LT em todos os estados do país, tendo a região Norte o maior número de casos (cerca de 36,0% do total de casos registrados no período de 1980-2007) e com os coeficientes médios mais elevados (85,4 casos por 100.000 habitantes), seguida das regiões Nordeste (43,5 casos por 100.000 habitantes) e Centro-oeste (37,5 casos por 100.000 habitantes). Já a LV ocorre em praticamente todos os estados brasileiros, sendo uma importante causa de morbidade e mortalidade em áreas endêmicas, principalmente no Nordeste brasileiro (Maia-Elkhoury, *et al.*, 2008; Bepa, 2009; Brasil, 2009).

A LV apresenta comportamento epidemiológico cíclico, com elevação de casos em períodos médios a cada cinco anos com média anual de 3.095 e incidência de 2,1 casos por 100.000 habitantes. De acordo com o Ministério da Saúde, entre 2006 a 2010, foram registrados, no país, 18.168 ocorrências de Leishmaniose Visceral. Em 2010, o Nordeste representou 47,1% dos casos, seguido pelas regiões Norte, com 18,%, Sudeste, com 17,8%, Centro-Oeste com 8,6% e o Sul com 0,1%. Até a década de 90, a região Nordeste correspondeu a 90% dos casos de LV do país. Entretanto, a doença vem se expandindo para as regiões Centro Oeste, Sudeste e Norte, modificando esta situação, de modo que entre 2007 e 2010 a Região Nordeste passou a representar 48% do total de casos (Figura 10). No ano de 2007 foram registrados 2.897 casos e a doença afetou principalmente

crianças menores de 10 anos (62,1%) e indivíduos do sexo masculino (74,2%). No período foram registrados 183 óbitos o que representa uma letalidade de 6,3% (Bepa, 2009; Brasil, 2011).

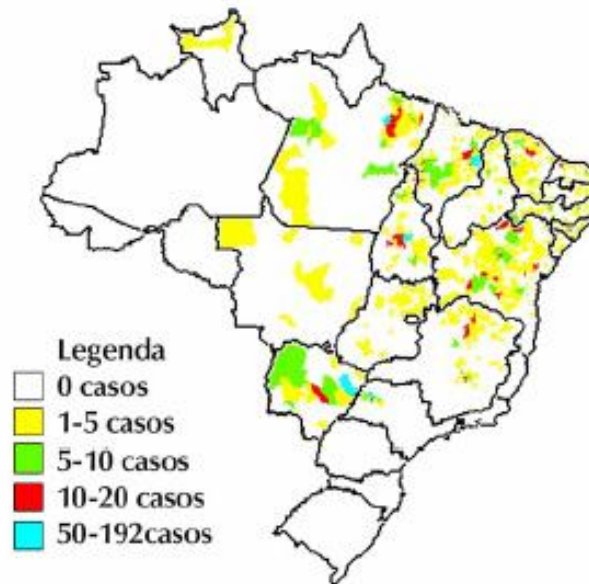


Figura 10: Distribuição da Leishmaniose Visceral no Brasil por municípios (2009).

Estratificação da média de casos de LV no Brasil.Fonte: (Brasil, 2009)

Segundo a Secretaria Estadual de Saúde, de 2001 a 2011, Pernambuco teve 1.224 casos da LV, com 100 mortes. Mais de 50% das ocorrências foram registradas no Sertão e 37,9% no Agreste. A Região Metropolitana do Recife e o litoral do estado somaram aproximadamente 10% dos registros. O estado tem altos índices de prevalência da doença e ocorrem registros de casos em todas as regiões geográficas. Chama à atenção a existência de um grupo endêmico, localizado na região Agreste, formado por municípios como Altinho, Caruaru, Riacho das Almas, São Caetano e Surubim, onde se concentra número significativo de casos. Nas outras regiões do Estado, merecem destaque os municípios de Salgueiro (Sertão), Petrolina (Sertão do São Francisco), Itamaracá (Região Metropolitana de

Recife) e Goiana (Zona da Mata) (Dantas-Torres e Brandão-Filho, 2005; Sinan, 2011; Brasil, 2011).

A migração tem atuado como a principal causa da disseminação da LV e da ocorrência de sérias epidemias que afetam principalmente crianças. Como provável resultado da migração de trabalhadores rurais para os centros urbanos, em busca de melhores oportunidades e condições de vida, foi se formando um ambiente favorável à propagação da doença com o auxílio dos principais fatores de risco: migração de pessoas não-imunes e infectadas, urbanização descontrolada, fraca infra-estrutura sanitária, aumento do número de co-infecções HIV-*Leishmania*, aumento da densidade do vetor transmissor e manutenção dos parasitos através de reservatórios animais (W.H.O., 2002; Campino e Maia, 2010).

Entre os casos notificados anualmente há razões para acreditar em um percentual importante de sub-notificação, principalmente nos casos que não exibem a forma clássica da LV. Estima-se que as infecções assintomáticas sejam 5-20 vezes mais frequentes do que as formas clínicas (Bepa, 2009; Brasil, 2011). Desta forma, a LV constitui um crescente problema de saúde pública, cuja incidência, inicialmente silvestre ou concentrada em pequenas localidades rurais, vem adquirindo nos últimos anos perigosas características urbanas, sendo atualmente notificadas em cidades de médio e grande porte.

2.6. Tratamento da Leishmaniose Visceral humana e canina.

A primeira linha de tratamento contra a LVh é predominantemente baseada nos compostos antimoniais pentavalentes (Sb+5), sendo o tratamento clássico utilizado em áreas endêmicas. Nos últimos anos, doses progressivamente maiores dos antimoniais têm sido recomendadas pela OMS e pelo Centro de Controle de Doenças (CDC) dos Estados Unidos da América, devido ao aparecimento de resistência primária do parasito a essas drogas, principalmente em países como Sudão, Quênia e Índia. Antes de iniciar o tratamento dos pacientes alguns cuidados devem ser observados, entre eles: avaliação e estabilização das condições clínicas e tratamento das infecções concomitantes (Bhattacharya *et al.*, 2006^a; Bhattacharya *et al.*, 2006^b; Santos, *et al.*, 2008).

A segunda linha de tratamento adotada inclui drogas como a anfotericina B e a pentamidina, caracterizadas pela alta eficácia, custo elevado e diversos efeitos colaterais. Recentemente, novas formulações da anfotericina B (anfotericina-B-lipossomal e anfotericina-B-dispersão coloidal) tornaram-se disponíveis comercialmente como também uma droga oral (miltefosine) vem sendo utilizada na Índia, com resultados promissores no tratamento do calazar indiano (Chapuis *et al.*, 2007; Croft e Oliarro, 2011;). A escolha de cada um deles deverá considerar a faixa etária, presença de gravidez e comorbidades.

O antimonial pentavalente tem a vantagem de poder ser administrado no nível ambulatorial, o que diminui os riscos relacionados à hospitalização. A anfotericina B é a única opção no tratamento de gestantes e de pacientes que tenham contraindicações ou que manifestem toxicidade ou refratariedade relacionada ao uso dos antimoniais pentavalentes. Esta é a droga leishmanicida mais potente disponível comercialmente, com ação nas formas promastigotas e amastigotas, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Mishra *et al.*, 1994; Thakur e Narayan,

2004). A experiência clínica acumulada com seu uso no tratamento da LVh vem aumentando ao longo dos últimos anos. Tem sido demonstrado que doses menores do medicamento podem ser utilizadas sem prejuízo da eficácia, com consequente diminuição de sua toxicidade (Carvalho, 2000; Costa *et al.*, 2007; Singh, *et al.*, 2012).

O tratamento de cães não é uma medida recomendada, pois não diminui a importância do cão como reservatório do parasito. As tentativas de tratamento da LV canina, por meio de drogas tradicionalmente empregadas (antimoniato de meglumina, anfotericina B, isotionato de pentamidina, alopurinol, cetoconazol, fluconazol, miconazol, itraconazol), tem tido baixa eficácia e, apesar de diminuírem sintomas clínicos temporariamente e até curar cães clinicamente, nenhuma delas realmente elimina a infecção (Noli e Auxilia, 2005; Plevraki, 2006; MIRÓ *et al.*, 2008). Além disso, o uso rotineiro de drogas em cães não previne a ocorrência de recidivas, tem efeito limitado na infectividade de flebotomíneos e levam ao risco de selecionar parasitos resistentes às drogas utilizadas para o tratamento humano (Ministério Da Saúde, 2006; Ikeda-Garcia, *et al.* 2007; Miró *et al.*, 2008).

Os critérios de cura são essencialmente clínicos e os primeiros sinais de resposta costumam ser inespecíficos como a melhora do apetite e do estado geral. O desaparecimento da febre acontece entre o segundo e o quinto dia de tratamento. O ganho ponderal e a redução do volume do baço e do fígado podem ser verificados nas primeiras semanas, embora a regressão total possa levar alguns meses. Os parâmetros hematológicos melhoram a partir da segunda semana. O processo de normalização das proteínas séricas ocorre de forma lenta, podendo durar meses. Com evolução clínica favorável, o controle

parasitológico é dispensável e o paciente tratado deve ser acompanhado durante seis meses (Noli e Auxilia, 2005; Miró *et al.*, 2008).

2.7. Desenvolvimento de vacinas contra as Leishmanioses.

Entre as doenças causadas por parasitas, as Leishmanioses se enquadram entre aquelas que apresentam melhores possibilidades de serem controladas através de vacinas, devido ao ciclo de vida relativamente simples do parasito e ao fato de que a recuperação de uma infecção primária culmina com a resistência do hospedeiro às infecções subsequentes. Muitas pesquisas têm sido realizadas para o desenvolvimento de uma vacina efetiva contra as Leishmanioses, incluindo a utilização de parasitas mortos ou atenuados, proteínas recombinantes de *Leishmania* e vacinas de DNA, como também o uso de imunomoduladores derivados da saliva do inseto vetor (Khamesipour *et al.*, 2006; Kedzierski *et al.*, 2006; Evans E Kedzierski, 2012).

As vacinas conhecidas como sendo de primeira geração são produzidas através da imunização com parasitos mortos ou lisados destes obtidos através de diferentes técnicas. Apesar de garantir alguma proteção essas vacinas carecem de padronização e apresentam um custo elevado pela manutenção dos parasitos (Palatinik-De-Souza, 2008).

As vacinas de segunda geração incluem: aquelas obtidas de parasitos geneticamente modificados; bactérias e vírus recombinantes expressando proteínas de *Leishmania*; frações purificadas dos parasitos; e aquelas que fazem uso de antígenos recombinantes (Souza, 1994; Kedzierski *et al.*, 2006). Dentre

estas vacinas destacam-se as vacinas LiESAp-MDP, FML e Leish111 (Palatinik-De-Souza, 2008).

A vacina LiESAp-MDP consiste de uma proteína de 54kDa obtida de *L. infantum* e testada em cães com LV. Apesar de apresentar uma eficácia de 92% contra a infecção a vacina não mostrou resultados relevantes quanto à diminuição dos sintomas da doença ou prevenção da morte dos cães (Lemesre *et al.*, 2005; Lemesre *et al.*, 2007). A vacina Leish111f é formada por três antígenos distintos de *Leishmania*, tendo sido testada em camundongos, cães e humanos, e se mostrou segura e imunogênica, apesar de também não conferir total prevenção quanto à infecção ou retardar a progressão da doença (Coler *et al.*, 2002; Coller *et al.*, 2007). A vacina FML (fucose-manose-ligante) é formada por um complexo antigênico de promastigotas de *L. donovani* que, adicionada de saponina, torna-se a vacina Leishmune[®] contra a Leishmaniose Visceral canina (Palatinik-De-Souza *et al.*, 2004; Oliveira-Freitas *et al.*, 2006). Esta vacina foi recentemente licenciada no Brasil e está disponível comercialmente, sendo a única vacina contra LV canina registrada do mundo com potencial de proteção contra a doença. A formulação da vacina mostrou-se segura, confere proteção e é altamente imunogênica em cães. Uma segunda vacina, Leish-Tec contra LV canina, também foi registrada no Brasil em 2007. Esta consiste de uma partícula de adenovírus que expressa o antígeno A2 de *L. donovani*. Os resultados a partir de ensaios de Fase III demonstram que a proteína recombinante A2 confere proteção em infecções experimentais, é capaz de reduzir cargas parasitárias e induzir respostas de tipo Th1 em camundongos. Apesar do ótimo desempenho a vacina não protege os cães 100% contra infecção e ainda não se apresenta

disponível para imunização contra LV humana (Fernandes, *et al.*, 2008; Resende, *et al.*, 2008; Araújo *et al.*, 2009; Kedzierski, 2011).

As vacinas de terceira geração compreendem as vacinas de DNA, sendo mais estáveis que as anteriores descritas além de apresentar baixo custo na produção e flexibilidade para a combinação de múltiplos genes. Muitos antígenos recombinantes descritos foram testados como vacinas de DNA apresentando certo grau de proteção contra infecção (Melby *et al.*, 2001; Sukumaram *et al.*, 2003; Basu *et al.*, 2005).

Apesar dos resultados promissores nenhuma das vacinas descritas até o momento apresenta 100% de eficácia contra a infecção ou cura da Leishmaniose Visceral canina e humana. Assim os resultados obtidos até o momento com a vacinação não demonstram a eficácia esperada e a proteção obtida com essas vacinas nas mais variadas formulações é muito baixa em relação ao que se espera de uma resposta vacinal. A busca por moléculas do parasito que sejam potencialmente imunogênicas e possam ser utilizadas na formulação de vacinas seguras e eficazes tem sido a tônica das pesquisas atuais. (Palatinik-De-Souza, 2008; Araujo, *et al.*, 2009; Evans e Kedzierski, 2012)

2.8. Técnicas de diagnóstico para as Leishmanioses.

O diagnóstico precoce das Leishmanioses é fundamental para o controle das complicações da doença. Apesar de ser um diagnóstico complexo, visto que algumas doenças compartilham sintomatologia similar e que os parasitas apresentam-se sequestrados no baço, linfonodos e medula óssea, diferentes

técnicas podem ser utilizadas para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral humana e canina (Ministério Da Saúde, 2006; Singh, 2006).

2.8.1. Demonstração (microscópica) e isolamento do parasito (cultura).

O diagnóstico preliminar das Leishmanioses é baseado em alguns critérios clínicos auxiliados pelo conhecimento epidemiológico sobre a doença e sintomas da LT, com presença das lesões cutâneas, e da LV, como esplenomegalia, hepatomegalia e febre alta irregular. Entretanto, esse tipo de diagnóstico para ser conclusivo leva em consideração o diagnóstico parasitológico, sendo este o método diagnóstico mais comumente utilizado para confirmação do diagnóstico das Leishmanioses (Singh, 2006).

Para identificação da forma tegumentar é feita pesquisa parasitológica das próprias lesões. Já para a LV a punção aspirativa esplênica é o método que oferece maior sensibilidade (90-95%) para demonstração do parasito (porém apresenta restrições quanto ao procedimento), seguida pelo o aspirado de medula óssea, biópsia hepática e a aspiração de linfonodos. Por ser um procedimento mais seguro, recomenda-se a punção aspirativa da medula óssea (Sundar *et al.*, 1991; Sundar e Rai, 2002).

O material aspirado deverá ser examinado segundo a sequência seguinte:

Exame Direto: Formas amastigotas do parasito podem ser visualizadas pelas colorações de Giemsa ou Wright, Leishman, Panóptico (Figura 11). A identificação de parasitos no material examinado depende do número de campos observados (200 campos devem ser examinados antes de se

considerar uma lâmina como negativa) (Desjeux, 2004a; Murray *et al.*, 2005; Tdr, 2002; Singh, 2006).

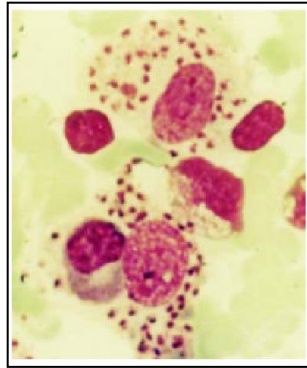


Figura 11: Microscopia identificando a presença de parasitos. Através de coloração simples e direta é possível visualizar as formas amastigotas do parasito por exame direto, como na figura acima. Fonte: http://www.spdl.scot.nhs.uk/Pictures/Leishmaniasis_c.jpg

Isolamento em meio de Cultura (in vitro): Formas amastigotas do parasito, inoculadas em meios de cultura especiais, contendo ágar e sangue de coelho, modificam-se em formas promastigotas. O clássico meio de NNN é o mais comumente empregado. As culturas devem ser mantidas entre 24 e 26°C e observadas em microscopia óptica comum ou invertida, semanalmente, até quatro semanas. Os tubos positivos devem ser encaminhados para laboratórios de referência para identificação da espécie (Ministério Da Saúde, 2006; Singh, 2006).

Apesar de ser um procedimento bastante invasivo o diagnóstico da LV através da demonstração do parasito, por aspirados ou biópsia, continua sendo considerado o padrão ouro devido à inexistência de melhores alternativas (Tdr, 2002; Desjeux, 2004a; Murray *et al.*, 2005). Os últimos avanços no método de cultura parasitária incluem o desenvolvimento de um método de microcultura mais sensível (Allahverdiyev *et al.* 2005) e o isolamento de células de sangue periférico

a fim de também aumentar a sensibilidade do diagnóstico baseado em cultura (Maurya *et al.* 2010).

2.8.2. Diagnóstico Molecular por PCR.

O diagnóstico da LV pode ser realizado também através da técnica chamada Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – do inglês “Polymerase Chain Reaction”). Esta técnica apresenta uma alta sensibilidade e detecta e identifica o DNA do parasito em qualquer amostra clínica, produzindo um resultado confiável em poucas horas (Ikonomopoulos *et al.*, 2003; Leonidas *et al.*, 2002).

Diferentes sequências de DNA do genoma de *Leishmania* como locus gp63, sequência telomérica, ambas as regiões dos minicírculos do DNA do kinetoplasto, genes do RNA ribossomal, repetições genômicas, região do gene da B-Tubulina , região espaçadora interna (ITS) entre outras, já foram documentadas no uso para o diagnóstico e prognóstico da Leishmaniose Visceral (Dey e Singh, 2007; KUHLS *et al.* 2007; Seridi, *et al.*, 2008; Chargui, *et al.*, 2009; KUHLS *et al.*, 2011).

O diagnóstico da LV usando métodos de PCR convencional tem evoluído em: aumento da sensibilidade com otimização dos protocolos e detecção dos parasitos mesmo antes dos sintomas clínicos; aplicação em uma grande variedade de materiais clínicos como sangue periférico, medula óssea, linfonodos, soro, pele, urina e etc; no uso da PCR para monitoramento da carga parasitária e tipagem das espécies (Srivastava *et al.*, 2011). Como prova diagnóstica esta técnica é altamente sensível e específica, porém atualmente só é possível a sua realização em laboratórios de pesquisa não estando ainda disponível nos LACEN

(Laboratório Central de Saúde Pública) (Desjeux, 2004a; Gontijo e Melo, 2004; Srivastava *et al.*, 2011).

2.8.3. Diagnóstico por métodos sorológicos da Leishmaniose Visceral.

Outras formas de diagnóstico da Leishmaniose Visceral utilizam técnicas imunológicas para detecção de imunoglobulinas (anticorpos) anti – Leishmania, através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), da técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA) e do teste de aglutinação direta (TAD) (Desjeux, 2004a; Murray *et al.*, 2005; Oliveira *et al.* 2012; Srividya, *et al.*, 2012).

No Brasil, os testes mais utilizados no diagnóstico de LV humana e canina são a ELISA e a RIFI, sendo este o mais utilizado para imunodiagnóstico de Leishmaniose Visceral por ser um pouco mais sensível que o ELISA. Recentemente o ministério da saúde também aprovou o teste imunocromatográfico baseado em ouro coloidal da Biomanguinhos (DualPathPlatform(DPP®) que usa os antígenos recombinantes rK26/rK39 de *L. infantum* (Grimaldi *et al.*, 2012) .

O resultado da imunofluorescência indireta é normalmente expresso em diluições. Aceitam-se como positivas diluições a partir de 1:80. Nos títulos iguais a 1:40, recomenda-se a solicitação de uma nova amostra em 30 dias. O teste ELISA tem o seu resultado expresso em unidades de absorbância a um raio de luz, em uma reação com diluições fixas ou mais comumente, apenas como reagente ou não. Na presença de dados clínicos e laboratoriais, um teste sorológico reagente, reforça o diagnóstico de Leishmaniose Visceral. Entretanto, um teste reagente, na ausência de manifestações clínicas sugestivas de

Leishmaniose Visceral, não autoriza o início do tratamento (Ministério Da Saúde, 2006).

Apesar de amplamente utilizados, os testes sorológicos atualmente disponíveis apresentam sensibilidade e especificidade limitadas, visto que os antígenos utilizados nestes testes diagnósticos são quase sempre derivados de promastigotas mantidas em cultura (RIFI: parasitos intactos fixados a lâmina, e ELISA: moléculas solúveis proveniente do lisado do parasito). Além disso, essas técnicas possuem também limitações de uso, pois os anticorpos podem permanecer presentes após o tratamento (cicatriz sorológica), não permitindo avaliação de resposta terapêutica. De forma geral apresentam uma composição complexa e podem apresentar reações cruzadas com outras espécies da família *Trypanosomatidae*, e mesmo com outros microrganismos tais como: *Mycobacteria*, *Plasmodium* e *Schistosoma*. Estes testes também vêm se tornando inapropriados na medida em que se busca o desenvolvimento e a implantação de uma vacina eficaz para a LV, pois testes sorológicos compostos por extratos ou parasitos fixados não conseguirão diferenciar os cães vacinados dos cães naturalmente infectados, decorrente do fato de ambos apresentarem reação positiva (Ahmed *et al.*, 2003; Sundar e Ray, 2002; Dourado, *et al.*, 2007; Marcondes, *et al.*, 2013).

2.8.3.1. Utilização de Antígenos recombinantes em diagnóstico sorológico.

O estudo detalhado de proteínas recombinantes de *Leishmania* com a finalidade de aperfeiçoar os métodos diagnósticos e, se possível, desenvolver uma vacina para a LV humana e canina, tem sido o foco de trabalhos de pesquisa

de inúmeros grupos, no Brasil e em outros países. Uma das linhas de pesquisas mais promissoras nesse sentido é a que utiliza proteínas recombinantes, obtidas a partir de sua expressão em bactérias transformadas com genes de *Leishmania*. O cultivo de bactérias em escala industrial apresenta inúmeras vantagens em relação ao cultivo de *Leishmania*, tais como: meio de cultivo simplificado, necessidade de poucos antibióticos para seleção das bactérias transformadas, crescimento mais rápido e ausência da necessidade de manutenção de cepas infectivas em animais experimentais, além de serem altamente reprodutíveis quanto à produção do antígeno (Ahmed *et al.*, 2003; GONTIJO E MELO, 2004; Kubar e Fragaki, 2005; Dourado *et al.*, 2007).

Alguns antígenos considerados para o diagnóstico da LV são o recombinante A2 e o rk39 e os antígenos, recombinantes ou purificados, derivados das glicoproteínas de membranas gp63, gp70, gp72, todas específicas do gênero *Leishmania*. A proteína A2 é expressa em amastigotas como uma família de proteínas que apresenta um número de repetições de dez aminoácidos e estudos sugerem que a proteína recombinante A2 é particularmente útil para o diagnóstico da LV canina (Zhang *et al.*, 1996; Carvalho *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2008). Já os antígenos recombinantes ou purificados gp63, gp72, gp70, melhoram a sensibilidade e a especificidade dos ELISAs, entretanto, reações cruzadas com enfermidades causadas por outros tripanossomatídeos podem ainda ocorrer (Alves e Bevilacqua, 2004; Dourado *et al.*, 2007). Alguns destes antígenos já se encontram disponíveis para o diagnóstico da LV humana e canina, como por exemplo o rk39, específico para as espécies do complexo *L. donovani* (Reed *et al.*, 1990; Gontijo E Melo, 2004). Esse antígeno, quando empregado no ELISA,

mostrou uma alta especificidade e sensibilidade para o diagnóstico da LV humana (da ordem de 90%) (Chappuis *et al.*, 2007; Maia *et al.*, 2012).

A proteína recombinante K39 (utilizada nas reações de ELISA), que é parte de uma proteína dominante de *L. infantum*, contém 39 aminoácidos repetidos sequencialmente. Em 1998 foi adaptada para um teste imunocromatográfico por Badaró 2, recebendo o nome de TRALd (Teste Rápido Anticorpo *L. donovani*). O TRALd não apresentou reação cruzada com Leishmaniose Cutânea, Doença de Chagas, tuberculose, hanseníase e esquistossomose. A sensibilidade foi de 92% e a especificidade de 99,5% quando o teste foi realizado em cães de áreas endêmicas, no entanto, não foi capaz de detectar infecção em animais com títulos de RIFI de 1:40 a 1:320 (13). Além disso, o próprio grupo que descreveu o K39 apressou-se em somar ao TRALd um outro antígeno, o K26, como forma de corrigir a sensibilidade do seu ensaio, haja visto que o K39 apenas identifica casos de LV ativa, deixando de reconhecer as formas assintomáticas da infecção (Chappuis *et al.*, 2006, 2007; Srivastava *et al.*, 2011).

De forma geral os testes desenvolvidos com proteínas recombinantes possuem alta especificidade, porém apresentam sensibilidades variáveis quando testados em diferentes áreas endêmicas. Fato que ocorre provavelmente pelas diferentes cepas do parasito e pela variabilidade genética entre os indivíduos. Além disso, antígenos aparentemente promissores para o diagnóstico da LV humana, não são eficientes para a identificação de cães infectados e vice-versa. Tendo em vista a diversidade da resposta imune humoral gerada durante a infecção pela *L. infantum*, alguns destes testes não são capazes de identificar uma infecção assintomática de uma clinicamente ativa, e os resultados persistem

positivos vários anos após a cura clínica dos pacientes (Evans e Kedzierski, 2011; Kaye e Aebischer, 2011; Oliveira *et al.*, 2011; Srivastava *et al.*, 2011).

2.8.3.2. Antigenicidade e sequências repetitivas.

Uma característica observada em parte dos antígenos recombinantes utilizados em testes diagnósticos ou vacina contra a LV é a presença de motivos repetitivos ao longo da sequência proteica. Genes que codificam para proteínas com domínios repetitivos, definidos aqui como genes que apresentam duas ou mais sequências repetidas em *tandem*, já foram encontrados em uma variedade de organismos, desde procariotos a animais superiores (Katti, *et al.*, 2000; Verstrepen, *et al.*, 2005; Goto, *et al.*, 2007). Estas repetições em *tandem* (RT) estão em evidência normalmente em proteínas de superfície e estruturais da célula (Katti, *et al.*, 2000; Verstrepen, *et al.*, 2005). No caso dos tripanossomatídeos, proteínas com RTs previamente caracterizadas incluem ainda transialidases, proteínas ribossômicas, proteínas de flagelo e a proteína citoplasmática CRA, que não parecem compartilhar estas ou outras características funcionais. Além disso, as funções de muitas das proteínas contendo RTs nestes organismos permanecem desconhecidas, devido a uma falta de caracterização sistemática (Lafaille, *et al.*, 1989; Burns, *et al.*, 1992; Pais, *et al.*, 2008).

Embora as funções das proteínas com RTs sejam díspares e não se limitem a uma única classe proteica e propriedades em comum como uma mesma co-expressão ou co-localização celular também não sejam consistentemente observadas, uma característica que parece ser compartilhada é que elas são

frequentemente potentes ativadoras de linfócitos do tipo B. A importância imunológica destes motivos repetitivos em infecções bacterianas já foi relatada previamente, assim como em resposta a protozoários e até mesmo em alguns antígenos de câncer, em que pacientes apresentam respostas de anticorpos contra estes domínios (Allred *et al.*, 1990; Bhatia, *et al.*, 1999; Gomes *et al.*, 2008; Valiente-Gabioud, *et al.*, 2011).

Atualmente um grande número de proteínas com motivos repetitivos de *Leishmania sp.* tem sido identificadas, muitos dos quais a partir de buscas em bancos de sequências genômicas de espécies deste protozoário, demonstrando serem bastante antigênicas e capazes de gerar resposta imune (Goto *et al.*, 2008; 2010; Kringelum, *et al.*, 2012). Entretanto pouco se sabe sobre boa parte destas proteínas, descritas como hipotéticas, desde características quanto a sua função e localização celular, nível de expressão ou descrição de regiões antigênicas. Apesar disso, vários antígenos repetitivos de diferentes massas moleculares têm sido investigados com a finalidade de aprimorar os testes sorológicos (Goto *et al.*, 2008; 2010; Valiente-Gabioud, *et al.*, 2011; Kringelum, *et al.*, 2012)..

2.9. Novos antígenos de *L. infantum* com potencial uso no diagnóstico da Leishmaniose Visceral.

Em trabalho que precedeu a presente Tese de Doutorado, com o intuito de se identificar novas moléculas antigênicas com potencial para uso no diagnóstico sorológico contra a Leishmaniose Visceral humana e canina, diferentes bibliotecas de expressão de *Leishmania infantum* foram rastreadas com soros de

animais e/ou pacientes com Leishmaniose Visceral. Um total de 13 clones codificando para proteínas diferentes foram selecionados, sendo que algumas destas proteínas foram identificadas como novas e/ou hipotéticas, com ou sem homólogos entre outras espécies de tripanosomatídeos pertencentes ao gênero *Trypanosoma*. Várias destas proteínas se destacaram por apresentarem um grande número de motivos repetitivos em sua sequência, sendo que motivos distintos foram identificados nas diferentes proteínas e não se observou elementos em comum entre as mesmas em relação a possíveis funções. Em etapas prévias (em parte realizadas durante a dissertação de mestrado da doutoranda), foi iniciado o processo de caracterização de algumas destas proteínas selecionadas, a partir da geração de ferramentas necessárias para seu estudo e/ou avaliação do seu potencial no diagnóstico da Leishmaniose Visceral. Neste sentido as mesmas foram expressas em *Escherichia coli*, como proteínas recombinantes fusionadas a uma sequência de poli-histidinas, e utilizadas na produção de soro policlonal específico a partir da sua imunização em coelhos. Dados preliminares de avaliação de seu potencial no diagnóstico da Leishmaniose Visceral também foram realizados e se mostraram promissores. Apesar destes resultados, entretanto, pouco ou nada se sabia sobre as proteínas hipotéticas identificadas bem como seu papel biológico no parasito vivo.

Esta Tese de Doutorado teve por objetivo maior contribuir no aperfeiçoamento de técnicas de diagnóstico sorológico da Leishmaniose Visceral, com o estudo de novas moléculas antigênicas identificadas, gerando ainda resultados que possam contribuir para se entender melhor a biologia do parasito, *Leishmania*, e as características que tornam essas proteínas tão antigênicas. O potencial diagnóstico de proteínas selecionadas também foi melhor avaliado, por

meio de reações imunoenzimáticas indiretas frente a soros de cães e humanos com LV. Os dados sobre algumas destas análises foram redigidos em trabalho já publicado (OLIVEIRA *et al*, 2011), enquanto as demais estão sendo incluídas em dois outros trabalhos em fase de finalização para publicação.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar novas proteínas de *Leishmania infantum*, que possuem importância para o desenvolvimento de teste diagnóstico, localizando e apontando quais estruturas ou motivos são responsáveis pelo desenvolvimento de resposta imune no hospedeiro vertebrado, como também, contribuir na ampliação das informações do projeto genoma da *L. infantum*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar as proteínas hipotéticas Lci5, Lci9, Lci10, Lci11 e Lci12 quanto ao seu grau de conservação em *Leishmania* sp. e *Trypanossoma* sp.
- Analisar a expressão destas mesmas proteínas nos parasitas selvagens em diferentes fases de seu ciclo de vida.
- Determinar a localização subcelular destas cinco proteínas nas duas fases do ciclo de vida de *L. infantum*.
- Analisar os motivos repetitivos das proteínas Lci10 e Lci12, e de outra proteína, Lci2 , previamente identificada em outros trabalhos, através de ferramentas de bioinformática e posteriormente testar isoladamente a importância destes motivos na resposta imune humoral de seres humanos e cães infectados com *L. infantum*.

4. METODOLOGIA

4.1 Cultivo de parasitos.

A manutenção das formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum* (MHOMMA#67#ITMAP-263) e *L. chagasi* (MHOM/BR2000/Merivaldo2, 2240) foi realizada em meio Schneider (pH 7,4 e 5,5 respectivamente), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), antibióticos (Estreptomicina/Penicilina 0,1%) e Hemina 0,1%, em volumes de aproximadamente 3 ml, a 26°C e 37%. Os extratos totais do parasito foram obtidos a partir de culturas quantificadas em fase exponencial de crescimento (cerca de 2×10^7 células por ml), das quais as células foram coletadas por centrifugação (1000 g/5 minutos/4°C) e o sedimento ressuspensão em tampão para eletroforese de proteína SDS-desnaturante (Laemmli 2X). Para a análise foram utilizadas concentrações de 10^6 células/ μ l. A preparação dos extratos das curvas de crescimento (De 0h à 144h) e dos outros tripanossomatídeos estudados foi obtida da mesma forma descrita acima.

4.2 Purificação dos anticorpos por imunoadsorção.

Soros produzidos, em coelhos, contra as diferentes proteínas em estudo foram purificados através da técnica de imunoadsorção, onde as respectivas proteínas recombinantes foram fracionadas em gel SDS-PAGE 15% e transferidas para membrana PVDF (Immobilon-P – Millipore®). Após a transferência, a membrana foi corada com 0,2% Rouge Ponceau / 1% TCA onde a banda correspondente a proteína de interesse foi excisada da membrana e

cortada em pequenos pedaços colocados em tubo de 1,6 ml. Após o bloqueio de 30 minutos em solução de PBS com leite 1% e Tween-20 a 0,05%, o soro foi adicionado numa diluição de 1:1 com PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na_2HPO_4 , 1,47 mM KH_2PO_4 pH7.3) e deixado sob agitação durante aproximadamente 18 horas, a 4°C. A eluição dos anticorpos foi conseguida através da utilização de 200 ml da solução de glicina ácida 0,1 M (pH 2,5) com vigorosa agitação do tubo durante 5 minutos, seguida da neutralização do pH por adição de 20 ml de TRIS 1M pH 8,0 e 200 ml de PBS duas vezes concentrado. Os anticorpos purificados foram então utilizados em ensaios de “Western-Blot” utilizando diluições seriadas das respectivas proteínas recombinantes quantificadas.

4.3 Ensaios de “Western-blot”.

Os soros produzidos contra as proteínas selecionadas (já disponíveis) e purificados foram utilizados em ensaios de “Western-Blot” onde as proteínas recombinantes, e/ou extratos de parasitas, foram fracionadas em gel SDS-PAGE 15% e transferidas para membranas de PVDF (Immobilon-P – Milipore) para realização de ensaios de detecção utilizando anticorpos específicos. As membranas foram então bloqueadas em solução de TBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl pH7.5), 5 % de leite desnatado e 0,05% de Tween-20 a temperatura ambiente sob agitação por 1 hora. Em seguida as membranas foram incubadas com os diferentes soros totais ou anticorpos imunopurificados em diluições pré-definidas em solução de TBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl pH7.5), 5 % de leite desnatado e 0,05% de Tween-20 a temperatura ambiente sob agitação por 1

hora. Após três lavagens de 10 minutos com TBS e 0,05% de Tween-20 estas membranas foram incubadas com o segundo anticorpo (anti-IGg de coelho conjugado a peroxidase), numa diluição de 1:7.500 em solução de TBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl pH7.5), 5 % de leite desnatado e 0,05% de Tween-20 a temperatura ambiente sob agitação por 1 hora. Após novas lavagens com TBS as membranas foram incubadas por 2 minutos a temperatura ambiente com uma solução contendo 1,2 mM de Luminol, 0,4 mM de Iodofenol (diluído em DMSO) e 0,03% de peróxido de hidrogênio para a reação de quimioluminescência (ECL). As membrana foram secas com papel de filtro e expostas a filme específico para ECL (GE-Healthcare), em intervalos de 5 e 1 minutos. Os filmes foram revelados em solução de dektol 1:2, seguido de fixação em ácido acético.

4.4 Imunofluorescência.

A Imunofluorescência foi realizada utilizando-se aproximadamente 5×10^6 células em cada reação. As células foram centrifugadas a 1600 g por 10 minutos a 25°C, lavadas com 1 mL de PBS e fixadas com paraformaldeído a 3% por 10 minutos a temperatura ambiente. As células foram novamente centrifugadas e colocadas em placa já contendo lamínula pré-fixada com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich). Após 15 minutos, foram feitas três lavagens de 5 minutos com PBS - Glicina 20 mM, seguido de permeabilização das células por incubação com 0,1% de Triton 100x (Sigma-Aldrich) na mesma solução, por 10 minutos. Em seguida as lamínulas foram lavadas três vezes por 5 minutos com PBS - Glicina 20mM e o bloqueio foi efetuado na mesma solução suplementada com BSA 1% por 20 minutos. Após o bloqueio seguiu-se a incubação com o primeiro anticorpo

purificado na diluição pré-definida por 1h a 37°C, seguido de três lavagens com PBS-Glicina 20mM - BSA 1% e em seguida adicionado RNase A 10 mM por 20 minutos, para degradar todo RNA presente na célula. Foram realizadas três lavagens com PBS - Glicina 20mM - BSA 1% para posterior incubação com o segundo anticorpo Alexa Fluor 488 diluído 1:500. Para a marcação do DNA foi utilizado o TOTO-3 (Molecular Probes) diluído 1:250 com PBS - Glicina 20mM - BSA 1%. As células foram incubadas no escuro por 1h a 37°C. Ainda no escuro, foram lavadas com PBS, secas e as lamínulas foram fixadas em laminas com 10 μ l de Prolong-gold e guardadas protegidas da luz em freezer. As células foram visualizadas em microscópio confocal utilizando o programa de microscopia Leica SPII-AOBS.

4.5 Imunocitoquímica.

A imunocitoquímica foi realizada utilizando-se aproximadamente 5×10^6 células. Estas foram centrifugadas a 1600 g por 10 minutos a 25°C, lavadas com tampão Cacodilato de sódio (0,1M, pH7,2) e fixadas em glutaraldeído 0,1%, paraformaldeído 4%, no mesmo tampão por 2 horas à temperatura ambiente ou 24 horas a 4°C. Após a fixação foram lavadas três vezes por 10 minutos cada com tampão Cacodilato de sódio e incubadas com solução de cloreto de amônio 50 mM em tampão PBS pH 7,2 por 1 hora a temperatura ambiente para bloqueio. Posteriormente foram lavadas três vezes por 5 minutos em PBS pH e desidratadas em soluções crescentes de etanol por 10 minutos (30%, 50%, 70%, 90%, 100%). As células foram então incubadas em soluções de etanol/ resina LRwhite (Sigma-Aldrich) em diluições de (2:1), (1:1), (1:2) e resina pura, cada

passo por uma noite, e a polimerização foi realizada a 37°C por 5 dias. Após polimerização foram obtidas secções ultrafinas da amostra (70nm) em ultramicrotomo LEICA. As grades com as secções foram incubadas em solução de cloreto de amônio 50 mM em PBS pH 8,0 por 45 minutos a 4°C e lavadas em solução de bloqueio (100 mM PBS, 1% BSA, 0,05% Tween-20) e incubadas nesta mesma solução por 1 hora a 4°C. Após bloqueio as amostradas foram incubadas com o 1° anticorpo específico, numa diluição pré-estabelecida na solução de bloqueio por 1 hora a 4°C. Posteriormente foram lavadas duas vezes em solução PBS pH 8,0 e solução bloqueadora e incubadas com 2° anticorpo anti IgG de coelho conjugadas com partículas de ouro 1:100 por 1 hora a 4°C. Após incubação foram lavadas em solução de PBS e 1% BSA, pH 8,0, e contrastadas em acetato de uranila 5% em água por 1 hora e citrato de chumbo 3 minutos. As amostras foram finalmente examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Morgagni D268, FEI.

4.6 Ensaio de purificação de fosfoproteínas

Utilizando-se o sistema “PhosphoProtein Purification Kit” (QIAGEN), foi possível obter a separação da fração de proteínas fosforiladas das proteínas não fosforiladas de lisados dos parasitos. Inicialmente, uma alíquota da cultura com 5×10^8 células foi lisada em tampão de lise fornecido pelo kit (25 mM MES, 1M NaCl, 0.25% CHAPS), contendo inibidores de proteases e nucleases e, então, incubada por 30 minutos a 4°C. Após o período de incubação, o lisado celular foi centrifugado a 10.000 g a 4°C durante 30 minutos e o sobrenadante foi coletado e quantificado através do método de Bradford. Um volume de 25 mL de lisado

contendo 0,1 mg/mL foi passado pela coluna, e, em sequência, a coluna foi lavada com tampão de lise. Em seguida, as proteínas fosforiladas foram eluídas utilizando-se o tampão de eluição de fosfoproteínas (fosfato de potássio 50 mM e NaCl 50 mM). Amostras da purificação foram fracionadas em SDS-PAGE e transferidas para membranas de PVDF para detecção das proteínas de interesse através de ensaios de “Western-blot”.

4.7 Fracionamento celular por ciclos de congelamento/descongelamento.

Para a obtenção das frações celulares, cerca de 2×10^8 células de culturas de fase de crescimento exponencial foram centrifugadas a 5000 g por 5 minutos e lavadas com PBS. As células foram então ressuspensas em 1 mL de tampão de lise (20 mM Hepes KOH pH 7.4, 5 mM acetato de potássio, 4 mM acetato de magnésio, 2 mM DTT) suplementado com inibidores de protease (ROCHE). A lise foi realizada por ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. Após cerca de cinco ciclos a lise foi monitorada por visualização ao microscópio óptico e, quando no caso de não ter sido eficiente, novos ciclos de congelamento/descongelamento foram realizados. Confirmada a ausência de células intactas, o produto da lise foi centrifugado a 10.000 g por 15 minutos. Posteriormente os sobrenadantes, correspondentes à fração de proteínas citoplasmáticas, assim como os sedimentos, correspondentes à fração de proteínas nucleares, ou associadas à membranas, das respectivas centrifugações, foram analisados por “Western-blot” com anticorpos policlonais disponíveis contra as proteínas. Os lisados foram aliquotados e estocados a -80°C .

4.8 Fracionamento celular por gradiente de Digitonina.

Para o fracionamento celular utilizando gradientes da toxina digitonina (SIGMA) foi utilizado o protocolo descrito por Foucher e colaboradores (2006) para *Leishmania* sp. Para isso foi utilizada cultura de células de 10 ml *L. infantum* até D.O. 0,5, centrifugadas por 5 minutos a 3000 rpm e 18°C. O sedimento foi lavado por duas vezes com 10 mL de PBS gelado e ressuspensão em 0,5 ml de tampão de ressuspensão (75mM TRis-HCl pH7.4, 145mM NaCl, 11mM KCl) acrescido de inibidor de protease (ROCHE). Foram realizadas então incubações com concentrações crescentes de digitonina (20 µM, 200 µM, 1 mM, 10 mM). Para cada incubação os sedimentos solubilizados em tampão de ressuspensão acrescido de inibidor de protease, e foram adicionados 0,5 ml da solução contendo digitonina (solução aquosa com 0,05% de metanol) por 5 minutos a 37 °C. Posteriormente foram adicionados 200 µL de uma solução de sacarose 0,3 M, no mesmo tampão de ressuspensão, e as células foram centrifugadas por 5 minutos a 13000 rpm e 4°C. Cada sobrenadante foi mantido, correspondendo a 4 frações solúveis e o sedimento final que correspondem respectivamente a: 2 frações de proteínas citoplasmáticas (cerca de 500 µg de proteínas); 2 frações de proteínas contidas em organelas (cerca de 200 µg e 150 µg); sedimento final contendo proteínas nucleares, de membrana ou associadas a mesma (cerca de 300 µg). Para análise cada fração foi fracionada em gel SDS-PAGE, utilizando 3 µg totais de cada fração, e submetidas a ensaios de “Western-blot”.

4.9 Subclonagem dos motivos repetitivos e purificação das proteínas recombinantes.

As proteínas recombinantes utilizadas para análise dos motivos repetitivos, Lci2ot, Lci10ot e Lci12ot, tiveram suas sequências otimizadas através do programa LETO quanto a otimização de códons preferenciais (“codon usage”) para expressão em eucariotos com finalidade da utilização das mesmas em vacinas de DNA e sintetizadas pela GENEART. Com a posse destas sequências, os insertos completos e suas regiões repetitivas ou não, foram subclonadas em vetores da série pRSET A (Invitrogen™), utilizando as respectivas enzimas de restrição (NEW ENGLAND Biolabsinc.). Uma vez confirmada a subclonagem dos insertos de interesse, as construções geradas foram utilizadas para transformar células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) pLys S por choque térmico. Para a transformação, as bactérias foram incubadas por 30 minutos a 4° C seguido de choque térmico a 37°C por 5 minutos com subsequente semeio das células transformadas em placa de petri contendo meio Agar LB (Luria Bertani) sólido na presença de ampicilina (100 µg/µL) e cloranfenicol (30µg/mL) e incubadas a 37°C por 18 horas. As colônias obtidas foram inoculadas em 20 mL de meio LB líquido contendo antibiótico, como descrito anteriormente, e foram crescidas a 37°C, sob agitação de 160 rpm por 18 horas. Para indução da expressão das proteínas recombinantes, alíquotas de 20 mL das culturas crescidas foram inoculadas em 250 mL de meio LB com os antibióticos e crescidas a 37°C sob agitação de 160 rpm, e o crescimento bacteriano foi acompanhado pela aferição em espectrofotômetro (comprimento de onda de 600 nm) até atingir uma densidade ótica (D.O.) entre 0,5 ou 0,8. Em seguida foi adicionado IPTG na concentração final de 0,1 mM e a cultura permaneceu sob agitação por 4 horas a 28°C (D.O. de

0,5) ou 1 hora a 25°C (D.O. de 0,8). Posteriormente à indução, os lisados de células foram centrifugados a 9600 g durante 10 minutos e o sedimento bacteriano obtido foi ressuspensão em 20mL de tampão de Lise (100 NaH₂PO₄, 10 Mm Tris, 8M Uréia, pH:8,0) e acrescido de inibidor de protease livre de EDTA, de acordo com as instruções do fabricante (ROCHE). Em seguida a lise das bactérias foi realizada através de ultra-sonicação (6 pulsos de 30 segundos com intervalos de 1 minuto), com posterior adição de 1% de Triton-X e centrifugação a 9600 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante pós lise foi incubado com 300 µL de resina Ni-NTA agarose (QIAGEN®) com adição de imidazol 20 mM. Esta foi previamente equilibrada em tampão de Lise, após três lavagens de 10 mL cada e imidazol 20 mM. A incubação foi realizada por 1 hora à temperatura de 4°C sob leve agitação. Após a incubação foi realizada uma centrifugação de 2500 rpm por dois minutos, descartado o sobrenadante e a resina foi lavada três vezes com tampão de Lavagem (100 NaH₂PO₄, 10 Mm Tris, 8M Uréia, 30 mM Imidazol, pH:6,0). As proteínas ligadas foram eluídas da resina através de duas lavagens de 20 minutos a 4 °C com tampão de Eluição (100 NaH₂PO₄, 10 Mm Tris, 8M Uréia, 1M Imidazol, pH:4,6). Para 10 µL de cada eluato e da resina foi acrescido igual volume de tampão de gel de eletroforese de proteínas (duas vezes concentrado), e 10 µL desta mistura fracionados em SDS-PAGE 15% e visualizados após coloração com azul de Comassie R-250.

4.10 Ensaio imunoenzimático (ELISA indireto) com antígenos recombinantes.

Após quantificação as proteínas recombinantes foram utilizadas para sensibilização de placas ("Cliniplate"), diluídas em tampão carbonato-bicarbonato (0,05M; pH 9,6), para uma concentração de 500ng / poço com volume de 100 µl por poço, permanecendo por 16 horas a 4°C em câmara úmida. Após incubação o conteúdo das placas foi desprezado por inversão e esta lavada por quatro vezes com 200 µl de PBS por poço. Em seguida foi realizado o bloqueio dos poços com 100 µl de PBS e 10% de leite desnatado e incubado em câmara úmida por 1 hora em temperatura ambiente. Os soros dos cães e humanos a serem testados foram diluídos em PBS Tween-20 0,05% acrescido de leite desnatado 10%, para uma diluição final de 1:200 e 1:900, respectivamente, em cada poço, e incubados por 1 hora a temperatura ambiente em câmara úmida. Realizou-se nova incubação com o conjugado (anti-IgG de cão ligado a peroxidase), durante 1 hora a temperatura ambiente em câmara úmida, numa diluição de 1:10000. Decorrido esse tempo foram realizadas novas lavagens seguida de revelação com substrato peróxido de hidrogênio, o cromógeno OPD (Ortofenilenediamino) mais tampão citrato-fosfato (0,1M, pH:5,0), numa concentração de 0,01% por 15 minutos, em câmara escura, sendo então interrompida a reação com 100 µl de ácido sulfúrico 2,5M por poço. A leitura foi realizada em filtro de 490 nm através do aparelho Bio-Rad (Modelo 3550) "Microplate Reader". Os parâmetros de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, negativo e intervalo de confiança foram estimados utilizando o programa *MedCalc* (versão 12.3). Para associação entre as variáveis e seus determinantes foram utilizados o teste do Qui-quadrado numa tabela de dupla

entrada (2x2) relacionando o diagnóstico da doença e o resultado do teste. A sensibilidade é dada pela porcentagem de positivos detectados pelo teste entre os indivíduos sabidamente doentes (parasitológico positivo), e a especificidade, pela porcentagem de negativos entre indivíduos não doentes. O gráfico de dispersão foi obtido através do programa *Prism* (versão 3.0).

4.11 Descrição dos soros utilizados nos ensaios imunoenzimáticos.

Para avaliação do potencial das proteínas recombinantes para uso em diagnóstico da LV humana, foi montado um painel de soros formados por dois grupos de soros distintos capazes de avaliar preliminarmente a sensibilidade e especificidade. O primeiro grupo foi composto por 50 soros obtido do grupo controle da soroteca do Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LAVITE), montada para o projeto de vacina da febre amarela. Estes soros são provenientes de indivíduos saudáveis residentes em área não endêmica da LV (área urbana da cidade do Recife), e foram gentilmente cedidos pelo Dr. Rafael Dhália. O segundo grupo foi composto por 50 soros de pacientes com LV com diagnóstico clínico e laboratorial (confirmado por exame parasitológico), gentilmente cedidos pelo Dr. Carlos Henrique Costa, da Universidade Federal do Piauí. Foram utilizados também 40 soros de pacientes com Doença de Chagas e 25 soros de pacientes com Leishmaniose Tegumentar cedidos pela Dra. Edileuza Brito do laboratório de imunoparasitologia do CPqAM.

Para avaliação das proteínas com soros caninos, foram utilizados 46 soros provenientes de cães acometidos com Leishmaniose visceral, oriundos do município baiano de Jequié (área endêmica para a LV), apresentando o teste de

cultura parasitológica positiva para *L. infantum*. Os outros 15 soros, provenientes de cães recolhidos de área não-endêmica (Salvador) e criados desde filhotes no Biotério Experimental do CPqGM, estavam sadios e sem contato prévio com *L. infantum*, apresentando teste de cultura parasitológica e sorológica negativos para o parasito. Estes soros foram cedidos gentilmente pelo Dr. Geraldo Gileno do CPqGM. Foram testados também 24 soros de cães provenientes da soroteca do laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, obtidos através de atendimento no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Esse grupo foi formado por cães que nunca habitaram em área endêmica para Leishmaniose, nunca receberam transfusão sanguínea, e que são portadores de outras doenças [demodicose (*Demodex canis*) e ehrlichiose (*Anaplasma platys*)], com exame parasitológico confirmado. Estes soros foram gentilmente cedidos pela Dra. Yara de Miranda Gomes.

Para cálculo do “Cut-Off” e determinação de soros positivos e negativos pelo ensaio foram utilizadas as médias das absorbâncias dos soros controle negativos, acrescidos de 3 desvios padrões.

5. RESULTADOS

Conforme descrito anteriormente, foram obtidas em trabalhos anteriores proteínas recombinantes de *Leishmania infantum* com potencial uso no diagnóstico da Leishmaniose Visceral, mas que são hipotéticas e praticamente desconhecidas do ponto de vista da sua função. Na presente Tese, a caracterização de cinco destas proteínas, denominadas Lci5, Lci9, Lci10, Lci11 e Lci12, foi abordada e será descrita individualmente em seus vários aspectos. Na etapa final deste trabalho será apresentada uma análise realizada com duas destas proteínas recombinantes (as Lci10 e 12), em conjunto com uma sexta proteína antigênica, a Lci2, caracterizada previamente, voltada a se investigar aspectos específicos de sua antigenicidade. Nesta análise, regiões diferentes das três proteínas foram produzidas em *Escherichia coli* a partir de genes sintéticos, de maneira a se poder avaliar quais, entre regiões repetitivas e não repetitivas componentes destas proteínas, são aquelas mais antigênicas para humanos e cães infectados com a *L. infantum*.

5.1 Caracterização e análise antigênica indireta da proteína Lci5.

5.1.1 Descrição do gene.

O gene que codifica para a proteína Lci5 corresponde ao gene identificado no banco de dados do TriTrypDb por LinJ.33.3230 que codifica para uma proteína hipotética conservada em *Leishmania* sp., sem informações disponíveis quanto a sua função. O gene apresenta uma sequência contínua de ~9,9 Kb e abaixo é possível visualizar uma representação esquemática dos primeiros ~4,5 Kb desta sequência codificadora na figura 12, demonstrando sua organização em

segmentos repetitivos de duas classes distintas. O cDNA Lci5, obtido da biblioteca, codifica para um trecho desta região englobando quatro dos domínios repetitivos de 148 aminoácidos, totalizando 2025 pb. Os dois polipeptídeos recombinantes obtidos neste trabalho, Lci5-A e Lci5-B, são derivados de fragmentos gênicos de 915 pb e 468 pb e consistem de duas cópias e uma, respectivamente, do segmento repetitivo da proteína, com a mesma extremidade N-terminal. Com exceção de alguns aminoácidos na porção C-terminal da repetição, os segmentos repetitivos de 148 aminoácidos são idênticos.

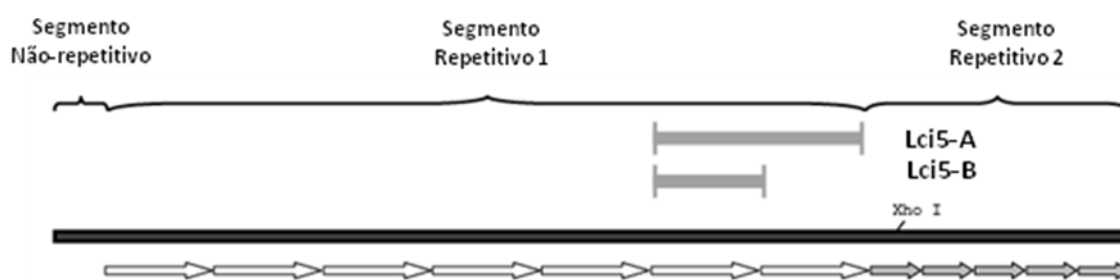


Figura 12: Esquema parcial do gene Lci5 e fragmentos recombinantes obtidos. O esquema mostra os insertos Lci5-A e Lci5-B obtidos a partir do cDNA da sequência parcial do gene Lci5 e as repetições existentes nesse gene.

Através de alinhamento da sequência da proteína Lci5 com seus prováveis ortólogos em outras espécies da família Trypanosomatidae, a sequência da proteína se mostrou conservada apenas entre as espécies de *Leishmania* sp. apresentando uma baixa similaridade em relação a *Trypanosoma* sp. Uma representação esquemática de parte do alinhamento pode ser visualizada na figura 13.

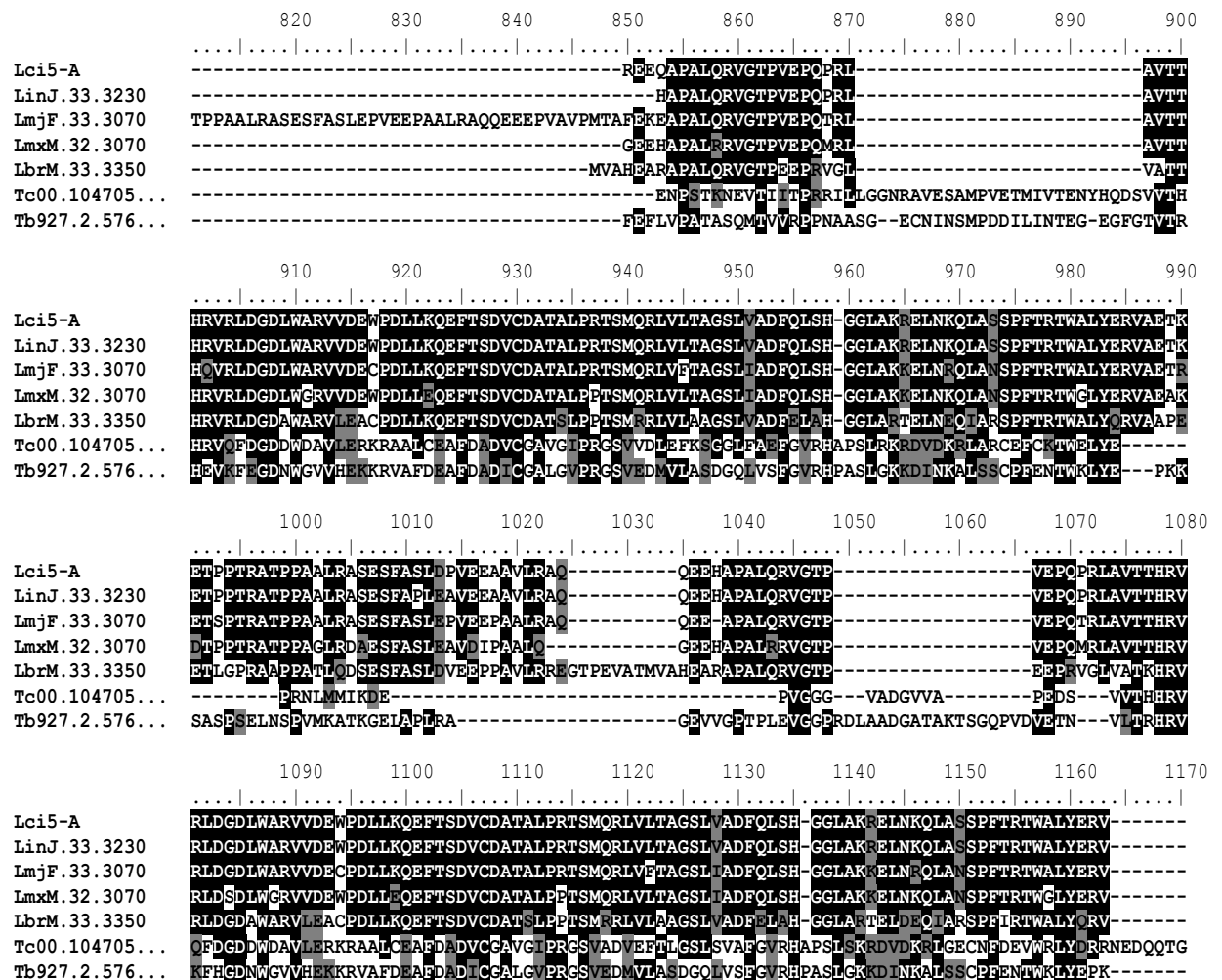


Figura 13: Alinhamento da proteína Lci5-A de *L. infantum* com seus prováveis ortólogos na família Trypanosomatidae: Esquema parcial do alinhamento da proteína Lci5 com a respectiva proteína de *L. infantum* e demais tripanossomatídeos. Lin - *L. infantum*; LmjF - *L. major*; LmxM - *L. mexicana*; LbrM - *L. braziliensis*; Tc00 - *T. cruzi*; Tb - *T. brucei*.

5.1.2 Determinação da localização subcelular da proteína Lci5.

Uma primeira etapa na caracterização experimental dessa e das demais proteínas em estudo foi a avaliação da sua expressão, utilizando-se soro policlonal específico produzido contra as respectivas proteínas recombinantes em etapa que precedeu este trabalho. No caso da Lci5, provavelmente devido ao fato da proteína apresentar um peso molecular muito elevado (cerca de 355 KDa), não foi possível avaliar sua presença em extratos de *L. infantum*, bem como sua

conservação em tripanossomatídeos por meio da técnica de “Western-Blot” nas condições descritas de metodologia, mesmo após adaptações para facilitar a visualização de proteínas de alto peso molecular. Com a disponibilidade de soro policlonal contra a proteína recombinante foi possível, contudo, determinar a localização da proteína por imunofluorescência. A proteína Lci5 apresentou um perfil de localização pontual/flagelar em *L. infantum* na forma promastigota do parasito bem como uma localização pontual na forma amastigota, na região correspondente ao resquício flagelar (Figura 14). Essa apresentação pode ser indicativa de proteínas presentes no bastão paraflagelar do parasito ou participantes de transporte intraflagelar.

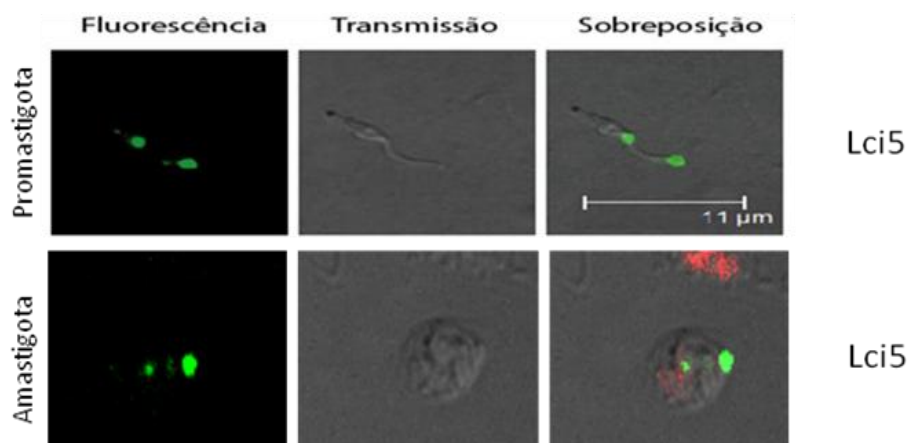


Figura 14: Localização subcelular da proteína Lci5 em *L. infantum*. Através da técnica de imunofluorescência, utilizando soro policlonal, foi possível visualizar a localização flagelar desta tanto na forma promastigota quanto na forma amastigota do parasito.

Em um ensaio preliminar de imunocitoquímica por microscopia eletrônica, utilizando também anticorpo policlonal, foi possível identificar a presença da proteína Lci5 na região correspondente ao flagelo e a bolsa flagelar da forma amastigota de *L. infantum*, inclusive bem próxima aos microtúbulos responsáveis pela formação do flagelo (Figura 15).

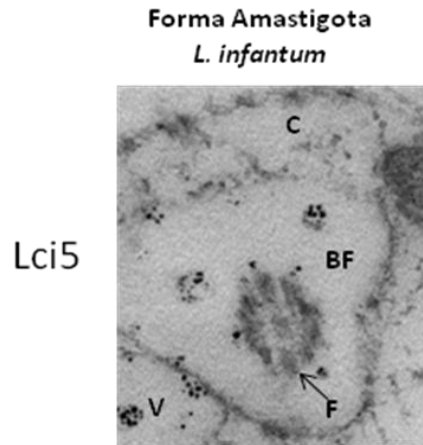


Figura 15: Localização subcelular por imunocitoquímica em microscopia eletrônica da proteína Lci5 de *L. infantum*. BF: Bolsa Flagelar; F: Flagelo, C: Citoplasma.

5.1.3 Análise da antigenicidade indireta da proteína.

Para a avaliação da antigenicidade das proteínas Lci5 recombinantes, foram realizados ensaios de ELISA indireto avaliando o reconhecimento específico destas por soros de cães e humanos infectados, portando LV e outras parasitoses. Quando analisadas com soros dos cães com LV, as proteínas Lci5-A e Lci5-B apresentaram sensibilidades distintas, com valores de 67,39% e 34,78%, respectivamente (Figura 16 e Tabela 3). Apenas a proteína completa, Lci5-A foi testada quanto aos soros de cães com outras parasitoses, apresentando uma reação cruzada com dois soros de cães com Ehrlichiose. Quando comparamos o reconhecimento dos grupos de indivíduos doentes e sadios para LV, apenas a proteína completa Lci5-A se mostrou útil para avaliação de cães sabidamente doentes com valores de p (segundo teste de qui-quadrado) de $p < 0,0001$, (Tabela 3).

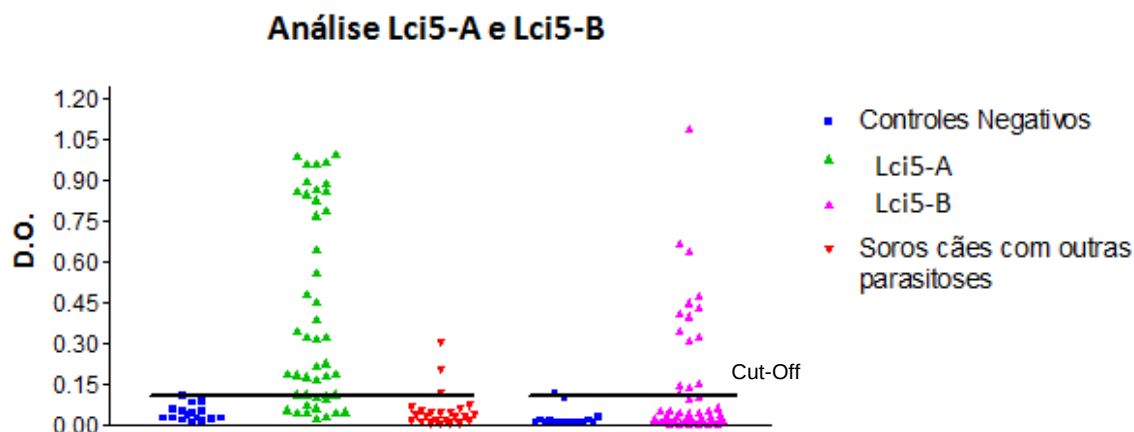


Figura 16: ELISA indireto das proteínas Lci5-A e Lci5-B com soros caninos com LV: Gráfico de dispersão com valores de absorvância do reconhecimento das proteínas Lci5-A e Lci5-B com soros caninos.

Tabela 3: Análise estatística do desempenho das proteínas Lci5-A e Lci5-B no reconhecimento dos soros de cães acometidos e sadios para LV.

<i>Antígeno</i>	<i>Sensibilidade (Intervalo de confiança)</i>	<i>Especificidade (Intervalo de confiança)</i>	<i>Valor Preditivo Positivo (Intervalo de confiança)</i>	<i>Valor Preditivo Negativo (Intervalo de confiança)</i>
Lci5-A	67,39% (51,98% - 80,47%)	100% (78,20% - 100,00%)	100% (88,78% - 100,00%)	50% (31,30% - 68,70%)
Lci5-B	34,78% (21,35% - 50,25%)	93,33% (68,05% - 99,83%)	94,12% (71,31% - 99,85%)	31,82% (18,61% - 47,58%)

Valores de p: Lci5-A =0,0001; Lci5-B=0,07

Quando analisadas com soros de humanos com LV, as proteínas Lci5-A e Lci5-B apresentaram sensibilidade de 86,66% e 80%, respectivamente (Figura 17 e Tabela 4). Quanto às análises com soros de humanos com outras parasitoses a Lci5-A apresentou 25% de reação cruzada com soros de humanos com Doença de Chagas e não apresentou reação cruzada com soros de humanos com leishmaniose tegumentar (Figura 18). Estatisticamente as proteínas se mostraram

úteis para avaliação de humanos sabidamente doentes com valores de p de $p < 0,0001$, quando comparamos o reconhecimento dos grupos de indivíduos doentes e saudáveis (Tabela 4).

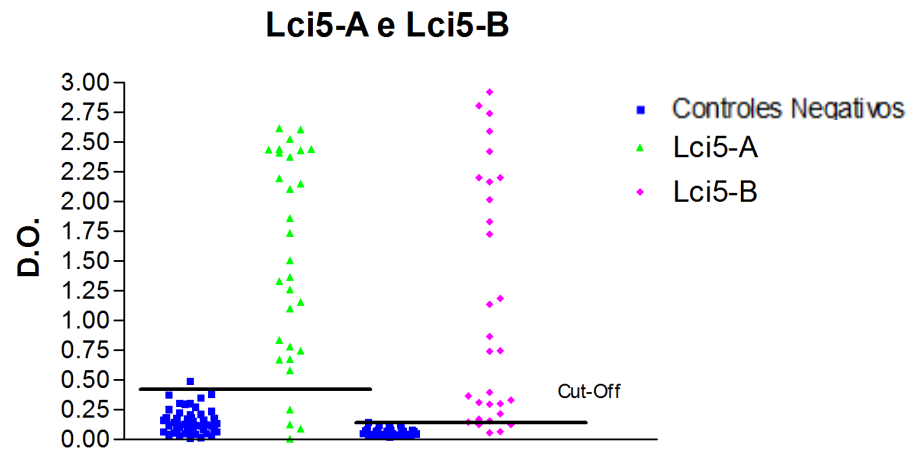


Figura 17: ELISA indireto para as proteínas Lci5-A e Lci5-B com soros humanos com LV:

Gráfico de dispersão com valores de absorvância do reconhecimento das proteínas Lci5-A e Lci5-B com soros humanos.

Tabela 4: Análise estatística do desempenho da proteína Lci5-A no reconhecimento dos soros humanos acometidos e sadios para LV.

<i>Antígeno</i>	<i>Sensibilidade</i> (Intervalo de confiança)	<i>Especificidade</i> (Intervalo de confiança)	<i>Valor Preditivo Positivo</i> (Intervalo de confiança)	<i>Valor Preditivo Negativo</i> (Intervalo de confiança)
Lci5-A	86,67% (69,28% - 96,24%)	98% (89,35% - 99,95%)	96,30% (81,03% to 99,91%)	92,45% (81,79% to 97,91%)
Lci5-B	80% (61,43% - 92,29%)	100% (88,43% - 100,00%)	100% (85,75% - 100,00%)	83,33% (67,19% - 93,63%)

Valor de p : Lci5-A =0,0001; Lci5-B =0,0001

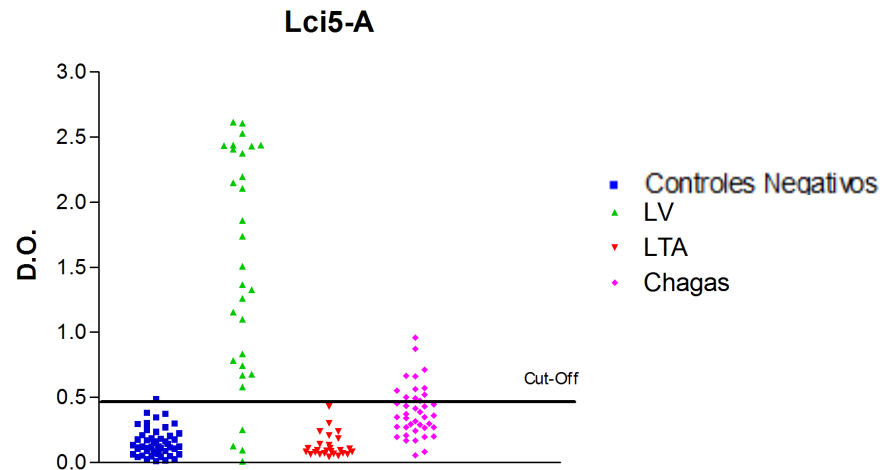


Figura 18: ELISA indireto da proteína Lci5-A com soros humanos: Gráfico de dispersão com valores de absorbância do reconhecimento da proteínas Lci5-A com soros humanos portando outras parasitoses.

5.2 Caracterização e análise antigênica da proteína Lci9.

5.2.1 Descrição do gene.

O gene correspondente à proteína Lci9 não é representado por uma região codificadora devidamente anotada nas sequências genômicas de *L. infantum*. Em *L. major* seu ortólogo está presente e é identificado pelo número de acesso LmjF.28.3010 em banco de dados do TriTrypDb. Este é um gene único codificando para uma proteína com extremidades N- e C-terminais curtas (169 e 97 aminoácidos, respectivamente) e uma região central consistindo de 14 repetições de um motivo com 25 aminoácidos seguida de outras 11 repetições com um motivo relacionado de 34 aminoácidos. A sequência gênica original obtida por nós apresenta cerca de 2400 pb (Lci9-A), codificando para uma proteína de cerca de 93KDa, com 13 repetições de 75 pb seguida de 11

repetições de 102 pb, flanqueadas por trechos das extremidades não repetitivas. Já o inserto denominado Lci9-B, obtido após a digestão do gene anterior com a enzima *Sal* I, apresenta cerca de ~1300 pb e compreende praticamente a primeira série de repetições. A representação esquemática da proteína Lci9, ilustrando o segmento central, os motivos repetitivos e as proteínas recombinantes produzidas podem ser observados na figura 19.

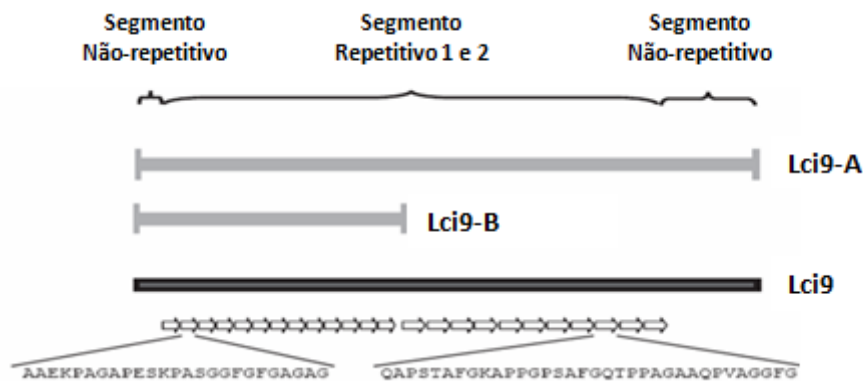


Figura 19: Esquema do gene Lci9 e fragmentos recombinantes obtidos. O esquema mostra os insertos Lci9-A e Lci9-B obtidos a partir do gene Lci9 e as repetições existentes nesse gene bem como as regiões repetitivas.

5.2.2 Análise da expressão e conservação da proteína Lci9 na família Trypanosomatidae.

A sequência obtida do genoma de *L. infantum*, através da biblioteca genômica, não apresentou uma região codificadora correspondente nos bancos de dados existentes no organismo. Já o fragmento gênico clonado Lci9 obtido de *L. infantum* apresentou 87% de identidade com o gene identificado em *L. major* e

não há uma significativa correspondência da sequência em outros parasitos do gênero *Leishmania*, com exceção de *L. mexicana*, onde apresentou uma identidade de 53%. O gene também apresentou uma baixa similaridade com sequências genômicas do gênero *Trypanosoma* (se apresentando como genes não sintênicos) como visualizado no alinhamento parcial seguinte (Figura 20).

Apesar da não identificação como um gene codificante de *L. infantum*, a proteína Lci9 foi reconhecida em extratos protéicos do parasita, a partir de experimentos de "Western-blot" utilizando-se o soro policlonal produzido contra a proteína recombinante. A proteína nativa se apresentou com expressão constante ao longo do ciclo de vida do parasito, tanto na forma promastigota quanto na sua forma amastigota. Além da expressão constante a proteína foi detectada de forma clara em cerca de 10^6 células, sugerindo uma abundância razoável (Figura 21).

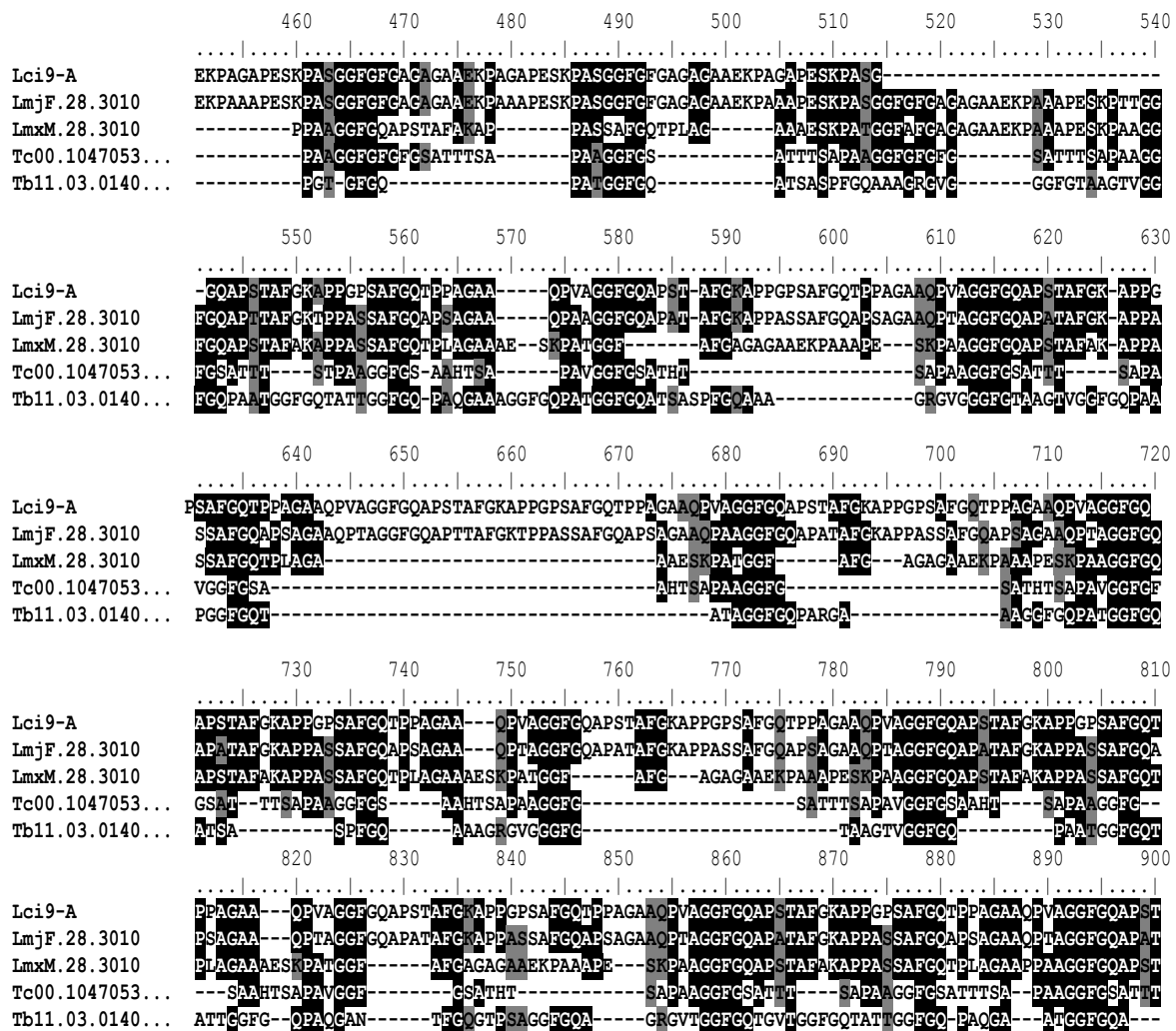


Figura 20: Alinhamento da proteína Lci9-A de *L. infantum* com seus prováveis ortólogos na família Trypanosomatidae:.

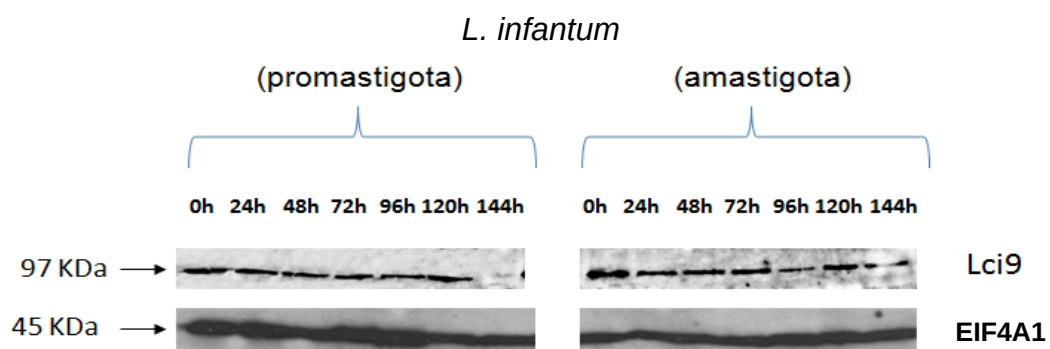


Figura 21: Análise da expressão da proteína Lci9 ao longo do ciclo de vida de *L. infantum*.

Como controle avaliou-se a expressão da proteína EIF4A1, fator de iniciação da tradução que é expresso constitutivamente ao longo do ciclo de vida da família Trypanosomatidae.

A proteína Lci9 também se mostrou conservada em extratos proteicos de fase exponencial de crescimento celular de diferentes espécies de *Leishmania*, mesmo sem uma correlação da sequência gênica em bancos de dados dessas espécies, sendo reconhecida em todos os extratos dos parasitos, mesmo nas formas amastigotas (Figura 22). No caso de espécies de *Trypanosoma* sua detecção também foi possível, entretanto com um fraco reconhecimento tanto em *T. brucei* como em *T. cruzi* (Figura 22).

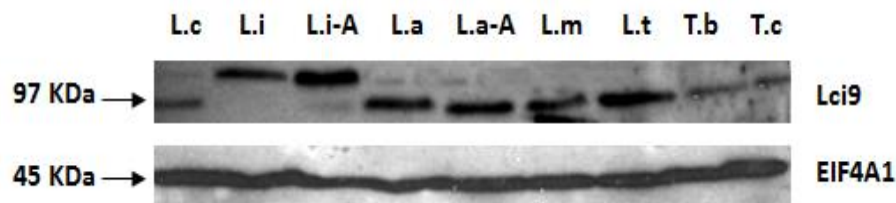


Figura 22: Comparação da expressão da proteína Lci9 na família Trypanosomatidae: L.c - *L. chagasi*; L.i - *L. infantum*; L.i-A - *L. infantum*, forma amastigota; L.a - *L. amazonensis*; L.a-A - *L. amazonensis*, forma amastigota; L.m - *L. major*; L.t - *L. tarentolae*; T.b - *T. brucei*, forma procíclica; T.c - *T. cruzi*, forma procíclica.

5.2.3 Determinação da localização subcelular da proteína Lci9.

A proteína Lci9 apresentou um padrão de localização citoplasmática, com concentração em algumas regiões, determinado pela técnica de imunofluorescência. Sua localização foi citoplasmática tanto na forma promastigota quanto na forma amastigota do parasito, apesar de uma aparente menor concentração da proteína na forma amastigota, como mostrado na figura 23.

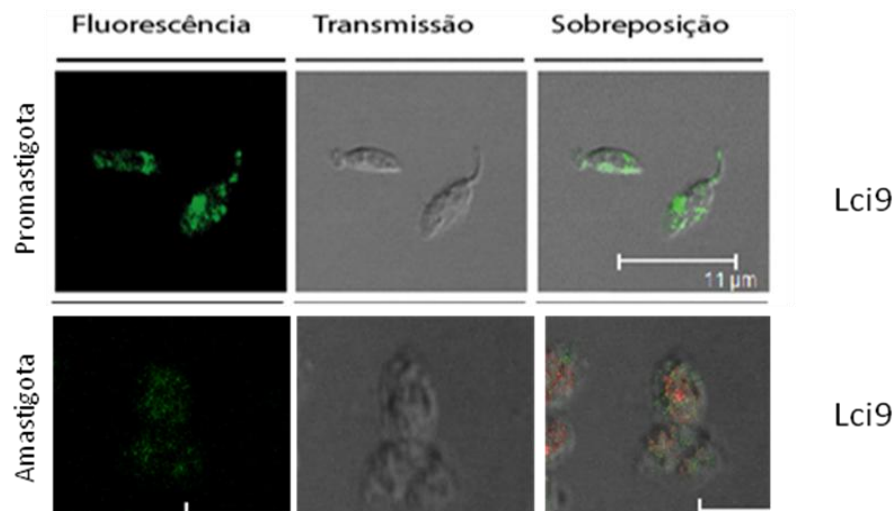


Figura 23: Localização celular da proteína Lci9 em *L. infantum*. A localização citoplasmática da proteína foi obtida pela técnica de imunofluorescência, utilizando soro policlonal contra a proteína recombinante, tanto na forma promastigota quanto na forma amastigota do parasito.

A localização unicamente citoplasmática da Lci9 foi confirmada também por duas técnicas distintas de fracionamento celular utilizadas neste trabalho. para se avaliar a associação destas proteínas com diferentes subcompartimentos celulares. Na primeira delas as células de *Leishmania* eram submetidas a lise por ciclos de congelamento /descongelamento, seguida da separação de frações enriquecidas em núcleo ou citoplasma por meio de centrifugações diferenciais. Na segunda as frações subcelulares eram obtidas por meio de tratamento com concentrações crescentes do detergente digitonina. Em ambos os experimentos a Lci9 se mostrou de localização estritamente citoplasmática, solúvel, sem associação com organelas ou fragmentos de membrana ou citoesqueleto, como mostrado nas figuras 24 e 25. Não se observou diferenças na sua localização entre as formas promastigota e amastigota do parasito.

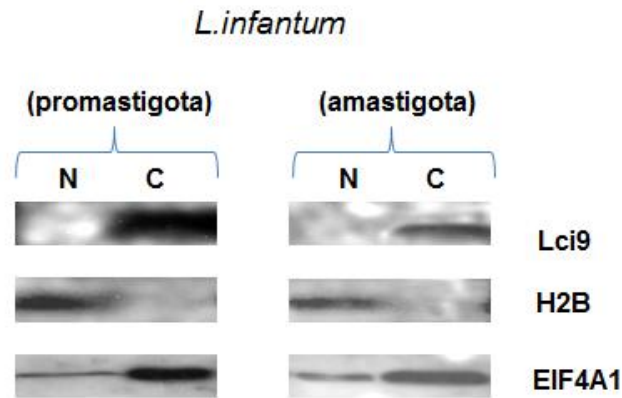


Figura 24: Localização subcelular da proteína Lci9 após fracionamento por ciclos de congelamento/descongelamento: N: Fração proteínas nucleares/organelares/membrana; C: Fração de proteínas citoplasmáticas. Controles: TbH2B (histona H2B, proteína nuclear); EIF4A1 (proteína citoplasmática).

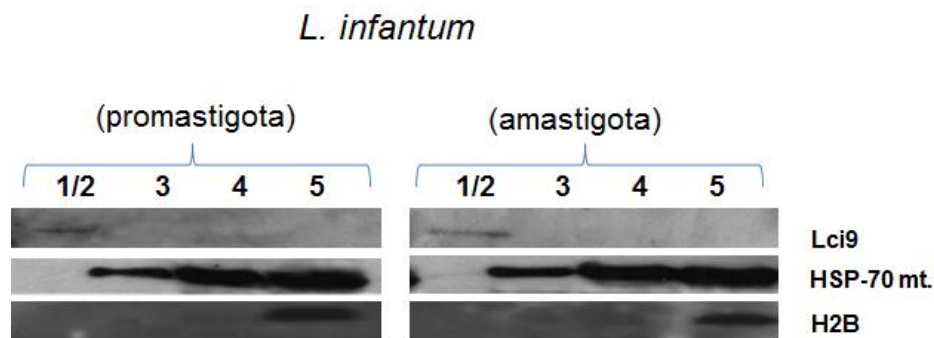


Figura 25: Localização subcelular da proteína Lci9 após fracionamento por gradiente de digitonina. As frações 1 e 2 correspondem as proteínas citoplasmáticas, enquanto as 3 e 4 estão enriquecidas em proteínas de organelas e a fração 5 corresponde as proteínas nucleares e não solúveis. Controles: LinHSP-70mt (proteína organelar mitocondrial); TbH2B (proteína nuclear).

Em um ensaio preliminar de imunocitoquímica por microscopia eletrônica, utilizando também anticorpo policlonal, foi possível identificar a presença da proteína Lci9 dispersa no citoplasma das formas amastigota de *L. infantum*, com concentração em algumas regiões (Figura 26).

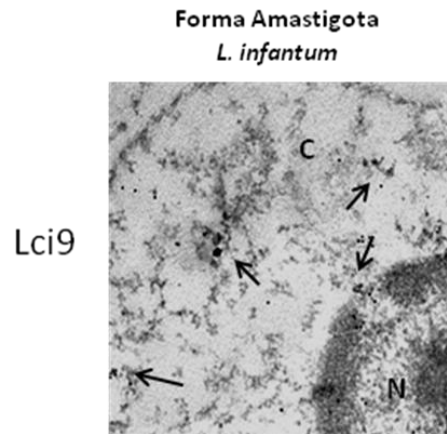


Figura 26: Localização subcelular por imunocitoquímica da proteína Lci9 em *L. infantum*: C - Citoplasma; N - Núcleo.

5.2.3 Análise da antigenicidade indireta da proteína Lci9.

Na avaliação da antigenicidade da proteína, foram testadas em ensaios de ELISA a proteína codificante Lci9 completa (Lci9-A) e sua região repetitiva N-Terminal correspondente a proteína Lci9-B. Quando analisadas com os soros dos cães com LV, as proteínas Lci9 e Lci9-B apresentaram sensibilidades de 84,78% e 47,82%, respectivamente (Figura 27 e Tabela 5). A proteína Lci9 também foi testada quanto aos soros de cães com outras parasitoses, apresentando uma reação cruzada com dois soros de cães com ehrlichiose e um soro de cão com demodicose. Ambas as proteínas se mostraram úteis para avaliação de cães com LV com valores de p de 0,0001 e 0,0024, pelo teste do qui-quadrado (Tabela 5).

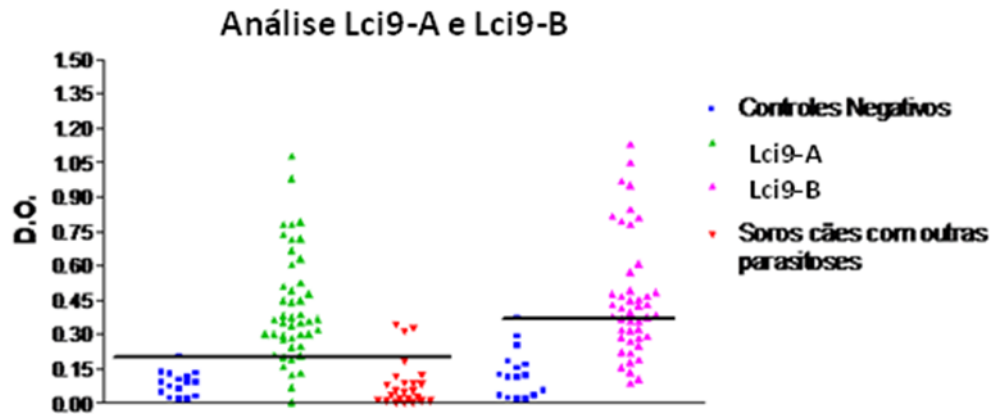


Figura 27: ELISA indireto das proteínas Lci9-A e Lci9-B com soros caninos com LV: Gráfico de dispersão com valores de absorvância do reconhecimento das proteínas Lci9-A e Lci9-B com soros caninos com LV e outras parasitoses.

Tabela 5: Análise estatística do desempenho das proteínas Lci9-A e Lci9-B no reconhecimento dos soros de cães acometidos e sadios para leishmaniose visceral.

<i>Antígeno</i>	<i>Sensibilidade</i> (Intervalo de confiança)	<i>Especificidade</i> (Intervalo de confiança)	<i>Valor Preditivo Positivo</i> (Intervalo de confiança)	<i>Valor Preditivo Negativo</i> (Intervalo de confiança)
Lci9-A	84,78% (71,13% - 93,66%)	100% (78,20% - 100,00%)	100% (90,97% - 100,00%)	68,18% (45,13% - 86,14%)
Lci9-B	47,82% (32,89% - 63,05%)	100% (78,20% - 100,00%)	100% (84,56% - 100,00%)	38,46% (23,36% - 55,38%)

Valores de p: Lci9-A =0,0001; Lci9-B=0,0024

Quando analisada com aos soros de humanos com LV, as proteínas Lci9-A e B apresentaram sensibilidades de 26% e 16,66%, respectivamente (Figura 28 e Tabela 6). Quanto às análises com soros de humanos com outras parasitoses a proteína Lci9-A apresentou 80% de reação cruzada com soros de humanos com doença de chagas e 56% reação cruzada com soros de humanos com leishmaniose tegumentar (Figura 29). Estatisticamente apenas a proteína Lci9-A

se mostrou útil para avaliação de humanos com LV com valores de p de 0,0015, pelo teste do qui-quadrado.

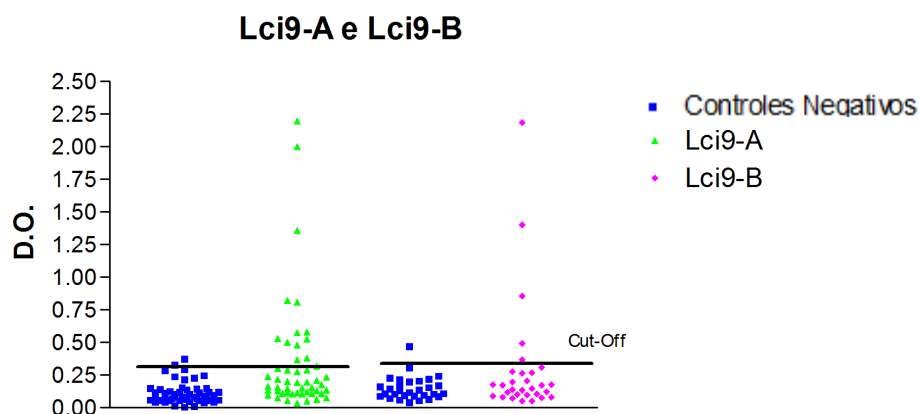


Figura 28: ELISA indireto das proteínas Lci9-A e Lci9-B com soros humanos com LV: Gráfico de dispersão com valores de absorvância do reconhecimento das proteínas Lci9-A e Lci9-B com soros humanos com LV.

Tabela 6: Análise estatística do desempenho das proteínas Lci9-A e Lci9-B no reconhecimento dos soros humanos acometidos e sadios para leishmaniose visceral.

<i>Antígeno</i>	<i>Sensibilidade</i> (Intervalo de confiança)	<i>Especificidade</i> (Intervalo de confiança)	<i>Valor Preditivo Positivo</i> (Intervalo de confiança)	<i>Valor Preditivo Negativo</i> (Intervalo de confiança)
Lci9-A	26% (14,63% to 40,34%)	98% (89,35% to 99,95%)	92,86% (66,13% to 99,82%)	56,98% (45,85% to 67,61%)
Lci9-B	16,66% (5,64% - 34,72%)	96,67% (82,78% - 99,92%)	83,33% (35,88% - 99,58%)	53,70% (39,61% - 67,38%)

Valor de p: Lci9-A =0,0015, Lci9-B = 0,1967

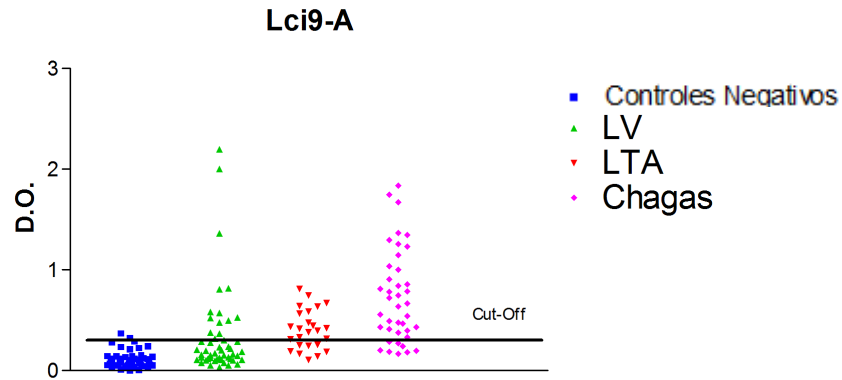


Figura 29: ELISA indireto da proteína Lci9-A com soros humanos: Gráfico de dispersão com valores de absorbância do reconhecimento das proteínas Lci9-A e Lci9-B com soros humanos com LV e outras parasitoses humanas.

5.3 Caracterização e análise antigênica da proteína Lci10.

5.3.1 Descrição do gene.

A proteína Lci10 é codificada por um gene identificado no banco de sequências do genoma de *L. infantum* pelo identificador LinJ.34.2360. A proteína contém múltiplos domínios repetitivos de diferentes tamanhos (variando de 68 a 198 aminoácidos) que se seguem a uma região N-terminal não repetitiva. O inserto Lci10-B, subclonado em trabalhos anteriores e apresentando 928 pb, corresponde à região não- repetitiva da proteína e inclui apenas uma pequena fração do segmento contendo os domínios repetitivos. O inserto Lci10-A, corresponde ao inserto completo com cerca de ~2600pb. Um esquema com os dois insertos pode ser visualizado na figura 30.

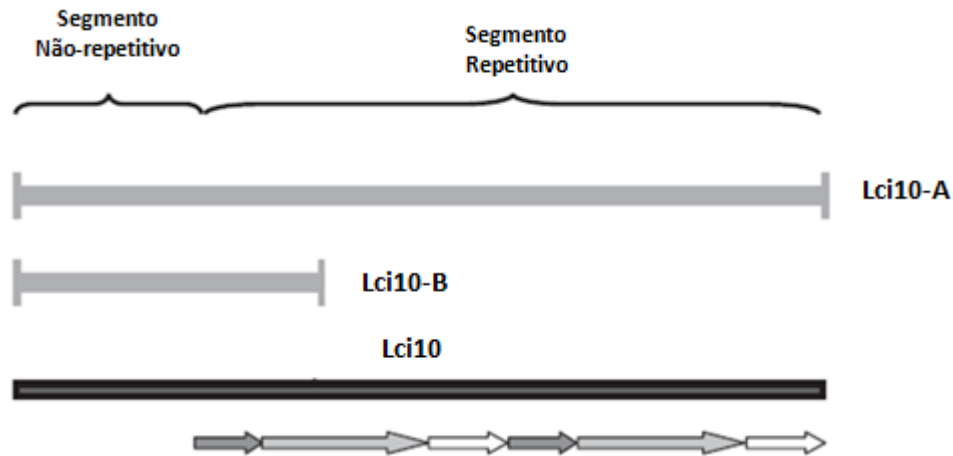


Figura 30: Esquema do gene Lci10 e fragmentos recombinantes obtidos. O esquema mostra os insertos Lci10-A e Lci10-B obtidos a partir do gene Lci10 e suas regiões repetitivas.

5.3.2 Análise da expressão e conservação na família Trypanosomatidae.

O gene LinJ.34.2360 codifica para uma proteína hipotética, com cerca de 200KDa, com motivos repetitivos de *L. infantum* e apresenta ortólogos identificados em sequências genômicas de *Leishmania*, mas não de *T. brucei* ou *T. cruzi*. A alta similaridade entre as proteínas em *Leishmania* pode ser visualizada no alinhamento em anexo, sendo mais divergente a proteína apresentada em *L. braziliensis*.

A proteína Lci10 correspondente apresentou expressão constante ao longo do ciclo de vida do parasito nas suas formas promastigota e amastigota sendo também detectada de forma clara em cerca de 10^6 células (Figura 31) até o momento de morte celular. Em seu perfil de expressão a proteína endógena do parasito apresenta várias isoformas, devido provavelmente a modificações pós-traducionais como fosforilação, formação de dímeros ou complexada a outras proteínas.

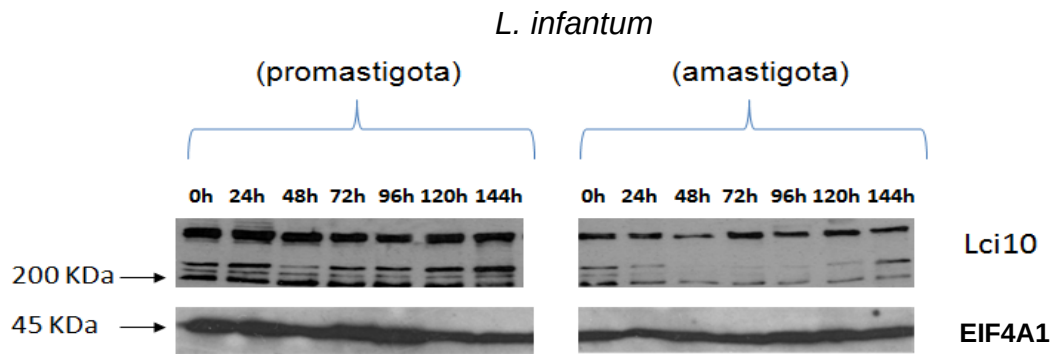


Figura 31: Análise da expressão da proteína Lci10 ao longo do ciclo de vida de *L. infantum*.

A proteína Lci10 se apresentou com expressão constante ao longo do ciclo de vida do parasito (nº de células 10x6).

As várias isoformas da proteína Lci10 se mostraram conservadas através do gênero *Leishmania*, com a exceção observada em *L. major* onde não se observaram várias isoformas, e também foi detectada nas formas amastigota das espécies *L. infantum* e *L. amazonensis*. A proteína Lci10 também não apresentou nenhuma expressão detectável em *Trypanosoma sp.*. Este padrão de expressão está apresentado na figura 32.

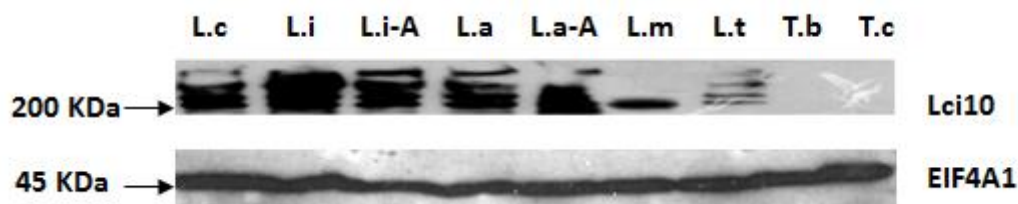


Figura 32: Comparação da expressão da proteína Lci10 na família Trypanosomatidae:

Controle: proteína EIF4A1.

O reconhecimento da proteína Lci10-A apenas nas espécies de *Leishmania sp.*, com exceção de *L. braziliensis*, é confirmado também por

alinhamento da sequência proteica da proteína com seus prováveis ortólogos na família Trypanosomatidae, não havendo a identificação de sequências similares em *Trypanosoma sp.*, apesar da sua conservação em espécies de *Leishmania*.

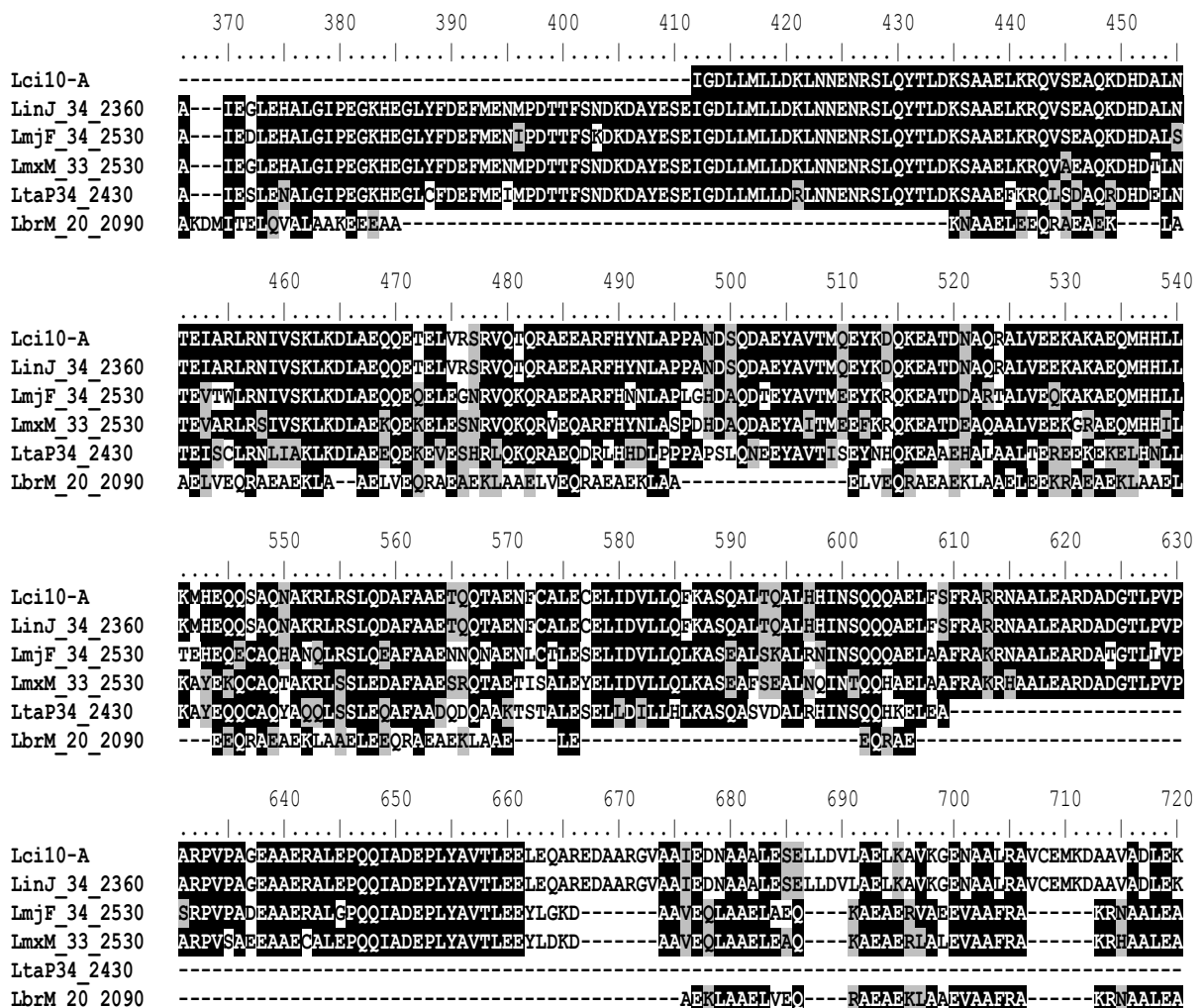


Figura 33: Alinhamento da sequência proteica Lci10-A de *L. infantum* com seus ortólogos no gênero *Leishmania*.

5.3.3 Identificação de modificações pós-traducionais do tipo fosforilação.

Pela presença de várias isoformas em extratos celulares de tripanossomatídeos a proteína Lci10 foi submetida a ensaio de detecção de

fosfoproteínas. A proteína se apresentou fosforilada de forma clara apenas na forma promastigota do parasito. O resultado confirma a presença de modificações pós-traducionais por fosforilação, não excluindo outras (Figura 34).

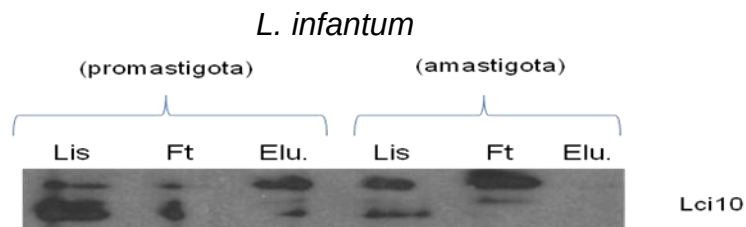


Figura 34: Detecção de modificação do tipo fosforilação na proteína Lci10: Lis - Lisado total; Ft - *Flow-through* (proteínas não-fosforiladas que não se ligam a resina); Elu - Eluição de proteínas fosforiladas.

5.3.4 Determinação da localização subcelular da proteína Lci10-A.

Através da técnica de imunofluorescência, a proteína Lci10 apresentou um padrão de localização pontual no citoplasma, restrito às regiões basal e apical da célula, principalmente na forma promastigota do parasito e diferenciada em relação ao núcleo. Essa localização se sobrepõe a de proteínas que interagem com regiões ricas em microtúbulos ou de grânulos citoplasmáticos. A localização pode ser visualizada na figura 35. Em amastigotas a Lci10 apresentou também um padrão de concentração citoplasmática em uma de suas extremidades (dados não mostrados).

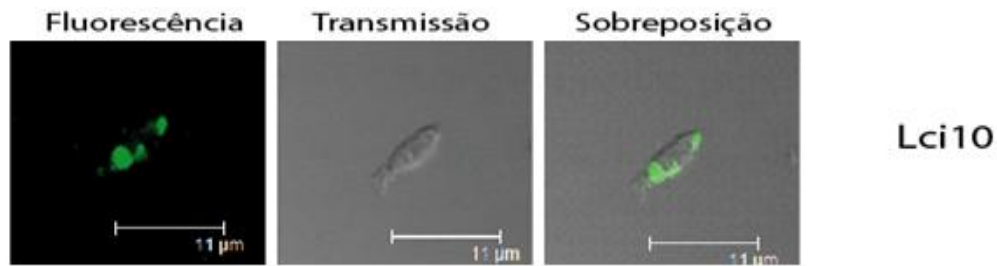


Figura 35: Localização celular da proteína Lci10 em promastigotas de *L. infantum*: Localização subcelular da proteína Lci10 em *L. infantum*, na forma promastigota deste parasito, pela técnica de imunofluorescência.

A localização da proteína, bem como sua possível interação com membranas celulares, microtúbulos ou grânulos foi confirmada através dos resultados obtidos pelos fracionamentos celulares. A proteína foi detectada nas frações correspondente a proteínas do núcleo ou de interação com membranas celulares (membrana/microtúbulos) pelas duas técnicas como demonstrado nas figuras 36 e 37 e em ambas as formas de vida do parasito.

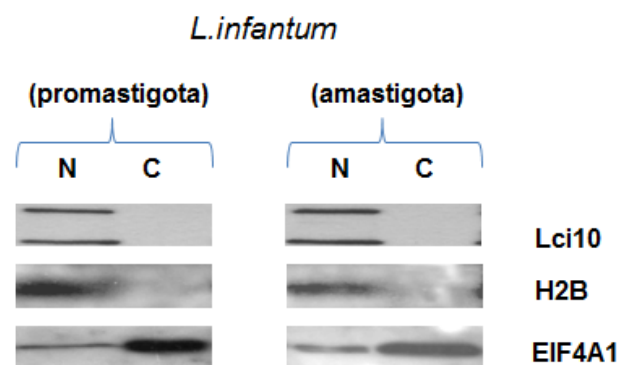


Figura 36: Localização subcelular da proteína Lci10 após fracionamento por ciclos de congelamento/desongelamento: A proteína Lci10 apresentou um padrão de localização na fração correspondente a proteínas nucleares e associadas à membrana/microtúbulos

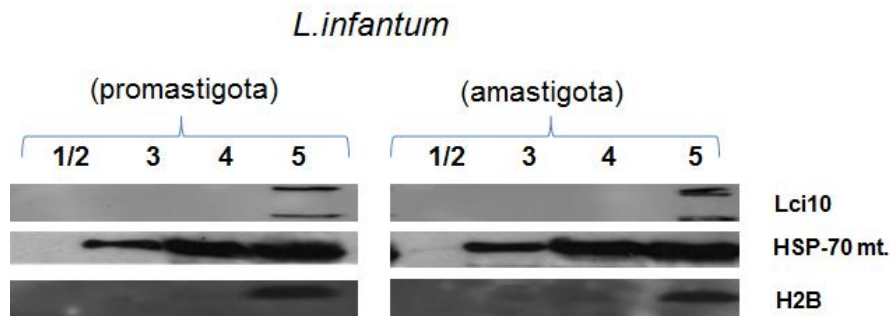


Figura 37: Localização subcelular da proteína Lci10 após fracionamento em gradiente de digitonina: A proteína Lci10 apresentou um padrão de localização em frações correspondentes também a proteínas de ou associadas à membrana ou nucleares

5.3.5 Análise da antigenicidade indireta da proteína Lci10-A.

Na avaliação da antigenicidade da proteína foram testadas a proteína codificante Lci10 completa (Lci10-A) e sua região N-Terminal, não repetitiva, correspondente à proteína Lci10-B. Quando analisadas frente aos soros dos cães com leishmaniose visceral, as proteínas Lci10-A e Lci10-B apresentaram sensibilidades de 80,43% e 76,74%, respectivamente (Figura 38). A proteína Lci10-A também foi testada quanto aos soros de cães com outras parasitoses, apresentando uma reação cruzada com três soros de cães com ehrlichiose e um soro de cão com Demodicose. Estatisticamente as proteínas se mostraram úteis para avaliação de cães com LV com valores de $p < 0,0001$, (Tabela 7).

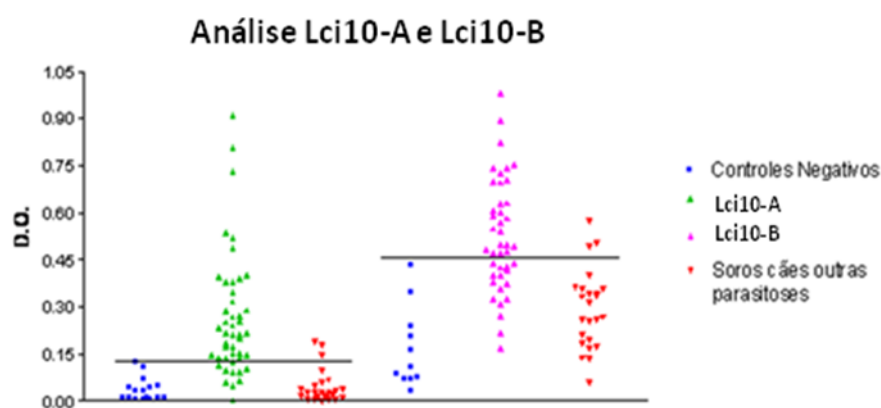


Figura 38: ELISA indireto das proteínas Lci10-A e Lci10-B com soros caninos: Gráfico de dispersão com valores de absorvância do reconhecimento das proteínas Lci10-A e Lci10-B com soros caninos com LV e outras parasitoses.

Tabela 7: Análise estatística do desempenho das proteínas Lci10-A e Lci10-B no reconhecimento dos soros de cães acometidos e sadios para LV.

Antígeno	Sensibilidade (Intervalo de confiança)	Especificidade (Intervalo de confiança)	Valor Preditivo Positivo (Intervalo de confiança)	Valor Preditivo Negativo (Intervalo de confiança)
Lci10-A	80,43% (66,09% - 90,64%)	100% (78,20% - 100,0%)	100% (90,51% - 100,00%)	62,50% 40,59% - 81,20%
Lci10-B	76,74% (61,37% - 88,24%)	100% (78,20% - 100,0%)	100% (89,42% - 100,00%)	60% (38,67% - 78,87%)

Valores de p: Lci10-A =0,0001; Lci10-B=0,0001

Em análise utilizando soros de humanos com LV, as proteínas Lci10-A e Lci10-B apresentaram sensibilidades de 48% e 43,18%, respectivamente (Figura 39 e Tabela 8). Quanto às análises com soros de humanos com outras parasitoses, a proteína completa não apresentou reação cruzada com soros de humanos com Doença de Chagas (Figura 40), vide a ausência da proteína em genomas de *Trypanosoma*, e nem mesmo com soros de humanos com leishmaniose tegumentar apesar da conservação da proteína em *Leishmania* sp.

As proteínas também se mostraram úteis estatisticamente para avaliação de humanos sabidamente doentes com valores de p de 0,0001, quando comparamos o reconhecimento dos grupos de indivíduos doentes e saudáveis (Tabela 8).

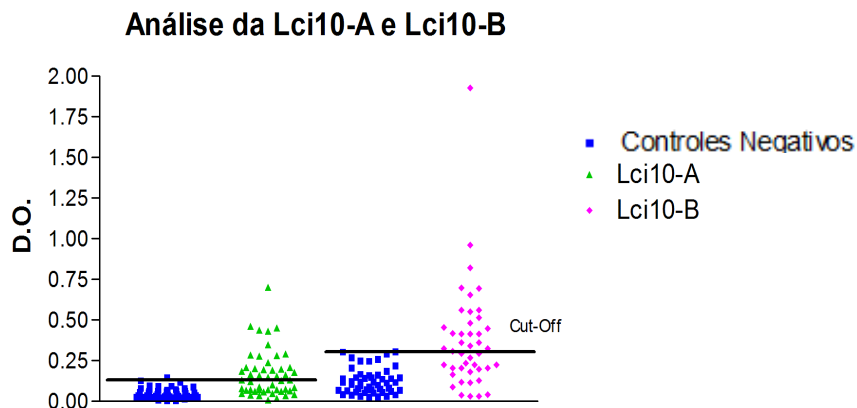


Figura 39: ELISA indireto das proteínas Lci10-A e Lci10-B com soros humanos: Gráfico de dispersão com valores de absorvância do reconhecimento das proteínas Lci10-A e Lci10-B com soros humanos com LV.

Tabela 8: Análise estatística do desempenho das proteínas Lci10-A e Lci10-B no reconhecimento dos soros humanos acometidos e sadios para leishmaniose visceral.

<i>Antígeno</i>	<i>Sensibilidade (Intervalo de confiança)</i>	<i>Especificidade (Intervalo de confiança)</i>	<i>Valor Preditivo Positivo (Intervalo de confiança)</i>	<i>Valor Preditivo Negativo (Intervalo de confiança)</i>
Lci10-A	48% (33,66% - 62,58%)	98% (89,35% - 99,95%)	96% (79,65% - 99,90%)	65,33% (53,46% - 75,96%)
Lci10-B	43,18% (28,35% - 58,97%)	100% (92,89% - 100,0%)	100% (82,35% - 100,00%)	66,67% (54,83% - 77,14%)

Valores de p: Lci10-A =0,0001; Lci10-B=0,0001

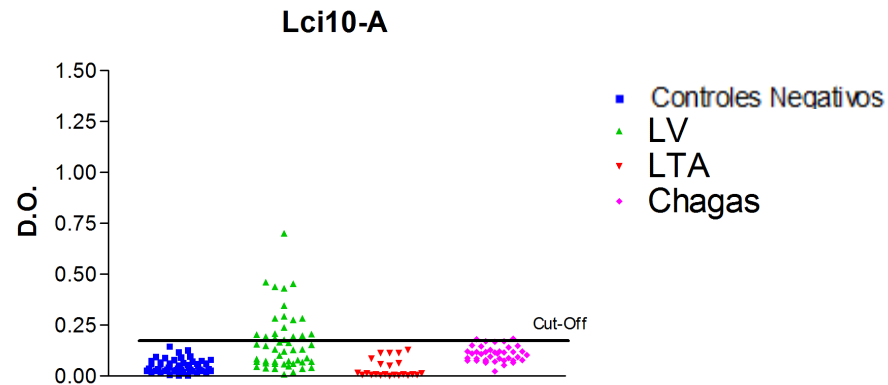


Figura 40: ELISA indireto da proteína Lci10-A com soros humanos: Gráfico de dispersão com valores de absorbância do reconhecimento da proteína Lci10-A com soros humanos com LV e outras parasitoses.

5.4 Caracterização e análise antigênica da proteína Lci11.

5.4.1 Descrição do gene.

O gene Lci11, identificado pelo número de acesso LinJ.35.4030, codifica para uma proteína hidrofílica hipotética conservada em diferentes espécies de *Leishmania*, mas com possíveis ortólogos em espécies de *Trypanosoma* muito pouco conservados. Esta proteína contém um provável peptídeo de sinal na sua extremidade N-terminal sugerindo uma função extracelular de membrana ou secreção. Recentemente Zinoviev *et al* (2011) descreveram o ortólogo dessa proteína em *L. amazonensis* como sendo um possível 4E-IP (Proteína de ligação ao fator de iniciação da tradução EIF4E em *Leishmania*) visto que essa proteína foi identificada através das técnicas de espectrometria de massa e imunoprecipitação como parceiro de interação deste fator de tradução. Além da sua identificação na co-precipitação, a presença de um motivo de ligação, na proteína Lci11, comumente encontrado em proteínas que interagem com EIF4E reforça a possível identificação, mas até o momento nenhuma outra descrição

deste gene está disponível. O inserto completo Lci11, obtido da biblioteca genômica, compreende 1874 pb dos 2376 pb do gene original. O esquema com o inserto completo e os seus fragmentos recombinantes pode ser visualizado na figura 41.



Figura 41: Esquema da sequência do inserto Lci11. A figura esquematiza o inserto Lci11 e o inserto obtido Lci11-A. Esquematiza também a sequência de um provável peptídeo-sinal presente na região N-terminal da sequência.

5.4.2 Análise da conservação na família Trypanosomatidae.

O gene Lci11 codifica para uma proteína ainda hipotética, com cerca de 85 KDa, com sequência bem conservada no gênero *Leishmania sp.*, distribuída entretanto em cromossomos não sinténicos (34 e 35) e apresentando possíveis ortólogos bem pouco conservados em *T. brucei* e *T. cruzi* (cromossomos 39 e 9 respectivamente). O alinhamento parcial das sequências pode ser visualizado na figura abaixo (Figura 42).

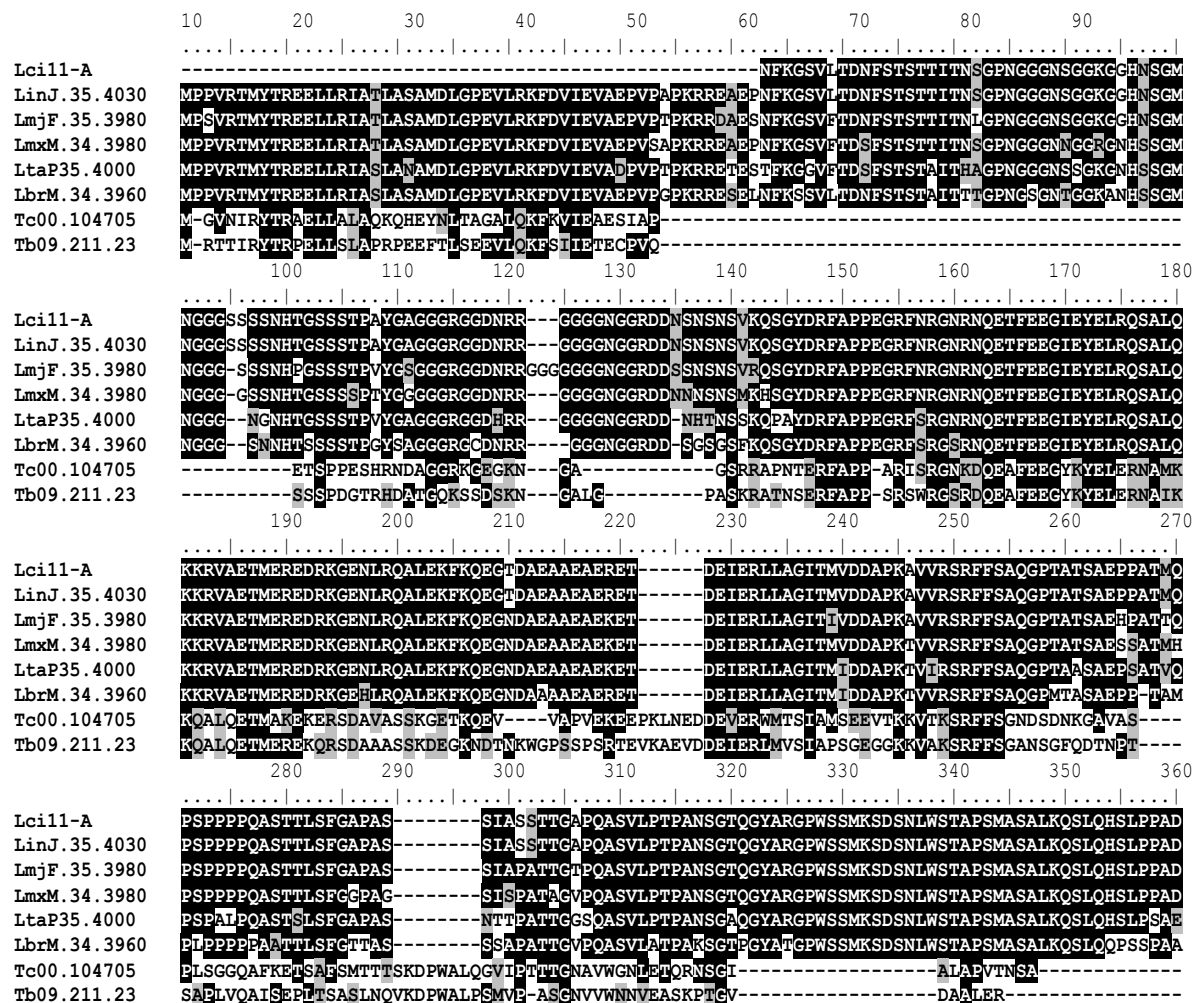


Figura 42: Alinhamento da proteína Lci11 de *L. infantum* e seus prováveis ortólogos na família Trypanosomatidae:

A proteína codificada apresentou padrão de expressão constante ao longo do ciclo de vida do parasito em ambas as formas promastigota e amastigota, detectada em extratos celulares de cerca de 10^5 células, sugerindo que se trata de uma proteína abundante. Em seu perfil de expressão no parasito a proteína nativa apresentou uma isoforma, cerca de 66 KDa, formada provavelmente pela clivagem do seu peptídeo-sinal localizado na região N-Terminal (Figura 43). Esta clivagem e perfil de expressão também foram descritos por Zinoviev e colaboradores (2011).

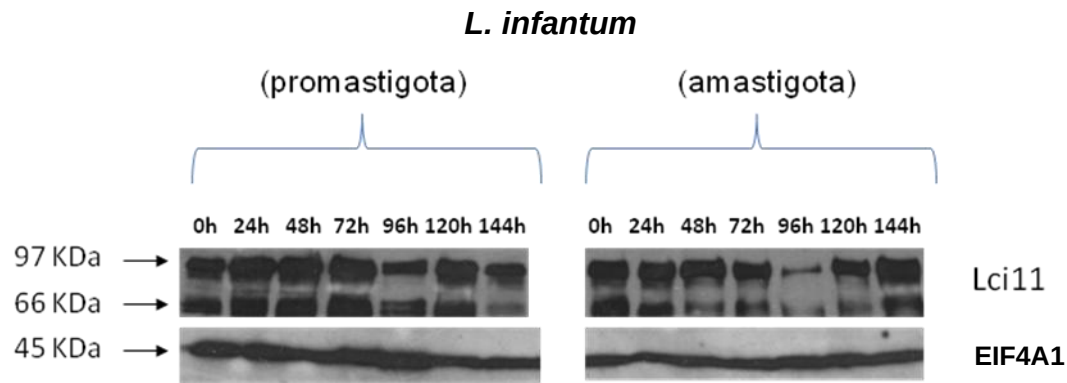


Figura 43: Análise da expressão da proteína Lci11 ao longo do ciclo de vida de *L. infantum*.

A proteína Lci11 foi detectada com expressão constante ao longo do ciclo de vida do parasito (nº de células 10x6).

A proteína Lci11, como também sua forma clivada, se apresentou conservada na família Trypanosomatidae, apesar de uma menor expressão nas formas procíclica e sanguínea de *T. brucei*. A proteína também apresentou o mesmo padrão de expressão nas formas amastigotas do parasito em *L. amazonensis* e *L. infantum* (Figura 44).

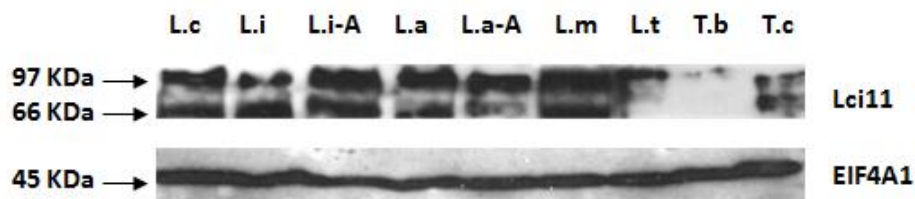


Figura 44: Comparação da expressão da proteína Lci11 na família Trypanosomatidae. A proteína Lci11 apresentou expressão conservada em todos os extratos da família Trypanosomatidae analisados, entretanto com uma menor expressão em Trypanosoma sp, inclusive nas formas amastigota das espécies *L. infantum* e *L. amazonensis*.

5.4.3 Localização subcelular da proteína Lci11.

Em ensaio de imunofluorescência, a proteína Lci11 apresentou um padrão de localização citoplasmática, distribuída por todo o citoplasma das formas amastigotas e promastigotas de *L. infantum* (Figura 45).

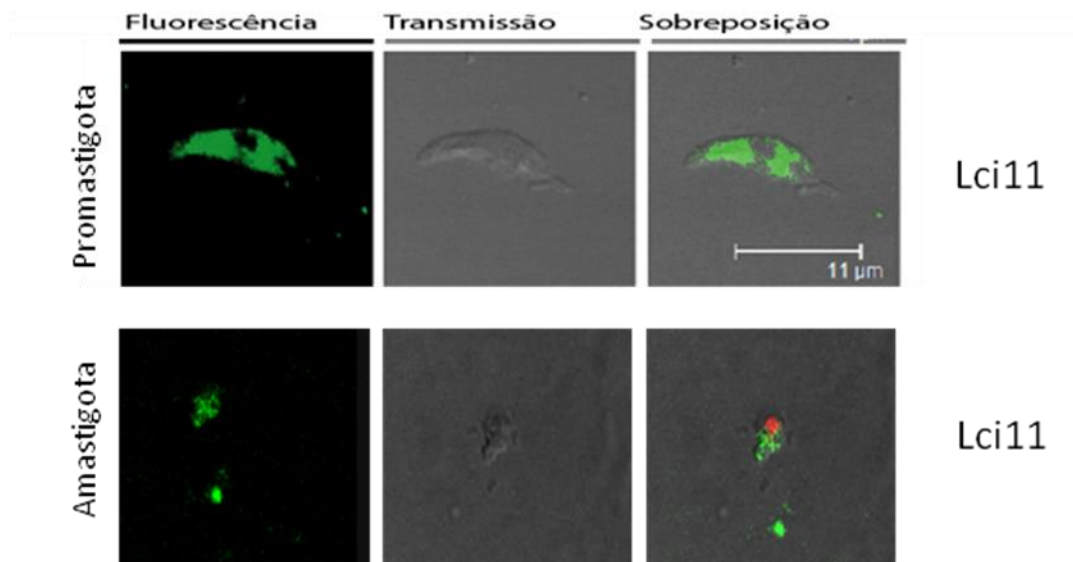


Figura 45: Localização celular da proteína Lci11 em *L. infantum*: A proteína Lci11 apresentou uma localização citoplasmática, pela técnica de imunofluorescência, tanto na forma promastigota quanto na forma amastigota do parasito.

Quando analisada em subfrações celulares, a proteína foi identificada nas frações citoplasmáticas apresentando, entretanto, uma co-localização em frações referentes a proteínas organelares (Figuras 46 e 47). Esta co-localização pode indicar a interação da proteína Lci11 com organelas celulares ou com proteínas presentes em organelas e complexos proteicos.

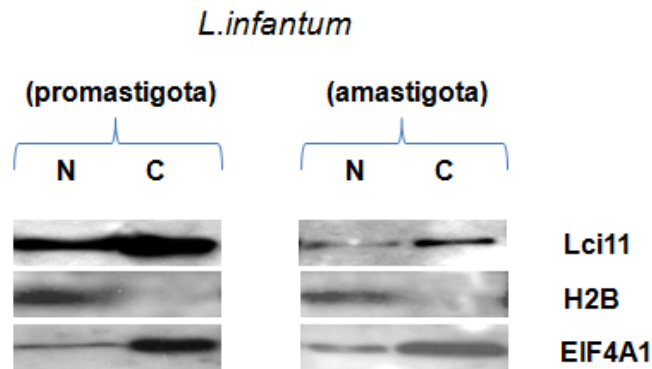


Figura 46: Localização subcelular da proteína Lci11 após fracionamento por ciclos de congelamento/descongelamento: A proteína Lci11 apresentou um padrão de localização em ambas as frações celulares, com uma maior concentração na fração correspondente a proteínas citoplasmáticas

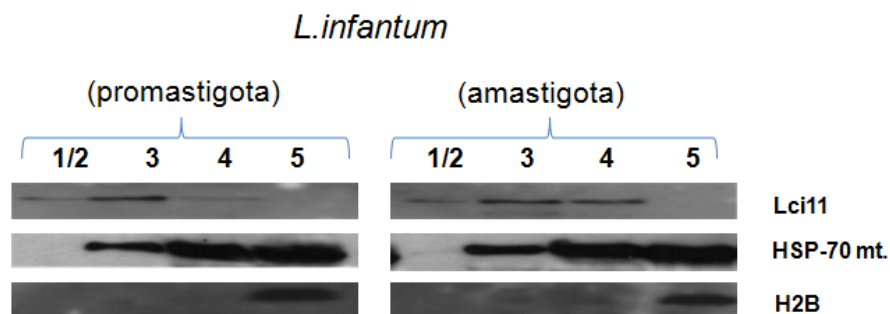


Figura 47: Localização subcelular da proteína Lci11 após fracionamento com gradiente de digitonina. A proteína Lci111 apresentou também um padrão de localização em frações correspondentes também a proteínas presentes em organelas ou em complexos protéicos.

5.4.4 Análise indireta da antigenicidade da proteína Lci11

Na avaliação da antigenicidade foi testada apenas a proteína codificante Lci11 completa, tendo em vista que esta não apresentou motivos repetitivos passíveis de análise antigênica. Quando analisada com soros dos cães com LV, a proteína apresentou sensibilidade de 82,61% (Figura 48 e Tabela 9). Esta também foi testada quanto aos soros de cães com outras parasitoses, apresentando uma reação cruzada de 34,78% com seis soros de cães com

ehrlichiose e dois soros de cão com demodicose. A proteína apresentou valor de p de 0,0001, quando comparamos o reconhecimento dos grupos de cães doentes e saudáveis.

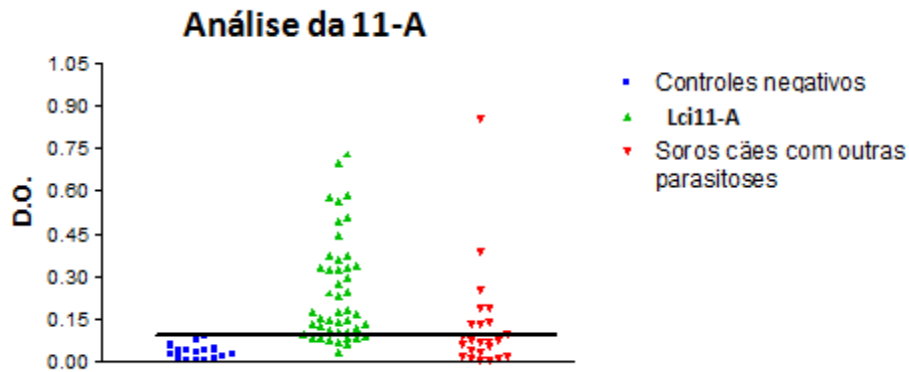


Figura 48: Gráfico do ELISA indireto para a proteína Lci11-A com soros caninos: Gráfico de dispersão com valores de absorbância do reconhecimento da proteína Lci11-A com soros caninos com LV e outras parasitoses.

Tabela 9: Análise estatística do desempenho da proteína Lci11-A no reconhecimento dos soros de cães acometidos e sadios para LV.

Valor de p : Lci11-A = 0,0001.

<i>Antígeno</i>	<i>Sensibilidade</i> (Intervalo de confiança)	<i>Especificidade</i> (Intervalo de confiança)	<i>Valor Preditivo</i> <i>Positivo</i> (Intervalo de confiança)	<i>Valor Preditivo</i> <i>Negativo</i> (Intervalo de confiança)
Lci11-A	82,61% (68,58% to 92,18%)	100% (78,20% to 100,00%)	100% (90,75% to 100,00%)	65,22% (42,73% to 83,62%)

Em análise utilizando soros de humanos com LV, a proteína Lci11 apresentou sensibilidade de apenas 32% (Figura 49 e Tabela 10). Quanto às análises com soros de humanos com outras parasitoses, a proteína completa apresentou reação cruzada de 7,5% com soros de humanos com Doença de Chagas, e de 25% com soros de humanos com Leishmaniose Tegumentar devido

à conservação da sequência (Tabela 10). A análise pode ser visualizada na figura abaixo. A proteína se mostrou útil estatisticamente para avaliação de humanos sabidamente doentes com valor de p, de 0,0002,.

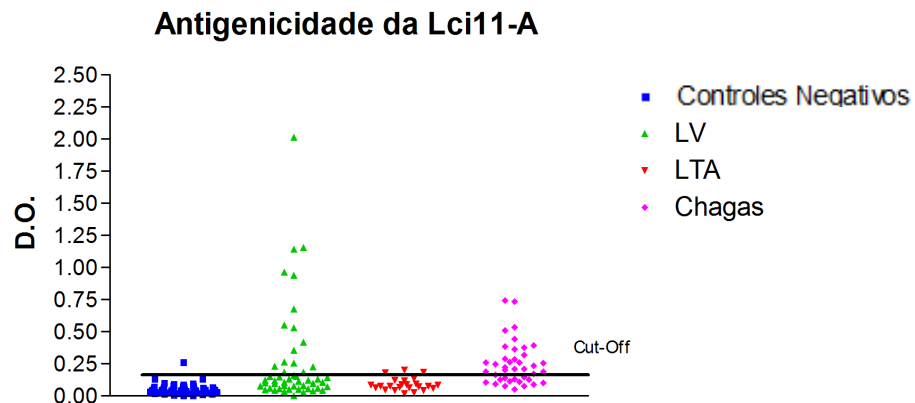


Figura 49: ELISA indireto da proteína Lci11-A com soros humanos: Gráfico de dispersão com valores de absorvância do reconhecimento da proteína Lci11-A com soros humanos com LV e outras parasitoses.

Tabela 10: Análise estatística do desempenho da proteína Lci11-A no reconhecimento dos soros humanos acometidos e sadios para leishmaniose visceral.

<i>Antígeno</i>	<i>Sensibilidade</i> <i>(Intervalo de confiança)</i>	<i>Especificidade</i> <i>(Intervalo de confiança)</i>	<i>Valor Preditivo</i> <i>Positivo</i> <i>(Intervalo de confiança)</i>	<i>Valor Preditivo</i> <i>Negativo</i> <i>(Intervalo de confiança)</i>
Lci11-A	32% (19,52% - 46,70%)	98% (89,35% - 99,95%)	94,12% (71,31% - 99,85%)	59,04% (47,69% - 69,72%)

Valor de p: Lci11-A =0,0002

5.5 Caracterização e análise antigênica da proteína Lci12.

5.5.1 Descrição do gene.

A proteína Lci12, também hipotética, é codificada por um gene cuja sequência no genoma de *L. infantum* possui o número de acesso LinJ.29.0110. Esta proteína possui ortólogos identificados nos genomas de *Leishmania* sp e de espécies de *Trypanosoma*. Anteriormente esta proteína foi identificada em uma análise de bioinformática que buscou identificar proteínas contendo domínios repetitivos no genoma de *L. infantum* e a região contendo o domínio repetitivo desta proteína foi reconhecida por soros de indivíduos acometidos com leishmaniose visceral (GOTO, (2007). A proteína de *L. infantum* é composta por uma região N-terminal de cerca de 160 aminoácidos seguido de um trecho contendo 30 motivos repetitivos de oito aminoácidos e, ao final, uma região C-terminal bem mais extensa contendo possíveis motivos trans-membrana e totalizando cerca de 2.450 aminoácidos e peso molecular predito de 277 KDa. A sequência obtida na biblioteca genômica, Lci12-A, corresponde a cerca de 2800 pb do gene completo, codificando para uma proteína de peso estimado de cerca de 100 KDa. A proteína recombinante utilizada nos ensaios, entretanto, é uma clivagem da mesma, Lci12-B, codificada por um fragmento gênico de cerca de 1500 pb de extensão (Figura 50).

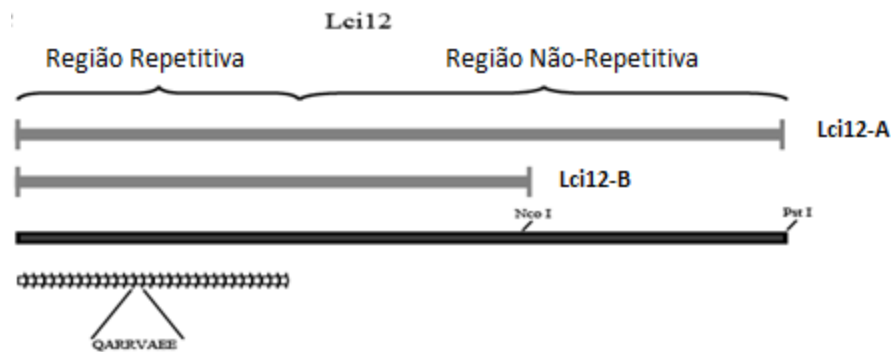


Figura 50: Esquema da sequência do gene Lci12. A figura esquematiza Lci12 e os insertos recombinantes Lci12-A e Lci12-B obtidos. Esquematiza também os segmentos repetitivos e não repetitivos da proteína

5.5.2 Análise da conservação na família Trypanosomatidae.

O gene Lci12 codifica para uma proteína ainda hipotética, com sequência bem conservada, apresentando genes ortólogos tanto no gênero *Leishmania* quanto *Trypanosoma*, distribuída em cromossomos sinténicos (29). Em *T. brucei* seu ortólogo parece ser a proteína denominada de Tb-292, uma proteína de membrana que parece se associar a regiões situadas próximas ao núcleo e a bolsa flagelar do parasito (LEE, *et. al.*,1994). O alinhamento parcial das sequencias pode ser analisado na figura 51.

Quando sua expressão foi investigada, a proteína Lci12 apresentou padrão de expressão constante ao longo do ciclo de vida do parasito em ambas as formas promastigota e amastigota, detectada de forma clara em cerca 10^6 células (Figura 52).

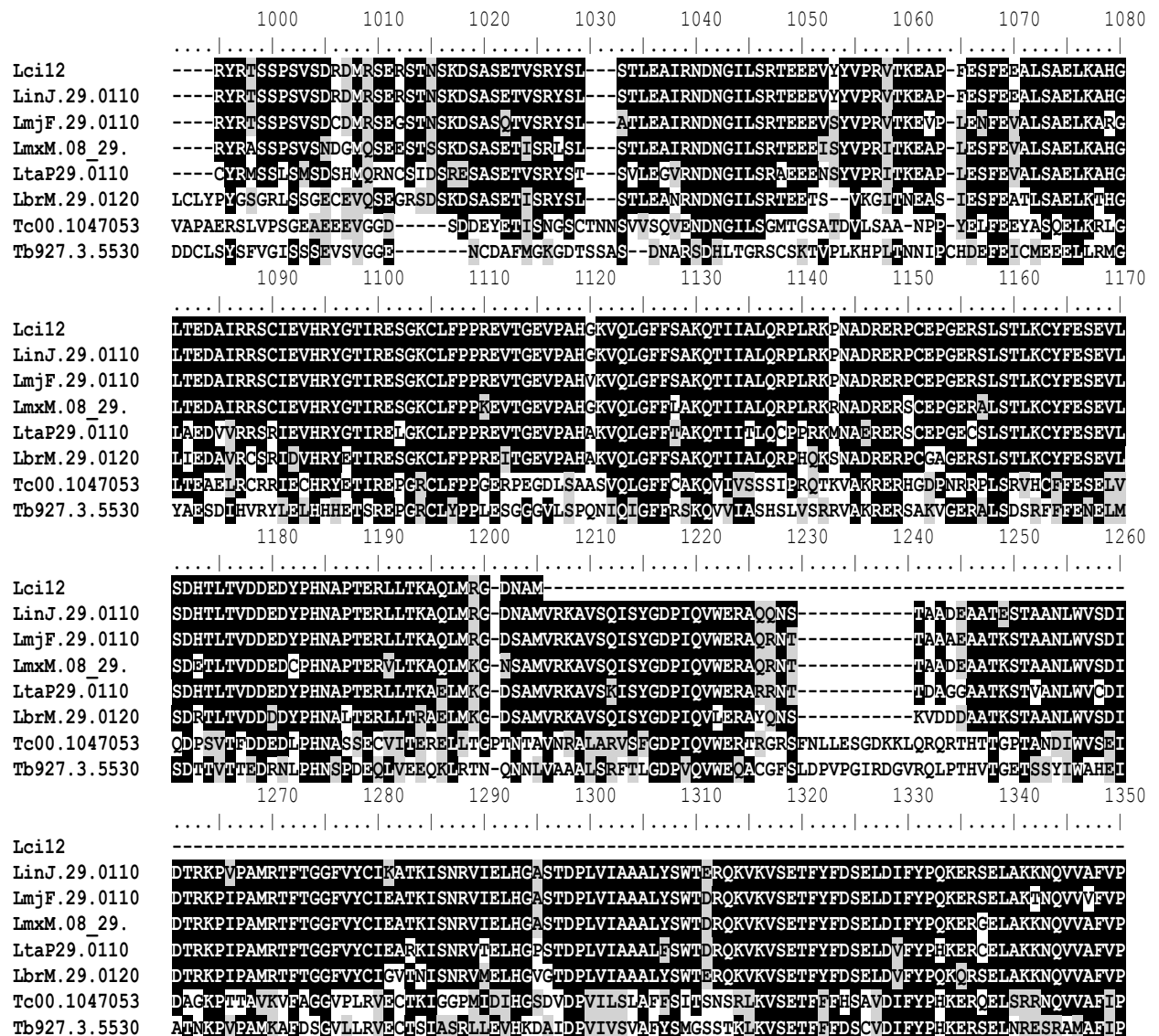


Figura 51: Alinhamento da proteína Lci12 de *L. infantum* e seus prováveis ortólogos na família Trypanosomatidae:

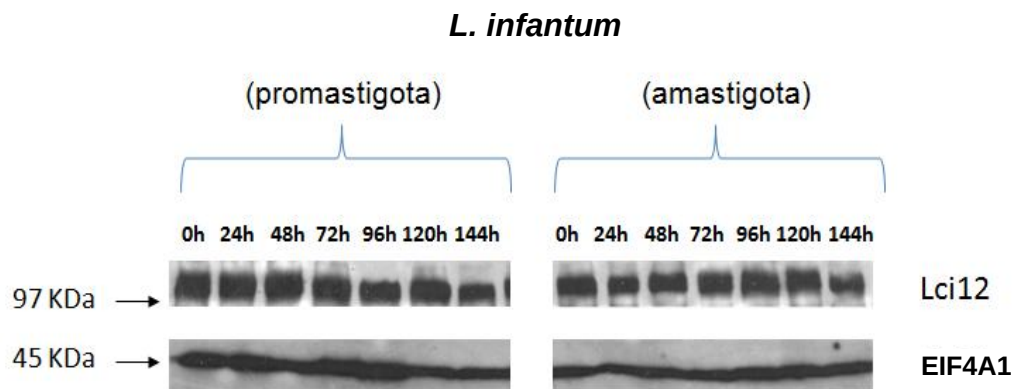


Figura 52: Análise da expressão da proteína Lci12 ao longo do ciclo de vida de *L. infantum*:

A proteína Lci12 se apresentou com expressão constante ao longo do ciclo de vida do parasito (nº de células 10x6)

A proteína Lci12 apresentou um reconhecimento conservado em extratos proteicos de parasitos da família Trypanosomatidae, apesar de um menor reconhecimento nas formas procíclica e sanguínea de *T. brucei* e em *L. tarentolae*. Em *Leishmania*, a proteína também apresentou o mesmo padrão de expressão nas formas amastigotas do parasito em *L. amazonensis* e *L. infantum* (Figura 53).

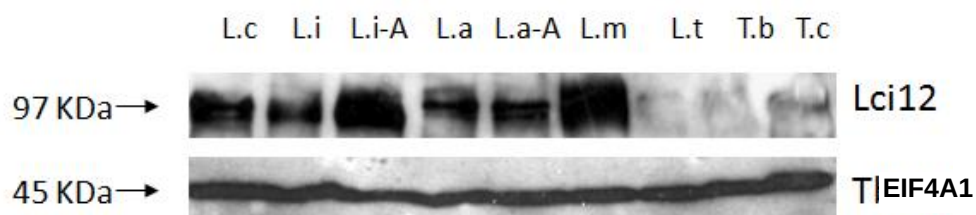


Figura 53: Comparação da expressão da proteína Lci12 na família Trypanosomatidae:

5.5.3 Localização subcelular da proteína Lci12.

Em ensaio de localização subcelular por imunofluorescência, a proteína Lci12 apresentou um padrão de localização citoplasmática, com concentração na região próxima a bolsa flagelar do parasito e região perinuclear, assim como seu ortólogo descrito em *T. brucei* (Lee, *et. al.*, 1994), nas formas amastigotas e promastigotas de *L. infantum*. A localização subcelular pode ser visualizada na figura 54.

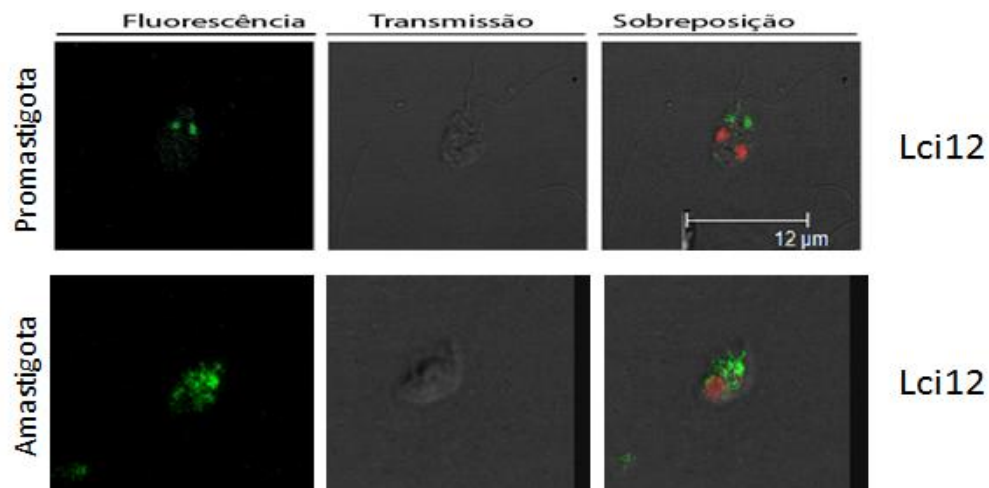


Figura 54: Localização celular da proteína Lci12 em *L. infantum*: A proteína Lci12 apresentou uma localização citoplasmática, tanto na forma promastigota quanto na forma amastigota do parasito, visualizadas através de imunofluorescência e utilização de soro policlonal.

Quando analisada em subfrações celulares, a proteína foi identificada nas frações membranas/organelas e também nas frações citoplasmáticas o que confirma sua co-localização na região perinuclear e na bolsa flagelar do parasito (Figuras 55 e 56).

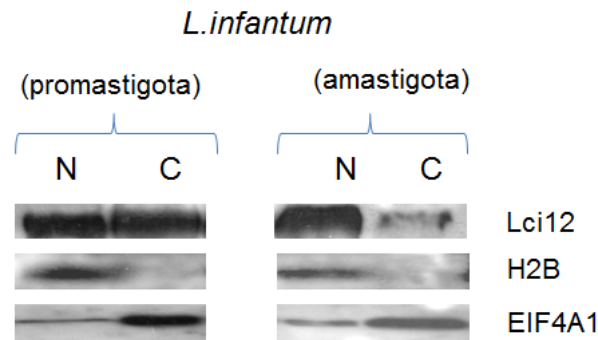


Figura 55: Localização subcelular da proteína Lci12 após fracionamento por ciclos de congelamento/descongelamento. A proteína Lci12 apresentou um padrão de localização em ambas as frações celulares,

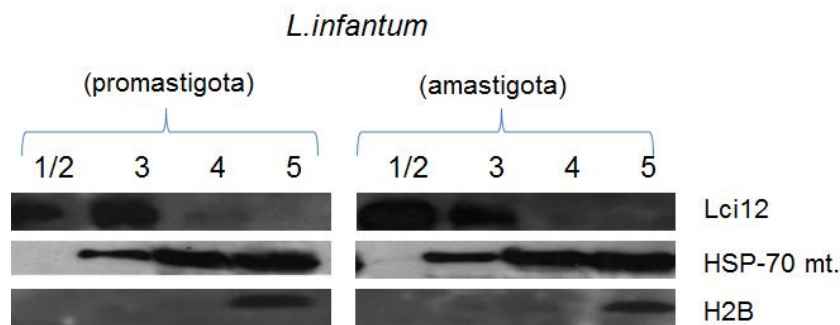


Figura 56: Localização subcelular da proteína Lci12 após fracionamento com gradiente de digitonina: A proteína Lci112 apresentou também um padrão de localização em frações correspondentes também a proteínas presentes em organelas ou em complexos proteicos

5.5.4 Análise da antigenicidade indireta da proteína Lci12

Na avaliação da antigenicidade foi testada apenas a proteína codificante Lci12-B, tendo em vista que esta apresentou um perfil de indução e purificação melhor do que a proteína Lci12-A e continha a região repetitiva da proteína. Quando analisada com soros dos cães com LV, a proteína apresentou sensibilidade de 90,70% (Figura 57 e Tabela 11). A proteína também foi testada quanto aos soros de cães com outras parasitoses, apresentando uma reação

cruzada de 34,78% com sete soros de cães com ehrlichiose e um soros de cão com babesiose. Estatisticamente a proteína se mostrou útil para avaliação de cães sabidamente doentes com valor de p, de 0,0001, quando comparamos o reconhecimento dos grupos de indivíduos doentes e saudáveis.

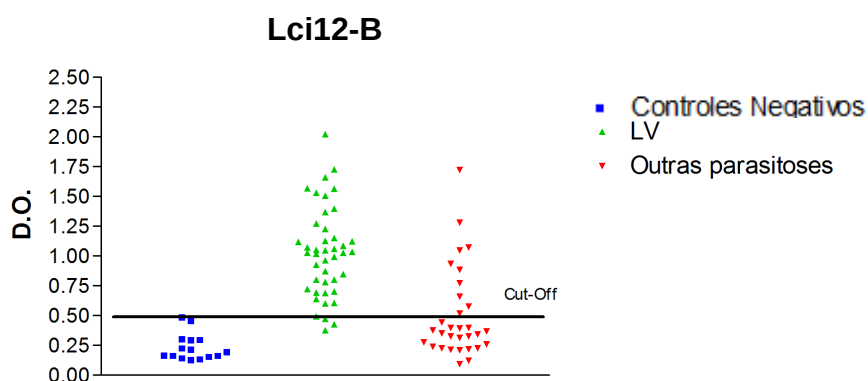


Figura 57: Gráfico do ELISA indireto para a proteína Lci12-B com soros caninos: Gráfico de dispersão com valores de absorbância do reconhecimento da proteína Lci12-A com soros caninos com LV e outras parasitoses.

Tabela 11: Análise estatística do desempenho da proteína Lci12-B no reconhecimento dos soros de cães acometidos e sadios para LV.

<i>Antígeno</i>	<i>Sensibilidade (Intervalo de confiança)</i>	<i>Especificidade (Intervalo de confiança)</i>	<i>Valor Preditivo Positivo (Intervalo de confiança)</i>	<i>Valor Preditivo Negativo (Intervalo de confiança)</i>
Lci12-B	90,70% (77,86% - 97,41%)	100% (78,20% - 100,00%)	100% (90,97% - 100,00%)	78,95% (54,43% - 93,95%)

Valor de p: Lci12-B =0,0001.

Em análise utilizando soros de humanos com LV, a proteína Lci12 apresentou sensibilidade de apenas 48% (Figura 58). Quanto às análises com soros de humanos com outras parasitoses, a proteína completa não apresentou reação cruzada com soros de humanos com Doença de Chagas nem com soros de humanos com Leishmaniose Tegumentar apesar da conservação da

sequencia nos organismos. Entretanto, como visto na análise da expressão da proteína, houve uma mínima expressão em *T. cruzi* reforçando a não ocorrência de reação cruzada. A proteína se mostrou útil, estatisticamente, para avaliação de humanos sabidamente doentes com valor de p, de 0,0001, (Tabela 12).

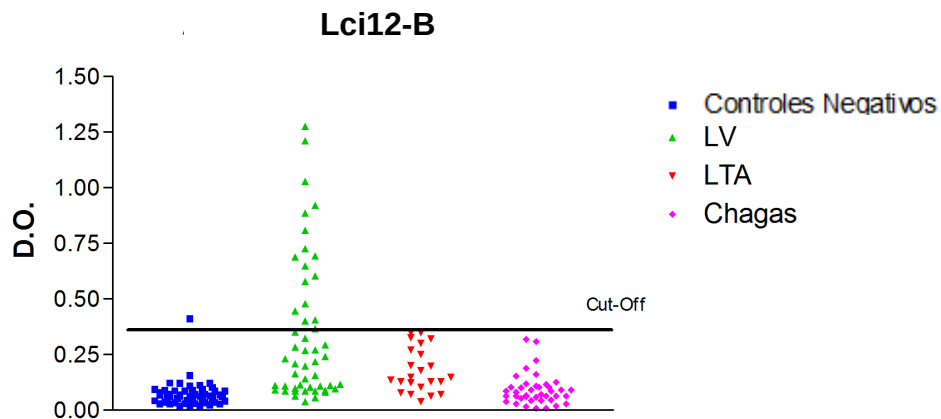


Figura 58: ELISA indireto da proteína Lci12-B com soros humanos: Gráfico de dispersão com valores de absorbância do reconhecimento da proteína Lci12-A com soros humanos com LV e outras parasitoses.

Tabela 12: Análise estatística do desempenho da proteína Lci12-B no reconhecimento dos soros humanos acometidos e sadios para LV.

<i>Antígeno</i>	<i>Sensibilidade (Intervalo de confiança)</i>	<i>Especificidade (Intervalo de confiança)</i>	<i>Valor Preditivo Positivo (Intervalo de confiança)</i>	<i>Valor Preditivo Negativo (Intervalo de confiança)</i>
Lci12-B	46% (31,81% - 60,68%)	98% (89,35% - 99,95%)	95,83% (78,88% - 99,89%)	64,47% (52,66% - 75,12%)

Valor de p: Lci12-B =0,0001.

5.6 Descrição das proteínas recombinantes e genes otimizados de *Leishmania infantum*.

Para uma análise mais completa e comparativa da antigenicidade das proteínas Lci10 e Lci12 foi selecionada também outra proteína, já descrita, denominada de Lci2 (OLIVEIRA, *et.al.*,2011). As Lci10 e Lci12 foram selecionadas por terem sido classificadas como as mais promissoras, apresentando sensibilidade variando de 80% a 91%, além da forte presença dos motivos repetitivos antigênicos nestas proteínas. A proteína Lci2 não foi incluída nos ensaios de caracterização, pois sua sequência já está bem caracterizada em bancos de dados sendo descrita como uma N-cinesina da família N-3 (segundo classificação proposta por MIKI *et. al*; 2001), previamente descrita em *L. infantum* e denominada de LcKin (BADARO, *et. al.*,1993).

As sequências codificantes das proteínas selecionadas foram utilizadas para análise dos motivos repetitivos e em seguida foram otimizadas através do programa LETO, quanto ao uso de códons preferenciais para expressão em eucariotos, uma vez que a finalidade maior destas proteínas era na utilização das mesmas em vacinas de DNA, e submetidas a síntese química dos respectivos fragmentos gênicos. Uma visualização esquemática das sequências geradas para cada uma destas três proteínas pode ser visualizada na figura 59.

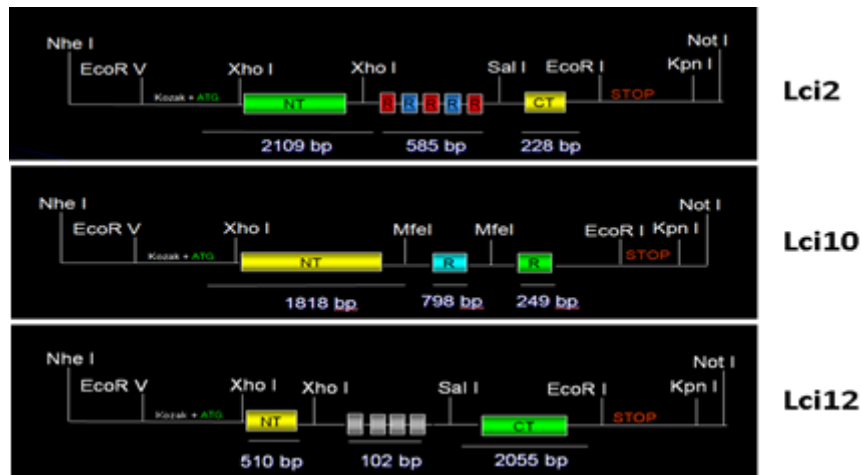


Figura 59: Imagem esquemática dos genes otimizados para expressão das proteínas Lci2, Lci10 e Lci12: O esquema detalha a composição dos genes otimizados com suas regiões repetitiva e não repetitivas.

5.6.1 Subclonagem e expressão das proteínas otimizadas de *L. infantum*.

A grande vantagem de utilização dos genes sintéticos descritos acima, e motivo de sua utilização nas abordagens sintéticas, foi a introdução de sítios de restrição que delimitam segmentos específicos, como aqueles que codificam as regiões com motivos repetitivos e não repetitivos das proteínas. A presença destes sítios permite de forma rápida e eficiente a subclonagem de fragmentos específicos que permitem avaliar propriedades específicas de regiões selecionadas. Neste sentido segmentos codificando para as proteínas completas e suas regiões repetitivas ou não repetitivas foram subclonadas em plasmídio de expressão para obtenção dos respectivos polipeptídeos recombinantes em *E. coli*.

Após confirmação das subclonagens, as diferentes proteínas recombinantes foram então expressas em células de *E. coli* e purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de resina de níquel, seguido de quantificação pelo método de Bradford. As proteínas completas Lci2 e Lci10

apresentaram, respectivamente, cerca de 105 KDa e 100 KDa. Não foi possível obter a proteína Lci12 otimizada completa, pois de alguma forma a proteína se tornou tóxica para as bactérias. Para comparação foi utilizada a proteína Lci12-B original. Já as subregiões Lci2-r (região repetitiva), Lci10-nr (região não repetitiva) e Lci12-r (região não-repetitiva) apresentaram respectivamente 35 KDa e 70 KDa (Figura 60).

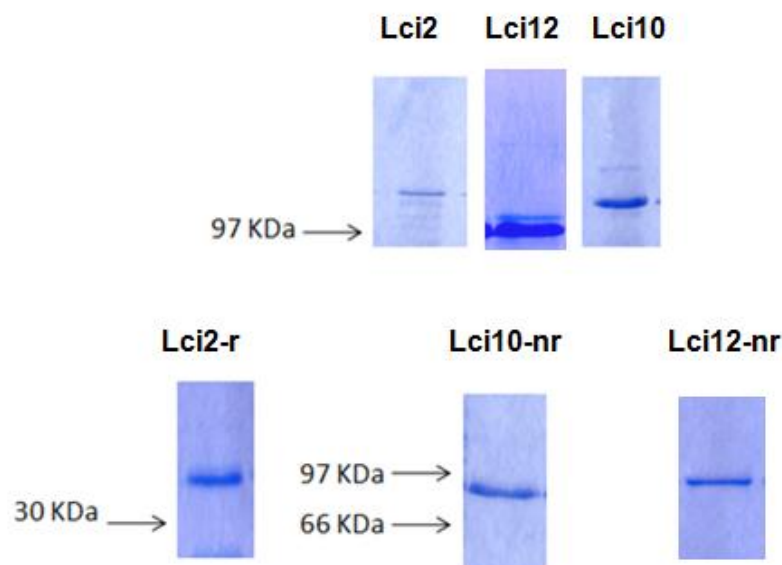


Figura 60: Expressão das proteínas sintéticas e sub-regiões: As proteínas otimizadas e suas regiões foram induzidas em sistema bacteriano, purificadas por cromatografia de afinidade e fracionadas em gel SDS-PAGE.

5.6.2 Análise da antigenicidade dos motivos repetitivos por ELISA.

Após adequada purificação e quantificação as proteínas geradas foram testadas com os soros de cães e humanos com Leishmaniose Visceral e amostras de soros controles, de indivíduos sadios. O *cut-off* das reações foi determinado através da média da absorbância dos controles negativos, acrescida de três desvios padrões. Os valores das sensibilidades e especificidades de cada proteína estão descritos nas tabelas 14 (soros humanos) e 13 (soros caninos).

A proteína Lci2 otimizada (Lci2ot) se mostrou mais antigênica nos soros caninos testados do que nos soros humanos (Figuras 60 e 61). A diferença de sensibilidade entre a proteína completa e apenas sua região repetitiva não foi estatisticamente significativa, sendo a região repetitiva sozinha capaz de identificar a maioria dos soros positivos tanto caninos quanto humanos (Tabela 13 e 14).

Já a proteína Lci10 otimizada (Lci10ot) também foi mais antigênica para os soros caninos do que humanos, entretanto a variação nas sensibilidades foi maior do que a observado para a proteína Lci2 (Figuras 60 e 61). A diferença de sensibilidade entre a proteína completa e apenas sua região não-repetitiva, com soros caninos, não foi estatisticamente significativa. Houve, entretanto, uma grande variação na sensibilidade quando testadas com soros humanos (Tabela 13 e 14).

A proteína Lci12, da mesma forma, foi mais antigênica para os soros caninos do que humanos, apresentando também uma grande variação nas sensibilidades para soros caninos e humanos (Figuras 60 e 61). Houve também uma grande variação na sensibilidade entre a proteína completa e apenas sua região não repetitiva quando testadas com soros humanos. Porém a diferença de sensibilidade, com soros caninos, não foi estatisticamente significativa (Tabela 13 e 14).

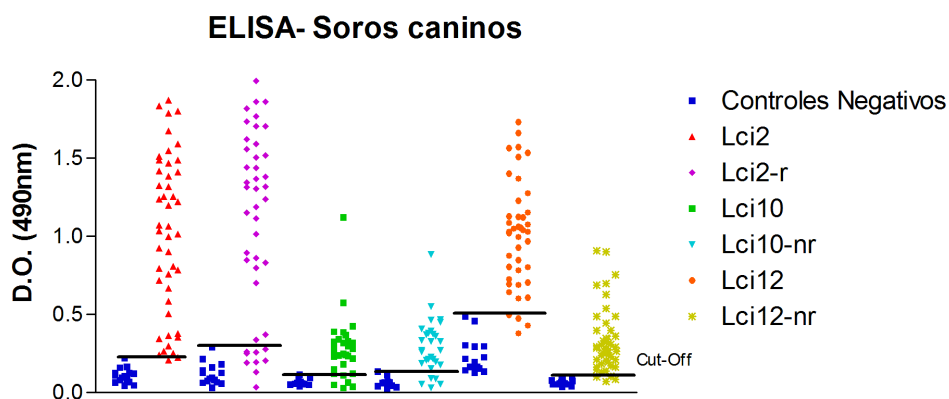


Figura 61: ELISA indireto das proteínas otimizadas com soros caninos: O gráfico de dispersão mostra as D.O.s dos soros analisados contras as proteínas otimizadas e suas frações repetitivas ou não.

Tabela 13: Descrição estatística do desempenho das proteínas otimizadas no reconhecimento dos soros caninos acometidos e sadios para LV.

<i>Antígeno</i>	<i>Sensibilidade</i> (Intervalo de confiança)	<i>Especificidade</i> (Intervalo de confiança)	<i>Valor Preditivo</i> <i>Positivo</i> (Intervalo de confiança)	<i>Valor Preditivo</i> <i>Negativo</i> (Intervalo de confiança)
Lci2ot	93,48% (82,10% - 98,63%)	100% (78,20% - 100,00%)	100% (91,78% - 100,00%)	76,92% (58,58% - 96,42%)
Lci2-r	80,43% (66,09% - 90,64%)	100% (78,20% - 100,00%)	100% (90,51% - 100,00%)	62,50% (40,59% - 81,20%)
Lci10ot	83,33% (65,28% - 94,36%)	100% (69,15% - 100,00%)	100% (86,28% - 100%)	66,67% (37,34% - 88,76%)
Lci10-nr	80% (61,43% - 92,29%)	100% (69,15% - 100,00%)	100% (85,75% - 100,00%)	62,50% (34,52% - 85,41%)
Lci12	90,70% (77,86% - 97,41%)	100% (78,20% - 100,00%)	100% (90,97% - 100,00%)	78,95% (54,43% - 93,95%)
Lci12-nr	93,48% (82,10% - 98,62%)	100% (78,20% - 100,00%)	100% (91,78% - 100,00%)	83,33% (58,58% - 96,42%)

Valores de $p=0,0001$

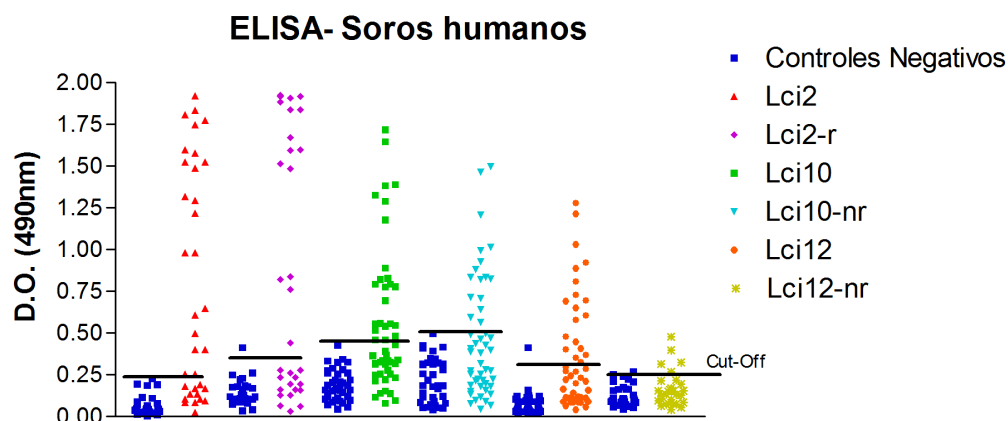


Figura 62: ELISA indireto das proteínas otimizadas com soros humanos: O gráfico de dispersão mostra as D.O.s dos soros humanos analisados com LV contras as proteínas otimizadas e suas frações obtidas..

Tabela 14: Descrição estatística do desempenho das proteínas otimizadas no reconhecimento dos soros humanos acometidos e sadios para LV.

<i>Antígeno</i>	<i>Sensibilidade</i> (Intervalo de confiança)	<i>Especificidade</i> (Intervalo de confiança)	<i>Valor Preditivo</i> <i>Positivo</i> (Intervalo de confiança)	<i>Valor Preditivo</i> <i>Negativo</i> (Intervalo de confiança)
Lci2ot	73,33% (54,11% to 87,72%)	100% (88,43% - 100,00%)	100% (84,56% to 100,00%)	78,95% (62,68% to 90,45%)
Lci2-r	66,67% (47,19% to 82,71%)	96,67% (82,78% to 99,92%)	95,24% (75,47% to 99,90%)	74,36% (57,87% to 86,96%)
Lci10ot	50% (35,53% - 64,47%)	100% (91,19% - 100,00%)	100% (86,28% - 100,00%)	61,54% (48,64% - 73,35%)
Lci10-nr	22% (11,53% - 35,96%)	100% (91,19% - 100,00%)	100% (71,51% - 100,00%)	50,63% (39,15% - 62,08%)
Lci12	46% (31,81% - 60,68%)	98% (85,38% - 99,95%)	95,83% (78,88% - 99,89%)	64,47% (52,66% - 75,12%)
Lci12-nr	16.67% (5,64% - 34,72%)	100% (88,43% to 100%)	100% (39,76% - 100%)	54,55% (40,55% - 68,03%)

Valores de p (teste do qui-quadrado): 0,0001 exceto Lci12-nr p=0,06 e Lci10-nr p=0,04

As proteínas sintéticas e suas frações mostraram um padrão distinto de antigenicidade frente ao seu reconhecimento por soros de cães e humanos com LV. De forma geral todas as proteínas se mostraram mais antigênicas em cães que em humanos. Dessa forma as proteínas devem ser usadas diferentemente no diagnóstico da LV humana e canina. Além disso não houve um consenso que pudesse determinar que as regiões repetitivas são as mais antigênicas das proteínas analisadas.

6. DISCUSSÃO

Os parasitos flagelados da família Trypanosomatidae são responsáveis por doenças infecciosas de grande impacto na saúde pública como a Doença do Sono, Doenças de Chagas e as diversas formas de Leishmanioses. Atualmente, o desenvolvimento de agentes quimioterápicos e vacinas eficazes que possam inibir ou impedir o desenvolvimento da doença em seres humanos e cães, além de bloquear a transmissão para o vetor, continua a ser um objetivo a se alcançar. Fatores como custo, toxicidade e resistência às drogas convencionais resultam em uma necessidade urgente de identificar e desenvolver novas alternativas terapêuticas (Croft e Olliaro, 2011; Srividya, 2012). Para este fim a compreensão da biologia dos parasitos é de fundamental importância para a identificação de novas estruturas e novos alvos. Em acréscimo a estas estratégias, o desenvolvimento de testes diagnósticos simples, econômicos, não-invasivos e com alta sensibilidade para o diagnóstico da LV permanece um desafio. Por esta razão muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos para identificar novos antígenos parasitários que possam ser utilizados no aperfeiçoamento das técnicas de diagnóstico, como também no desenvolvimento de vacina ou na identificação de novos alvos terapêuticos (Allahverdiyev, et al, 2005; Chappuis, et al, 2007, Srividya, 2012) . Esta tese se propôs a caracterizar cinco novas proteínas antigênicas de *L. infantum*, visto que algumas destas são inéditas, encontradas apenas em Tripanossomatídeos e ainda assim anotadas como proteínas hipotéticas. Além disto, se propôs também a caracterizar melhor a antigenicidade de algumas destas proteínas, pelo fato de sua maioria se apresentar ricas em domínios repetitivos em sua constituição.

Todas as proteínas avaliadas neste estudo, e outras, foram utilizadas na formalização de uma patente, tendo em vista que boa parte delas é hipotética, sem descrição em banco de dados e potencialmente antigênicas. As proteínas Lci2 e Lci5 já foram descritas quanto a sua antigenicidade em artigo, aceito para publicação recentemente (Oliveira, *et al*, 2011) e as demais devem ser incluídas em artigo a ser submetido em breve. Até o momento, porém, nenhum grupo de pesquisa realizou estudos sobre a caracterização destas proteínas em *L. infantum* nem sobre a antigenicidade de suas regiões repetitivas, o que torna este estudo inédito e de extrema importância.

Conservação de sequencia e expressão em diferentes espécies de tripanossomatídeos.

No que concerne a sua conservação em outros tripanossomatídeos, todas as proteínas avaliadas neste trabalho mostraram-se bem conservadas no gênero *Leishmania*, tanto nas análises de sequência quanto no reconhecimento das proteínas em extratos proteicos dos parasitos (a exceção da Lci5, não avaliada quanto a sua expressão). Os dados obtidos demonstram que as proteínas Lci5, Lci11 e Lci12 são bem conservadas ao nível de suas sequências em todas as espécies do gênero *Leishmania* avaliadas e podem desempenhar as mesmas funções. A proteína Lci11 em *Leishmania* sp pode apresentar também a função homóloga de 4E-BP que foi descrita para sua ortóloga em *L. amazonensis* (Zinoviev *et.al.*, 2011). O resultado para a proteína Lci11 também foi comprovado pelos imunoenaios em que esta proteína apresentou reações cruzada com soros de LTA. No gênero *Trypanosoma*, entretanto, estas proteínas apresentam

possíveis ortólogos pouco conservados, mas a baixa homologia foi suficiente para produzir reações cruzadas com soros de pacientes com Doença de Chagas. Já a proteína Lci10 se mostrou exclusiva do gênero *Leishmania*, sendo extremamente conservada, com exceção de sua ortóloga em *L. braziliensis* que apresentou baixa homologia de seqüência, dado também corroborado pela ausência de reação cruzada. A análise da proteína Lci9 apresentou dados curiosos, pois para uma proteína obtida de *L. infantum*, o respectivo gene não aparece descrito no genoma desta espécie, apenas descrito em *L. mexicana* e *L. major* e apresenta possíveis ortólogos bem pouco conservados em *Trypanosoma*. Entretanto, o soro obtido contra a proteína reconheceu estes ortólogos em todos os extratos testados e nos imunoenaios esta apresentou reação cruzada com soros de LTA e Doença de Chagas. Este é um dado novo que sugere que os genomas destes parasitos, ao menos os de *Leishmania* sp, merecem ser revistos em relação a esta proteína. Uma característica comum destes resultados é o fato que as proteínas apresentam em geral baixa similaridade de seqüência em *Trypanosoma* sp. Apesar do reconhecimento das proteínas ser um dado inédito sabe que *Leishmania* e *Trypanosoma* apresentam cerca de 40% de identidade de seqüências entre os genes codificantes (El-Sayed, *et al.*, 2005; Peacock, *et al.*, 2007; Choi e El-Sayed, 2012).

Localização subcelular, expressão e função proteica.

Os resultados obtidos na tese demonstram que as proteínas hipotéticas Lci5, Lci9, Lci10, Lci11 e Lci12, são expressas constitutivamente ao longo do ciclo de vida do parasito, em ambas as formas evolutivas e sugerem que suas funções não estão relacionadas a proteínas expressas em estágios específicos ou em

processos bioquímicos específicos na biologia destes. Dados não publicados do nosso grupo com ensaios de deleção (*Knock-out*) dos genes codificantes das proteínas Lci10, Lci11 e Lci12 sugerem que ao menos as Lci10 e Lci12 são essenciais para viabilidade celular dos parasitos, avaliadas na sua forma promastigota. Tanto a Lci10, como também a Lci11, apresentaram perfil de expressão com mais de uma banda característica. A proteína Lci10 apresentou múltiplas isoformas que podem ser ocasionadas por modificações pós traducionais do tipo fosforilação, modificação comprovada pelo ensaio de fosfoproteínas, o que não exclui outras modificações e sugere que sua função pode está regulada por este tipo de modificação. Já os resultados do perfil de duas bandas da proteína Lci11 sugere uma degradação ou clivagem de seu peptídeo-sinal na região N-terminal da proteína. Esse perfil também foi observado para seu ortólogo em *L. amazonensis* (Zinoviev, *et al.*, 2011).

Dados da literatura demonstram que sequências repetitivas em tandem em *Trypanosoma* normalmente são encontradas em proteínas que não parecem compartilhar características funcionais ou localizações similares (Katti *et al.*, 2000; Verstrepen, *et al.*, 2005; Goto, *et al.*, 2008). Os resultados desta tese são inéditos mas confirmam que as proteínas descritas de *L. infantum*, apesar de apresentarem características similares de alto peso molecular, regiões repetitivas e potencial antigênico, todas apresentaram padrão de localização bem diferenciado. Assim as proteínas Lci9 e Lci11 foram as únicas a apresentar um padrão de distribuição difuso ao longo do citoplasma, embora a proteína Lci11 tenha sido detectada em frações correspondentes a proteínas presentes em organelas, fato que pode ser explicado pela presença de um peptídeo sinal nesta proteína que sugere sua presença em organelas do Complexo de Golgi.

Curiosamente três destas proteínas apresentaram padrão pontual bem localizado nas células: Lci5 padrão flagelar; Lci10, padrão apical e basal da célula; Lci12 padrão basal da célula, próximo ao núcleo e bolsa flagelar. A localização unicamente flagelar e em pontos específicos da proteína Lci5 sugere que a mesma pode estar envolvida no transporte intracelular flagelar ou estar relacionada ao controle do desenvolvimento do próprio flagelo, assim como outras proteínas que se co-localizam nestes mesmos segmentos e exercem esta função, Kataninas (Abdille, *et al.*, 2008; Casanova, *et al.*, 2009). A proteína Lci10 pode estar associada à microtúbulos por se localizar em duas regiões ricas destas estruturas e co-localizar com proteínas associadas a estas (Gull, 1999; Mendoza-Leon, *et al.*, 1995; Kratzerova, *et al.*, 2001). Por serem hipotéticas não há dados na literatura que confirmem estas localizações com exceção da Lci12, cujos ortólogos em *Trypanosoma* sp, apresentam também uma localização perinuclear e na bolsa flagelar, sugerindo ainda que esteja associada a membrana (Lee, *et al.*, 1994). A co-localização da Lci12 em extratos protéicos de *Leishmania* referentes a organelas confirmam esta sugestão.

Antigenicidade das frações proteicas.

Os resultados obtidos nesta tese mostraram também um padrão distinto de antigenicidade das proteínas avaliadas frente ao seu reconhecimento por soros de cães e humanos com LV. De forma geral todas as proteínas se mostraram mais antigênicas (capazes de serem apresentadas como antígenos e ocasionar produção de anticorpos) estatisticamente em cães que em humanos, com exceção da proteína Lci5, mais antigênica em humanos. Nossos dados corroboram nossos resultados anteriores e dados da literatura, onde as mesmas

proteínas não podem ser usadas simultaneamente para humanos e cães tanto em técnicas de diagnósticos como na geração de vacina (Nakhaee *et al.*, 2004; Porrozzi *et al.*, 2007; Goto, *et al.* 2008). Quanto à análise de suas frações (repetitivas ou não) os dados foram bem divergentes. A diferença de alguns aminoácidos (8) na região C-terminal da proteína Lci5-A em relação a Lci5-B foi suficiente pra diminuir bastante o reconhecimento da proteína em cães, dado que não se repetiu para humanos. A utilização de um software para predição de regiões antigênicas (BCPRED) confere a esta região C-terminal uma maior antigenicidade, confirmando este resultado e demonstrando mais uma vez que a resposta imune entre cães e humanos é divergente. Os resultados do reconhecimento da proteína Lci9 demonstraram que a utilização de apenas sua região repetitiva N-terminal (Lci9-B) também diminuiu bastante a sensibilidade do teste comparado com a proteína completa (Lci-9A) que apresenta a região C-terminal também repetitiva. Os dados sugerem que todas as regiões das proteínas Lci5 e Lci9 contribuem para geração de anticorpos. Já os resultados obtidos para a proteína Lci10-A que apresenta a região repetitiva, e a Lci10-B (região não repetitiva) demonstraram que as repetições de aminoácidos não contribuem estatisticamente para a antigenicidade da proteína, apesar dos relatos da literatura que estas repetições tendem a aumentar a antigenicidade pelo grande número de sequencias e serem bem carregadas (De-Andrade, *et al.*, 1992; Sheiky, *et al.*, 1994; Goto, *et al.* 2008).

Em relação a reações cruzadas com outras parasitoses, todas as proteínas apresentaram reação cruzada com soros de cães com outras parasitoses (em especial ehrliquiose). Apesar de não terem sido, em sua maioria, os mesmos soros reconhecidos, e o soro destes cães terem dado negativos no

reconhecimento de extrato total do parasito, não se exclui a possibilidade destes terem tido contato prévio com *L. infantum*. Além disso, a presença de reação cruzada de proteínas deste parasito com os causadores destas outras parasitoses é comum em ensaios imunoenzimáticos (Da-Costa *et al.*, 1991; De Deus *et al.*, 2002). Quanto aos ensaios com soros humanos as proteínas Lci5, Lci10 e Lci12 se mostraram bons marcadores para diferenciar pacientes com LV e LTA, apesar destas proteínas serem conservadas em *Leishmania sp*, a *L. braziliensis* apresenta genoma mais divergente das demais (Peacock, *et al.*, 2007; Smith, *et al.*, 2007). As demais proteínas apresentaram também uma baixa reação cruzada pelo mesmo motivo com exceção da proteína Lci9 que apresentou uma grande reação cruzada, mas como descrito anteriormente, a proteína até o momento não existe em banco de dados de *Leishmania sp* com exceção de *L. amazonensis* e *L. major*. As proteínas Lci10 e Lci12 não apresentaram ainda reação cruzada com soros de pacientes com Doença de Chagas mostrando-se boas marcadoras para diferenciar estas três parasitoses. Já as proteínas Lci5, Lci9 e Lci11 apresentaram reações cruzadas com estes soros, dados também comprovados pelo reconhecimento destas proteínas em extratos de *T. cruzi* apesar da baixa identidade de sequencias entre as mesmas.

Nos ensaios utilizando as proteínas sintéticas a fim de identificar mais especificamente as regiões mais antigênicas, os dados de antigenicidade das regiões repetitivas também foram divergentes e diferentes dos encontrados para as proteínas nativas. Apesar destas proteínas também terem sido mais antigênicas em cães que humanos a antigenicidade das regiões repetitivas variou bastante. Para as proteínas Lci10ot e Lci12ot, os testes utilizando apenas a região não-repetitiva destas proteínas mostrou que a antigenicidade da proteína

diminui muito em humanos o que não é visto em cães, dados que sugerem que as regiões repetitivas são mais antigênicas em humanos que cães, com exceção da proteína Lci2 cuja região repetitiva sozinha é capaz de reconhecer quase a totalidade de soros humanos e caninos da mesma forma. Apesar de resultados promissores estes dados divergiram dos encontrados para as proteínas nativas. Dados na literatura sugerem que proteínas com alto peso molecular e repetitivas dificultam a ligação dos anticorpos com seus epítomos pela proximidade de muitas regiões de afinidade próximas umas das outras e por eventualmente esconder alguns epítomos (Umezawa, *et.al.*, 2004; Camussone, *et. al.*, 2009). Pelo fato das proteínas sintéticas apresentarem apenas poucas destas repetições e menor peso molecular pode ter ocorrido um reconhecimento melhor destes epítomos e um aumento da sensibilidade dos testes comprovando a antigenicidade dos motivos repetitivos mais em humanos do que em cães. Goto *et al*, 2009, revisaram a importância de motivos repetitivos serem capazes de ativarem sozinho linfócitos do tipo B, gerando assim resposta imune contra as mesmas sem a necessidade de apresentação antigênica. Os resultados da tese comprovam esta teoria e a antigenicidade destas proteínas repetitivas. Estes resultados também serviram de base para a dissertação do aluno Diego Tavares, cujo trabalho demonstrou que uma proteína quimérica contendo as regiões repetitivas das proteínas Lci2, Lci10 e ainda uma terceira não apresentada (Lci3) apresentaram sensibilidade de mais de 90% no reconhecimento da LV humana , devendo ainda ser testadas no reconhecimento da LV canina.

Os resultados deste trabalho de forma geral são novos e inéditos, e colaboram ainda mais para o conhecimento da biologia deste parasito, acrescentam informações ao projeto genoma e caracterizam novas proteínas que

possam vir a ter um papel no desenvolvimento de novos kits diagnósticos, vacinas ou possíveis novos alvos terapêuticos contra a LV. Alguns resultados desta tese foram publicados em um artigo científico e mais dois estão a ser submetidos com demais resultados. Estes também deram origem a um projeto de pós-doutorado em que serão construídas proteínas quiméricas com regiões destas proteínas estudadas para criação de um kit diagnóstico para LV humana e canina, projeto já com financiamento pelo CNPq.

7. CONCLUSÕES

- As proteínas Lci9, Lci10, Lci11 e Lci12 são expressas constitutivamente durante o ciclo de vida das formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum* e a Lci11 parece ser uma proteína secretada pela presença de peptídeo sinal;
- A proteína Lci10 é exclusiva das espécies de *Leishmania sp*, e pode ser regulada por fosforilação, enquanto as demais apresentam ortólogos em *Trypanosoma*, entretanto com baixa homologia de sequencias;
- As proteínas Lci5, Lci10 e Lci12 apresentaram localização citoplasmática pontual nos parasitas, respectivamente localização flagelar, apical e basal, basal nas células enquanto as proteínas Lci9 e Lci11 se distribuem por todo o citoplasma;
- As proteínas Lci5, Lci10 e Lci12 parecem ser associadas a estruturas entre elas: microtúbulos flagelares, microtúbulos de membrana celular citoplasmática e bolsa flagelar, respectivamente;
- Todas as proteínas apresentam maior sensibilidade em identificar soros caninos do que humanos com LV e suas regiões repetitivas parecem ser mais antigênicas em humanos que em cães;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdille MH, Li SY, Ding J e Suo X (2008) Trypanosoma evansi: Paraflagellar rod protein 1 and 2 are similar but lack common B cell epitopes. *Exp Parasitol* 120(4):411-6.
- Afonso LC e Scott P (1993). Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to Leishmania amazonensis. *Infect Immun* 61:2952–2959.
- Ahmed S et al. (2003) Intradermal Infection Model for Pathogenesis and Vaccine Studies of Murine Visceral Leishmaniasis. *Infect Immun* 71: 401-410.
- Akopyants NS et al. (2004) Expression profiling using random genomic DNA microarrays identifies differentially expressed genes associated with three major developmental stages of the protozoan parasite Leishmania major. *Mol. Biochem Parasitol* 136: 71–86.
- Alexander J e Bryson K (2005). T helper(h)1/Th2and Leishmania: paradoxratherthan paradigm. *Immunol Lett* 99: 17–23.
- Allahverdiyev AM, Bagirova M, Uzun S, Alabaz D, Aksaray N, Kocabas E e Koksall F (2005) The value of a new microculture method for diagnosis of visceral leishmaniasis by using bone marrow and peripheral blood. *Am J Trop Med Hyg* 73(2):276-80.
- Allred DR, McGuire TC, Palmer GH, Leib SR, Harkins TM, McElwain TF e Barbet AF (1990) Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in Anaplasma marginale. *Proc Natl Acad Sci* 87:3220–3224.
- Altamirano-Enciso AJ, Marzochi MC, Moreira JS, Schubach AO, Marzochi KB. (2003). On the origin and spread of cutaneous and mucosal leishmaniasis, based on pre- and post- colombian historical source. *Hist. Cienc. Saude Manguinhos* 10(3):852-882.
- Alvar J, et al. (2008) The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* 21:334–59.
- Alves WA e Bevilacqua PD (2004). Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997]. *Cadernos de saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública* 20: 259–265.
- Alves WA, Maia-Elkhoury ANS, Oliveira GM e Sousa-gomes ML (2006). Análise dos óbitos de leishmaniose visceral em municípios brasileiros, 2003. *XLII Congresso Brasileiro de Medicina Tropical*.
- Antinori S, et al. (2007) Post-kala-azar dermal leishmaniasis as na immune reconstitution inflammatory syndrome in a patient with acquired immune deficiency syndrome. *Br J Dermatol* 157:1032–6.
- Araújo MS, et. al. (2009). T-cell-derived cytokines, nitric oxide production by peripheral blood monocytes and seric anti-Leishmania (Leishmania) chagasi IgG subclass patterns following immunization against canine visceral leishmaniasis using Leishvaccine and Leishmune((R)). *Vaccine*. 27(7):1008-1017.
- Awasthi,A., Mathur,R.K., and Saha,B. (2004) Immune response to Leishmania infection. *Indian J Med Res* 119: 238-258.

- Azevedo AC et al. (1996). The sand fly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of a focus of cutaneous Leishmaniasis in Ilheus, state of Bahia, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1:75-79.
- Baneth G, Koutinas Af, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. (2008). Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol* 24(7):324-330.
- Basano AS e camargo LM. (2004). A Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Rev. Bras. Epidemiol* 3: 328-337.
- Basu R, Bhaumik S, Basu Jm, Naskar Kt, Roy S. (2005). Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and -resistant strains of *Leishmania donovani* that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evidence for mixed Th1- and Th2-like responses in visceral leishmaniasis. *J Immunol* 174:7160–7171.
- Bates PA e Ashford RW (2006). Old World leishmaniasis. *Parasitology* 283–312.
- Bates PA (2007) Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol* 37(10):1097-106.
- Bepa (2009) Leishmaniose visceral americana: situação atual no Brasil. *Boletim Epidemiológico* 71:25-29.
- Besteiro S, Williams RA, Morrison LS, Coombs GH e Mottram JC (2006) Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of *Leishmania major*. *J Biol Chem* 281:11384-11396.
- Besteiro S, Williams RA, Coombs GH e Mottram JC(2007) Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol* 37: 1063-1075.
- Bhatia A, Daifalla NS, Jen S, Badaro R, Reed SG e Skeiky YA (1999) Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26:two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasitol*102:249–261.
- Bhattacharya SK, Sur D e Karbwang J. (2006a) Childhood visceral leishmaniasis. *Indian J Med Res* 123:353–356.
- Bhattacharya SK, Sur D, Sinha PK e Karbwang J (2006b) Elimination of leishmaniasis (kala-azar) from the Indian subcontinent is technically feasible & operationally achievable. *Indian J Med Res* 123:195–196.
- Brandão-Filho SP. et al. (1994). American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, Brazil: Eco-epidemiological aspects in 'Zona da Mata' region. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 3:445-449.
- Brasil (2006). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em saúde. Departamento de Epidemiologia. Leishmaniose Visceral Grave Leishmaniose Normas e condutas 1° ed. Brasília
- Brasil (2009). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em saúde. Departamento de Epidemiologia. Guia de Vigilância Epidemiológica 7° ed. Brasília.
- Brasil (2011). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em saúde. Departament de Epidemiologia. Leishmaniose Visceral Recomendações Clínicas para redução da letalidade 1° ed. Brasília.
- Burns JM, Shreffler WG, Rosman DE, Sleath PR, March CJ e Reed SG (1992) Identification and synthesis of a major conserved antigenic epitope of *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci* 89:1239–1243.

- Camargo LMA e Barcinski MA (2003) Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. *Ciênc. Cult* 1:34-37.
- Campino L e Maia C (2010). [Epidemiology of leishmaniasis in Portugal]. *Acta Pédica Portuguesa* 23:859–864.
- Camussone C, Gonzalez V, Belluzo MS, Pujato N, Ribone ME, Lagier CM e Marcipar IS.(2009) Comparison of recombinant *Trypanosoma cruzi* peptide mixtures versus multiepitope chimeric proteins as sensitizing antigens for immunodiagnosis. *Clin Vaccine Immunol.*16(6):899-905.
- Carvalho SFG. (2000) Utilização de baixas doses de desoxicolato de anfotericina B no tratamento da Leishmaniose Visceral em crianças e adolescentes. Universidade Federal de Minas Gerais, 107 p.
- Carvalho, F. A. A., Charest, H., Tavares, C. A. P., Matlashewski, G., Valente, E. P., Rabello, A., Gazzinelli, R. T., e Fernandes, A. P. (2002). Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 43, 289–295.
- Carvalho SFG, Lemos EM, Corey R e Dietze R (2003). Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 68:321–324.
- Casanova M, Crobu L, Blaineau C, Bourgeois N, Bastien P e Pagès M (2009) Microtubule-severing proteins are involved in flagellar length control and mitosis in Trypanosomatids. *Mol Microbiol* 71(6):1353-70. Centers for Disease Control & Prevention (CDC) (2008) Leishmaniasis. <http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/Leishmaniasis.htm> (12 de Maio, 2008). Acesso em Dezembro de 2014.
- Chappuis F, Rijal S, Soto A, Menten J e Boelaert M (2006). A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *BMJ (Clinical research ed.)* 333, 723..
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J e Boelaert M (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature reviews. Microbiology* 5:873–882.
- Chargui N, et al. (2009) Population structure of Tunisian *Leishmania infantum* and evidence for the existence of hybrids and gene flow between genetically different populations. *Int J Parasitol* 39: 801–811.
- Coler RN et al. (2002). Immunization with a polyprotein vaccine consisting of the T-Cell antigens thiol-specific antioxidant, *Leishmania major* stress-inducible protein 1, and *Leishmania* elongation initiation factor protects against leishmaniasis, *Infect. Immun.* 70:4215–4225.
- Coler RN, Goto Y, Bogatzki L, Raman V, Reed SG. (2007). Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral Leishmaniasis by elicitation of CD4+ T cells. *Infect Immun* 75:4648–4654.
- Costa, CHN. et al. (2007) Kala-azar is a slow-motion systemic inflammatory response syndrome: lessons from death. In: International Congress Of Immunology, 13, Aug. 21-25, Rio de Janeiro, Brazil.
- Costa JML. et al. (1995). Visceral Leishmaniasis in the State of Maranhão, Brazil: Evolution of an Epidemic. *Cad. Saúde Pub* 2: 321-324.
- Coupiè, P., et al. (2004) Comparative study of cutaneous leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients and non-HIV-infected patients in French Guiana. *Br J Dermatol.* 151:1165-1171.

- Croft SL e Oliaro P (2011). Leishmaniasis chemotherapy--challenges and opportunities. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17:1478–1483.
- Da Costa CA, Genaro O, De Lana M, Magalhães PA, Dias M, Michalick MS, Melo MN, Da Costa RT, Magalhães-Rocha NM e Mayrink W(1991) [Canine visceral leishmaniasis: evaluation of the serologic method used in epidemiologic studies]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 24(1):21-5.
- Dantas-Torres F e Brandão-Filho SP (2005). Distribuição espacial da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco, nordeste do Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38:411-412.
- David CV e Craft N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther* 22:491–502.
- De Andrade CR, Kirchhoff LV, Donelson JE e Otsu K (1992). Recombinant Leishmania Hsp90 and Hsp70 are recognized by sera from visceral leishmaniasis patients but not Chagas' disease patients. *J. Clin. Microbiol.* 30:330–335.
- De Deus RB et al.(2002) Leishmania majorlike antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 9:1361-1366.
- De Oliveira CI e Brodskyn CI. (2012)The immunobiology of Leishmania braziliensis infection. *Front Immunol* 3:145
- Den Boer M, Argaw D, Jannin J e Alvar J (2011) Leishmaniasis impact and treatment access. *Clin Microbiol Infect.* 17(10):1471-7.
- Desjeux P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 5:305-318.
- Dey A e Singh S (2007) Genetic heterogeneity among visceral and post-Kala-Azar dermal leishmaniasis strains from eastern India. *Infect Genet Evol.* 7(2):219-22.
- Dourado ZF, Silva HD e Silveira EDP (2007). Panorama Histórico do Diagnóstico Laboratorial da Leishmaniose Visceral até o Surgimento dos Testes Imunocromatográficos (rK39). *Revista de Patologia Tropical* 36, 205–214..
- El-Sayed NM et al.(2005) Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* 309: 404–409.
- Evans KJ e Kedzierski L (2012). Development of Vaccines against Visceral Leishmaniasis. *Journal of Tropical Medicine* 89:281-7.
- Fernandes AP, et al. (2008) Protective immunity against challenge with Leishmania (Leishmania) chagasi in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine* 26:5888-95.
- Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). (2000)Leishmaniose Visceral. <http://www.insecta.ufv.br/Entomologia/ent/disciplina/ban%20160/Importancia%20medica/Leishmaniose%20Visceral.doc>. Acesso em dezembro de 2011.
- GENARO O. (2002).Leishmaniose Tegumentar Americana.. In: NEVES DP, Parasitologia Humana. 10ª Edição , Editora Atheneu , São Paulo, cap. 8, p. 36-53.
- Ginger ML, Portman N e McKean PG (2009) Swimming with protists: perception, motility and flagellum assembly. *Nature Reviews* 6:838-850.
- Gluenz E, Ginger ML e McKean PG (2010) Flagellum assembly and function during the Leishmania life cycle. *Curr Opin Microbiol.*13(4):473-9.

- Gontijo B. e De Carvalho ML. (2003). American cutaneous leishmaniasis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1:71-80.
- Gontijo CMF e Melo MN (2004). Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev. Bras. Epidemiol.* 3:338-349.
- Gomes YM, Paiva-Cavalcanti M, Lira RA, Abath FGC e Alves LC (2008). Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Veterinary Journal* 175:45–52.
- Goto H e Lindoso JAL (2010). Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert review of Anti-Infective Therapy* 8, 419–433.
- Goto H e Lauletta Lindoso JA. (2012) Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am* 26:293–307.
- Goto Y, Coler RN, Guderian J, Mohamath R e Reed SG (2006). Cloning, characterization, and serodiagnostic evaluation of *Leishmania infantum* tandem repeat proteins. *Infect. Immun.* 74:3939–3945.
- Goto Y, Coler RN e Reed SG (2007) Bioinformatic identification of tandem repeat antigens of the *Leishmania donovani* complex. *Infect. Immun.* 75:846–851.
- Grimaldi G, Teva A, Ferreira AL, Dos Santos CB, Pinto IS, de-Azevedo CT, e Falqueto A (2012) Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP(R) CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 106:54-59.
- Grimaldi G e Tresh RB (1993) Leishmaniosis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin. Microbiol. Rev.* 6:230-250.
- Gull K. (1999) The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. *Annu Rev Microbiol* 53:629–53.
- Himmelrich H, Launois P, Maillard I, Biedermann T, Tacchini-Cottier F, Locksley RM, Rocken M, e Louis JA (2000). In BALB/c mice, IL-4 production during the initial phase of infection with *Leishmania major* is necessary and sufficient to instruct Th2 cell development resulting in progressive disease. *J Immunol.* 164(9):4819-25.
- Ikeda-Garcia FA et al. (2007) Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Vet. Parasitol.* 143:254–259.
- Ikonomopoulos J et al. (2003). Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the propose assay on clinical samples. *Vet. Parasitol* 113: 99-113.
- Katti MV, Sami-Subbu R, Ranjekar PK e Gupta VS (2000). Amino acid repeat patterns in protein sequences: their diversity and structural functional implications. *Protein Sci.* 9:1203–1209.
- Kaye PM e Aebischer T (2011). Visceral leishmaniasis: immunology and prospects for a vaccine. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17:1462–1470.
- Kedzierski L (2011) Leishmaniasis. *Human vaccines* 11:1204-1214.
- Kedzierski L, Zhu Y e Handman E. (2006). *Leishmania* vaccines: progress and problems. *Parasitology.* 133: 87-112.
- Khamesipour A, Rafati S, Davoudi N, Maboudi F, Modabber F. (2006). Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. *Indian J. Med. Res* 123(3):423-38.

- Kratzerová L, Dráberová E, Juliano C, Viklický V, Fiori PL, Cappuccinelli P e Dráber P (2001) Cell cycle-dependent changes in localization of a 210-kDa microtubule-interacting protein in *Leishmania*. *Exp Cell Res*.266(2):270-8.
- Kringelum JV, Lundegaard C, Lund O e Nielsen M. (2012) Reliable B cell epitope predictions: impacts of method development and improved benchmarking. *PLoS Comput Biol*. 8(12):e1002829.
- Kuhls K, et al. (2007) Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. *Microbes Infect* 9: 334–343.
- Kubar J e Fragaki K (2005). Recombinant DNA-derived leishmania proteins: from the laboratory to the field. *Lancet Infect Dis* 5:107–114.
- Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, Ferreira GEM, Mauricio IL, Oddone R, Feliciangeli MD, Wirth T, Miles MA, e Schönián G (2011). Comparative microsatellite typing of new world leishmania infantum reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5, e1155.
- Lafaille JJ, Linss J, Krieger MA, Souto-Padron de Souza TW e Goldenberg S. (1989). Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. *Mol. Biochem. Parasitol*.35:127–136.
- Lainson R. E Rangel EF. (2005). *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 8: 811-827.
- Lainson R e Shaw JJ (2006). New World leishmaniasis. *Microbiology & Microbial Infections*, ed. Parasitology, Hodder Arnold, Londres, pp. 313–349.
- Landfear SM, Ignatushchenko M. (2001) The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol*. 115(1):1-17.
- Lemesre JL, Holzmüller P, Cavaleyra M, Gonçalves RB, Hottin G e Papierok G. (2005). Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes. *Vaccine*.22:2825-2840.
- Lemesre JL, Holzmüller P, Gonçalves RB, Bourdoiseau G, Hugnet C, Cavaleyra M e Papierok G. (2007). Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomised efficacy field trial. *Vaccine*. 25(21). :4223-4234.
- Leônidas S. et al.(2002). A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and sorology in Greece. *Vet. Parasitol* 109:19-27.
- Lodge R, Ouellet M, Barat C, Andreani G, Kumar P e Tremblay MJ. (2012) HIV-1 promotes intake of *Leishmania* parasites by enhancing phosphatidylserine-mediated, CD91/LRP-1-dependent phagocytosis in human macrophages. *PLoS One*. 7(3):e32761.
- Lukes J, et al. (2007). Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:9375–9380.
- Maia-elkhoury ANS e Sena JMD (2008). Visceral leishmaniasis in Brazil : trends and challenges Leishmaniose visceral no Brasil : Evolução e Desafios. *Cad. Saúde Pública* 24, 2941–2947.

- Maia, Z., Lirio M, Mistro S, Mendes CM, Mehta SR e Badaro R (2012) Comparative study of rK39 Leishmania antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis. PLoS. Negl. Trop. Dis. 6:1484-5.
- Marcondes M, de Lima VM, de Araújo Mde F, Hiramoto RM, Tolezano JE, Vieira RF e Biondo AW (2013) Longitudinal analysis of serological tests officially adopted by the Brazilian Ministry of Health for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in dogs vaccinated with Leishmune®. Vet Parasitol 8;197(3-4):649-52.
- Maurya R, Mehrotra S, Prajapati VK, Nylén S, Sacks D e Sundar S. (2010) . Evaluation of blood agar microtiter plates for culturing leishmania parasites to titrate parasite burden in spleen and peripheral blood of patients with visceral leishmaniasis. J Clin Microbiol. 48(5):1932-4.
- McGwire BS e Satoskar AR (2013) Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. QJM. 107(1):7-14. Melby PC, Yang J, Zhao W, Perez LE e Cheng J. (2001). Leishmania donovani p36(LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis, Infect. Immun 69: 4719–4725.
- McMahon-Pratt D e Alexander J (2004) Does the Leishmania major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? Immunol Rev 201:206–224.
- Mendoza-Leon A, Havercroft JC e Barker DC (1995). The RFLP analysis of the beta-tubulin gene region in New World Leishmania. Parasitology 111, 1–9.
- Michalick MSM. (2002). Gênero Leishmania. In: NEVES DP Parasitologia Humana, 10ª Edição. Atheneu, São Paulo, cap. 7, p. 31-35.
- Ministério Da Saúde (2006). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. p.1-120.
- Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G. (2008). Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. Trends Parasitol. 24(8):371-377.
- Mishra M, Biswas UK, Jha AM, Khan AB (1994) Amphotericin versus sodium stibogluconate in first-line treatment of Indian kala-azar. Lancet. 10;344(8937):1599-600.
- Momen H e Cupolillo E (2000). Speculations on the origin and evolution of the genus Leishmania. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. v. 95, n. 4. p. 583-588.
- Moreira MA, et al. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. Veterinary Parasitology 145: 245–52.
- Mukbel RM, Patten Jr C; Gibson K; Ghosh, M; Petersen C e Jones DE (2007) Macrophage killing of Leishmania amazonensis amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. Am. J. Trop. Med. Hyg. 76:669–675.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG (2005) Advances in leishmaniasis. Lancet. v. 366: 1561-1577.
- Mutebi Jp. (1999). Breeding structure of the sand fly Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva) in Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg. 61:149-157.
- Nakhaee A, Taheri T, Taghikhani M, Mohebbi M, Salmanian AH, Fasel N, Rafati S. (2011) Humoral and cellular immune responses against Type I cysteine proteinase of Leishmania infantum are higher in asymptomatic than symptomatic dogs selected from a naturally infected population.

- Neves, D. P. (2011). *Parasitologia Humana* 12th ed. (Atheneu).
- Noli C; Auxilia ST(2005) Treatment of canine old world visceral leishmaniasis: a systematic review. *Veterinary Dermatology*. 2005, 16. p.213-232
- Oliveira AP, Castro MCAB, Almeida AF, Souza MA, Oliveira BC, Goto H, Brito ME, Celeste BJ, Martins-Filho AO e Pereira VR. (2012) Comparison of Flow Cytometry and Indirect Immunofluorescence Assay in the Diagnosis and Cure Criterion after Therapy of American Tegumentary Leishmaniasis by Anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* Immunoglobulin G. *J.Immunol*. 31;387(1-2):245-53.
- Oliveira-Freitas E. et al. (2006). Acylated and deacylated saponins of *Quillaja saponaria* mixture as adjuvants for the FML-vaccine against visceral leishmaniasis, *Vaccine* v. 24 p. 3909–3920.
- Oliveira GGS, et al. (2011). Characterization of novel *Leishmania infantum* recombinant proteins encoded by genes from five families with distinct capacities for serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 85, 1025–1034.
- Pais FS, Darocha WD, Almeida RM, Leclercq SY, Penido ML, Fragoso SP, Bartholomeu DC, Gazzinelli RT e Teixeira SM (2008). Molecular characterization of ribonucleoproteic antigens containing repeated amino acid sequences from *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect*. 10:716–725.
- Palatnik-de-sousa CB. et al, (2004). Protective vaccination against murine visceral leishmaniasis using aldehyde-containing *Quillaja saponaria* sapogenins, *Vaccine*. 22 (19). p. 2470–2479.
- Palatnik-de-Sousa CB. (2008). Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine*. v.26(14). p.1709-1724.
- Palatnik-de-Sousa, C. B., e Day, M. J. (2011). One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasites & Vectors* 4, 197.
- Peacock CS, Seeger K, Harris D, et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet* 2007;39: 839–847.
- Plevraki K et al. (2006) Effects of allopurinol treatment on the progression of chronic nephritis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). *J. Vet. Intern. Med*. 20, 228–233.
- Porrozzi R, et al (2007) Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clin Vaccine Immunol*. 14(5):544-8.
- Ramos CS. et al. (2004). Characterisation of a new *Leishmania* META gene and genomic analysis of the META cluster. *FEMS Microbiol. Lett*. 238: 213–219.
- Ramos-e-Silva M e Jacques CMC. (2002). Leishmaniasis and other Dermatozoonoses in Brazil. *Clin. Dermatol*. 20: 122-134.
- Reed SG, Shreffler WG, Burns JM Jr, Scott JM, G Orge Mda, Ghalib HW, Siddig M, Badaro R (1990) An improved serodiagnostic procedure for visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Méd. Hyg*. 43: 632-639.
- Reithinger R, Dujardin J, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S, Washington G, Leopold P, Bailey MS e Lockwood DNJ (2007) Cutaneous leishmaniasis. *Clinics in Dermatology* 25: 203–211.
- Resende DM, et al. (2008) Epitope mapping and protective immunity elicited by adenovirus expressing the *Leishmania* amastigotespecific A2 antigen:

- correlation with IFN γ and cytolytic activity by CD8 + T cells. *Vaccine* 26:4585-93.
- Rey L (2008a) Leishmaníases Cutâneas e Mucocutâneas do Novo Mundo. In REY L Bases da Parasitologia Médica, 2ª edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, cap. 5, p. 55-62.
- Rey L (2008b) Leishmaníase Visceral. In REY L Bases da Parasitologia Médica, 2ª edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, cap. 6, p. 63-70.
- Roberts LS e Janovy-JR, J. (1996) In: ROBERTS, L. S. e JANOVY-JR, J Foundations of Parasitology. 5ª edição. Wm C Brown publishers, Dubuque, p. 53-55; 68-80.
- Rogers, M.E., Chance, M.L., Bates, P.A., 2002. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology* 124, 495–508.
- Rosenthal E, et al. (2000) HIV and leishmania coinfection: a review of 91 cases with focus on atypical locations of leishmania. *Clin Infect Dis* 31:1093–5.
- Sacks D e Noben-Trauth N(2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat.Rev.Immunol.* 2:845–858.
- Santos DO, et al. (2008). Leishmaniasis treatment--a challenge that remains: *Parasitology Research* 103:1–10.
- Saridomichelakis MN (2009) Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications *Vet Dermatol.* 20(5-6):471-89.
- Scharton-Kersten T e Scott P (1995) The role of the innate immune response in Th1 cell development following *Leishmania major* infection. *J. Leukoc.Biol.* 57:515–522.
- Secundino NF, Eger-Mangrich I, Braga EM, Santoro MM, Pimenta PF(2005) *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure and chemical composition. *J Med Entomol* 42:928–938.
- Seridi N, et al. (2008) Genetic polymorphism of Algerian *Leishmania infantum* strains revealed by multilocus microsatellite analysis. *Microbes Infect* 10: 1309–1315.
- Shaw JJ (1994) Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 89:471– 478.
- Silverman MA e Leroux MR (2009) Intraflagellar transport and the generation of dynamic, structurally and functionally diverse cilia. *Trends Cell Biol* 2009, 19:306-316.
- Singh N, Kumar M e Kumar R (2012) Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pac J Trop Med.* 5(6):485-97.
- Skeiky YA, Benson DR, Elwasila M, Badaro R, Burns JM, Jr., e Reed SG (1994) . Antigens shared by *Leishmania* species and *Trypanosoma cruzi*: immunological comparison of the acidic ribosomal P0 proteins. *Infect. Immun.* 62:1643–1651.
- Singh S. (2006). New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J. Med. Res.* 123:311-330.
- Singh S, Sharma U e Mishra J(2011). Post-kala-azar dermal leishmaniasis: recent developments. *Int J Dermatol.* 50(9):1099-108.
- Sistema de Informações de Agravos de Notificações (SINAN). Casos confirmados de Leishmaniose Visceral B, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2009 (2011) Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde; 2011.

- Smith DF, Peacock CS e Cruz AK. (2007) Comparative genomics: from genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. *Int J Parasitol*;37: 1173–1186.
- Soong L. (2012) Subversion and Utilization of Host Innate Defense by *Leishmania amazonensis*. *Front Immunol*. 21:3:58.
- Souza AE, Bates PA, Coombs GH e Mottram JC(1994) Null mutants for the *Imcpa* cysteine proteinase gene in *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol*. 63(2):213-220.
- Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S e Sundar S (2011) Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 105:1–6.
- Srividya G, Kulshrestha A, Singh R e Salotra P (2012) Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. *Parasitol Res*110(3):1065-78.
- Sukumaran B, Tewary P, Saxena S e Madhubala R (2003) Vaccination with DNA encoding ORFF antigen confers protective immunity in mice infected with *Leishmania donovani*, *Vaccine*. 21:1292–1299.
- Sundar S, Kumar K, Singh VP e Mahopatra TM (1991). Diagnostic lag period in kala-azar: test for early diagnosis needed. *J. Assoc. Physicians India*. 39(8):651.
- Sundar S e Rai M (2002) Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*. 9:951-958.
- Tacchini-Cottier F, Weinkopff T e Launois P (2012) Does T helper differentiation correlate with resistance or susceptibility to infection with *L. major*? Some insights from the murine model. *Frontiers Immunol* 3:1–9.
- Teixeira MC, de Jesus SR, Sampaio RB, Pontes-de-Carvalho L e dos-Santos WL (2002) A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. *Parasitol Res* 88: 963-968.
- Ter Horst R, Collin SM, Ritmeijer K, Bogale A e Davidson RN (2008). Concordant HIV infection and visceral leishmaniasis in Ethiopia: the influence of antiretroviral treatment and other factors on outcome. *Clin. Infect. Dis*. 46:1702-1709.
- Thakur CP e Narayan S A (2004) comparative evaluation of amphotericin B and sodium antimony gluconate, as first-line drugs in the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol*. 98(2):129-38.
- Thiel M, Harder S, Wiese M, Kroemer M, Bruchhaus I (2008) Involvement of a *Leishmania* thymidine kinase in flagellum formation, promastigote shape and growth as well as virulence. *Mol Biochem Parasitol*. 158(2):152-62.
- Tropical Diseases Research (TDR) Strategic Direction for Research: Leishmaniasis. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/files/direction.pdf>. (2002). Acesso em: dezembro de 2013.
- Tuon FF, Neto VA e Amato VS. (2008). *Leishmania*: origin, evolution and future since the Precambrian. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*.54(2):158-166.
- Uribe S (1999) The status of the *Lutzomyia longipalpis* species complex and possible implications for *Leishmania* transmission. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 94(6):729-734.
- Valiente-Gabioud AA, Veaute C, Perrig M, Galan-Romano FS, Sferco SJ e Marcipar IS (2011) Effect of repetitiveness on the immunogenicity and antigenicity of *Trypanosoma cruzi* FRA protein. *Exp Parasitol*. 127(3):672-9.

- Van Assche T, Deschacht M, da Luz RA, Maes L e Cos P (2011) Leishmania-macrophage interactions: insights into the redox biology. *Free Radic Biol Med* 51:337–351.
- Van Griensven J e Diro E (2012) Visceral leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am*. 26(2):309-22.
- Verstrepen KJ, Jansen A, Lewitter F e Fink GR (2005) . Intragenic tandem repeats generate functional variability. *Nat. Genet.* 37:986–990.
- Wakid MH e Bates PA (2004). Flagellar attachment of Leishmania promastigotes to plastic film in vitro. *Exp. Parasitol.* 106:173–178.
- Wang JY, Cui G, Chen HT, Zhou XN, Gao CH e Yang YT (2012). Current epidemiological profile and features of visceral leishmaniasis in People's Republic of China. *Parasites & Vectors* 5:31-7.
- Webster P e Russell DG (1993) The flagellar pocket of trypanosomatids. *Parasitol Today* 9:201–6.
- World Health Organization (WHO) (2002) Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. *Weekly Epidemiological Record, Geneva*, 44:365-372.
- WHO (2010). Control of the leishmaniasis. World Health Organization technical report series, xii–xiii, 1–186.
- Zhang WW, Charest H, Ghedin E e Matlashewski G (1996) Identification and overexpression of the A2 amastigote-specific protein in Leishmania donovani. *Molecular and Biochemical Parasitology* 78:79–90.
- Zijlstra EE et al. (2003) Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Lancet*. 3: 87–98.
- Zinoviev A, Léger M, Wagner G e Shapira M (2011) A novel 4E-interacting protein in Leishmania is involved in stage-specific translation pathways. *Nucleic Acids* 39(19):8404-15.

9. CURRICULUM VITAE (LATTES)

Marília Barbosa do Nascimento

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Marília Barbosa do Nascimento
Filiação João Victor do Nascimento Filho e Maria da Guia Barbosa
Nascimento 10/05/1985 - Recife/PE - Brasil
Carteira de Identidade 5879896 SSP - PE - 15/05/1997
CPF 057.096.624-88

Endereço residencial R. dos Alecrins, 140
Centro - Camaragibe
54759080, PE - Brasil
Telefone: 081 96786140

Endereço profissional Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
Av. Prof. Moraes Rego, 1235
Cidade Universitária, - Recife
50670901, PE - Brasil
Telefone: 081 21012600

Endereço eletrônico

E-mail para contato : nascimento.marilia@gmail.com
e-mail alternativo : mariliabarbosa@cpqam.fiocruz.br

Formação acadêmica/titulação

- 2009** Doutorado em Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Mapeamento de motivos antigênicos e caracterização funcional de novas proteínas de *L. chagasi* com potencial para uso no diagnóstico e imunidade contra Leishmaniose visceral.
Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto
Co-orientador: Franklin Barbalho Magalhães
Palavras-chave: antígeno recombinante, diagnóstico, Leishmania chagasi
Áreas do conhecimento : Genética Molecular e de Microorganismos
- 2007 - 2009** Mestrado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: ANÁLISE DA ANTIGENICIDADE E EXPRESSÃO DE

QUATRO NOVAS PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS DE LEISHMANIA (LEISHMANIA) CHAGASI., Ano de obtenção: 2009

Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Palavras-chave: antígeno recombinante, diagnóstico, Leishmania chagasi

Áreas do conhecimento : Microbiologia

- 2010** Graduação em Farmácia.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2003 - 2007** Graduação em Biomedicina.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Subclonagem e expressão, em *Escherichia coli*, de genes que codificam para antígenos imunologicamente relevantes de *Leishmania (Leishmania) chagasi*.
Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto
- 2003 - 2006** Ensino Profissional de nível técnico em Química Industrial.
Centro Federal de Educação Tecnológica de Pernambuco, CEFET-PE, Brasil

Formação complementar

- 2008 - 2008** Curso de curta duração em III Curso de Capacitação em Experimentação Animal.
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, CPQAM, Brasil
- 2004 - 2004** Extensão universitária em I Curso de Análise de Genética Humana.
Universidade Católica de Pernambuco, UNICAP, Recife, Brasil
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Curso de Imunologia Básica e Aplicada.
Universidade Católica de Pernambuco, UNICAP, Recife, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

- 2013 - Atual** Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Professor Colaborador, Regime: Parcial
- 2009 - Atual** Vínculo: Estudante de pós-graduação , Enquadramento

2007 - 2009 funcional: Doutorado, Regime: Dedicação exclusiva
 Vínculo: Estudante de pós-graduação , Enquadramento funcional: Mestrado, Regime: Dedicação exclusiva

2. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPQAM

Vínculo institucional

2013 - Atual Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Professor Colaborador, Regime: Parcial
2009 - Atual Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Desenvolvimento de projeto de Doutorado , Carga horária: 40, Regime: Integral
2007 - 2009 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Desenvolvimento de projeto de Mestrado , Carga horária: 40, Rgime: Integral

Atividades

03/2005 - Atual Pesquisa e Desenvolvimento, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
Linhas de pesquisa:
Biologia Molecular de Tripanossomatídeos.

Linhas de pesquisa

1. Biologia Molecular de Tripanossomatídeos.

Áreas de atuação

1. Microbiologia
2. Genética
3. Genética Molecular e de Microorganismos
4. Imunologia

Projetos

Projetos de pesquisaProjetos de pesquisa

2005 - Atual Criação de uma Rede de Antígenos Recombinantes para Desenvolvimento de Vacinas e Métodos Diagnósticos (RedeAgR), Visando o Controle de Doenças na Região Nordeste do Brasil

Descrição: O projeto tem, como objetivo imediato, a formação de uma rede

de cooperação técnico-científica, na região nordeste, reunindo pesquisadores e tecnologistas engajados na produção de antígenos recombinantes (AgRs) e no desenvolvimento de vacinas e/ou ensaios imunodiagnósticos, buscando a otimização do uso de recursos e expertise. Um dos objetivos iniciais da rede seria a obtenção, utilizando a metodologia do DNA recombinante, de produtos que contribuam para o controle de doenças que afligem a população nordestina. O subprojeto no qual se dá a participação da equipe do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães busca contribuir para o desenvolvimento de kits para imunodiagnósticos rápidos e seguros das leishmanioses viscerais humana e canina assim como estudar possíveis imunoterápicos com potencial para uso contra estas enfermidades. .

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Mestrado acadêmico (1); Doutorado (1);

Integrantes: Marília Barbosa do Nascimento; Rodrigo Menezes de Campos; Lain Carlos Pontes de Carvalho; Geraldo Gileno de Sá Oliveira; Franklin Barbalho Magalhães; de Melo Neto, O. P. (Responsável)

Projetos de desenvolvimento tecnológico

2013 - Atual “AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DIAGNÓSTICO E IMUNOTERÁPICO DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS NA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA E CANINA”

Descrição: Contribuir para o aperfeiçoamento dos métodos de diagnóstico sorológico e controle da leishmaniose visceral (LV) em humanos e cães através da validação do uso de proteínas quiméricas, compostas por regiões antigênicas de proteínas pré-selecionadas, investigando novas aplicações de uso destas proteínas como ferramentas de monitoração da cura pós-terapêutica e controle da doença.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de desenvolvimento tecnológico

Integrantes: Marília Barbosa do Nascimento; Lain Carlos Pontes de Carvalho; Geraldo Gileno de Sá Oliveira; Franklin Barbalho Magalhães; Gomes, Y. M.; de Melo Neto, O. P. (Responsável)

Idiomas

Inglês	Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem
Espanhol	Compreende Bem , Fala Pouco , Escreve Pouco , Lê Razoavelmente
Português	Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

Prêmios e títulos

2012	Melhor apresentação oral, nível doutorado.II Jornada de Pós-Graduação em Genética da UFPE, Programa de Pós-Graduação em Genética- UFPE
-------------	--

- 2007** Menção honrosa por apresentação Oral na Jornada de Iniciação Científica do CPqAM 2007, CPqAM

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. OLIVEIRA, G. G. S., Magalhaes, F. B., Teixeira, M. C. A., Pereira, A. M., Pinheiro, C. G. M., Santos, L. R., NASCIMENTO, M. B., Bedor, C. N. G., Albuquerque, A. L., dos-Santos, W. L. C., Gomes, Y. M., Moreira, E. D., Brito, M. E. F., Pontes de Carvalho, L. C., de Melo Neto, O. P.

Characterization of Novel *Leishmania infantum* Recombinant Proteins Encoded by Genes from Five Families with Distinct Capacities for Serodiagnosis of Canine and Human Visceral Leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* , v.85, p.1025 - 1034, 2011.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.4269/ajtmh.2011.11-0102]

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. CASTRO NETO, A. L., **NASCIMENTO, M. B.**, MAGALHAES, F.B., de Melo Neto, O. P.

Evaluation of The Antigenicity of Four Novel Antigenic Proteins of *Leishmania Chagasi/Infantum* as Alternatives for the Diagnosis of Human and Canine Visceral Leishmaniasis In: Fifth World Congress on Leishmaniasis, 2013., 2013, Ipojuca, Pernambuco, Brasil..

Annals of the Fifth World Congress on Leishmaniasis, 2013.. , 2013.

2. CASTRO NETO, A. L., **NASCIMENTO, M. B.**, Magalhaes, F. B., DE MELO NETO, O.P

Análise de proteínas imunogênicas de *Leishmania* para diagnóstico sorológico em cães e humanos. In: III Congresso de Biomedicina e Farmácia da Faculdade ASCES, 2012, Caruaru.

Anais do III Congresso de Biomedicina e Farmácia da Faculdade ASCES. , 2012.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **NASCIMENTO, M. B.**, CARVALHO, L.C.P, Magalhaes, F. B., OLIVEIRA, G. G. S., de Melo Neto, O. P.

Characterization of New *Leishmania chagasi/infantum* Proteins with Potential for Use in the Diagnosis and Immunization Against Visceral Leishmaniasis, 2013. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local:

Pernambuco, Brasil.; Cidade: Ipojuca,; Evento: Fifth World Congress on Leishmaniasis, 2013,; Inst.promotora/financiadora: Annals of the Fifth World Congress on Leishmaniasis, 2013.

2. **NASCIMENTO, M. B.**, Magalhaes, F. B., DE MELO NETO, O.P
Evaluation of chimeric proteins with promising use in diagnosis and immunotherapy of human and canine visceral leishmaniasis., 2013.
 (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Local: Brazil; Cidade: Rio de Janeiro; Evento: Grand Challenges Meeting 2013; Inst.promotora/financiadora: Bill and Melinda Gates Foundation, Grand Challenges Foundation

3. **NASCIMENTO, M. B.**, CARVALHO, L.C.P, OLIVEIRA, G. G. S., MAGALHAES, F..B., DE MELO NETO, O.P
CHARACTERIZATION OF CONSERVATION E ANTIGENICITY OF NEW PROTEINS L. CHAGASI WITH POTENTIAL FOR USE IN THE DIAGNOSIS AND IMMUNITY AGAINST VISCERAL LEISHMANIASIS, 2012.
 (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português; Cidade: Campos do Jordão-SP; Evento: XXXVII CONGRESS OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR IMMUNOLOGY; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Imunologia

4. **NASCIMENTO, M. B.**, CARVALHO, L.C.P, OLIVEIRA, G. G. S., DE MELO NETO, O.P, Magalhaes, F. B.
IS THE COMBINATION OF RECOMBINANT PROTEINS THE SOLUTION FOR THE DIAGNOSIS OF CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS? In: XXXV CONGRESS OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR IMMUNOLOGY, 2010.
 (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português; Cidade: Porto Alegre; Evento: XXXV CONGRESS OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR IMMUNOLOGY; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Imunologia

Inovação Projetos

Projetos de desenvolvimento tecnológicoProjetos de desenvolvimento tecnológico**2013 - Atual** “AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DIAGNÓSTICO E IMUNOTERÁPICO DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS NA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA E CANINA”

Descrição: Contribuir para o aperfeiçoamento dos métodos de diagnóstico sorológico e controle da leishmaniose visceral (LV) em humanos e cães através da validação do uso de proteínas quiméricas, compostas por regiões antigênicas de proteínas pré-selecionadas, investigando novas aplicações de uso destas proteínas como ferramentas de monitoração da cura pós-terapêutica e controle da doença.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de desenvolvimento tecnológico
 Integrantes: Marília Barbosa do Nascimento; Lain Carlos Pontes de Carvalho; Geraldo Gileno de Sá Oliveira; Franklin Barbalho Magalhães; Gomes, Y. M.; de

Melo Neto, O. P. (Responsável)

Orientações e supervisões em andamento

Dissertações de mestrado : co-orientador

1. Wagner José Tenório dos Santos. **PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS COM POTENCIAL EQUIVALENTE PARA DIAGNÓSTICO DAS FORMAS HUMANA E CANINA DA LEISHMANIOSE VISCERAL**. 2013. Dissertação (Genética) - Universidade Federal de Pernambuco
Referências adicionais : Brasil/Português.

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Fifth World Congress on Leishmaniasis**, 2013. (Congresso)
Characterization of New Leishmania chagasi/infantum Proteins with Potential for Use in the Diagnosis and Immunization Against Visceral Leishmaniasis.

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Grand Challenges Meeting 2013**, 2013. (Congresso)
Evaluation of chimeric proteins with promising use in diagnosis and immunotherapy of human and canine visceral leishmaniasis..

3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXXVII CONGRESS OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR IMMUNOLOGY**, 2012. (Congresso)
CHARACTERIZATION OF CONSERVATION E ANTIGENICITY OF NEW PROTEINS L. CHAGASI WITH POTENTIAL FOR USE IN THE DIAGNOSIS AND IMMUNITY AGAINST VISCERAL LEISHMANIASIS.

4. **II Jornada da Pós Graduação em Genética-UFPE**, 2012. (Encontro)
Mapeamento de motivos antigênicos e caracterização funcional de novas proteínas de L. chagasi com potencial para uso no diagnóstico e imunidade contra Leishmaniose visceral..

5. Apresentação de Poster / Painel no(a) **I Jornada de Pós-Graduação em Genética da UFPE**, 2011. (Outra)
MAPEAMENTO DE MOTIVOS ANTIGÊNICOS E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE NOVAS PROTEÍNAS DE L. CHAGASI COM POTENCIAL PARA USO NO DIAGNÓSTICO E IMUNIDADE CONTRA A LEISHMANIOSE VISCERAL..

6. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXXV CONGRESS OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR IMMUNOLOGY**, 2010. (Congresso)
IS THE COMBINATION OF RECOMBINANT PROTEINS THE SOLUTION FOR THE DIAGNOSIS OF CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS? In: XXXV

CONGRESS OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR IMMUNOLOGY.

7. **XVI Semana de Biomedicina UFPE(Avaliação dos pôsteres apresentados)**, 2009. (Encontro)
(Avaliação dos pôsteres apresentados)..

Organização de evento**1. NASCIMENTO, M. B.**

XVI SEMANA DE BIOMEDICINA DA UFPE, 2009. (Outro, Organização de evento)

Referências adicionais : Brasil/Português.

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação**1. LEAL, N. C., LIMA, R. P., NASCIMENTO, M. B.**

Participação em banca de Mariana de Lira Nunes. **Análise da expressão da principal subunidade do pilus regulador de toxina (TcpA) em cepas de *Vibrio cholerae* O26 isolados de processos entéricos humanos no Brasil.**, 2010

(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco

Referências adicionais : Brasil/Português.

2. NASCIMENTO, M. B.

Participação em banca de Eduarda Vanessa Cavalcante Manguiera. **Deteção da proteína PBP2a em amostras de *Staphylococcus* spp. utilizando a técnica de “western- blot”.**, 2009

(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco

Referências adicionais : Brasil/Português.

Totais de produção**Produção bibliográfica**

Artigos completos publicados em periódico.....	1
Trabalhos publicados em anais de eventos.....	5
Apresentações de trabalhos (Conferência ou palestra).....	1
Apresentações de trabalhos (Congresso).....	4

Eventos

Participações em eventos (congresso).....	8
Participações em eventos (encontro).....	3
Participações em eventos (outra).....	5
Organização de evento (outro).....	1
Participação em banca de trabalhos de conclusão (graduação).....	2