Universidade Federal de Pernambuco

Centro de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduacão em Genética

Diego de Hollanda Cavalcanti Tavares

Desenvolvimento de Proteínas Quiméricas de *Leishmania chagasi* Utilizando Regiões Antigênicas de Proteínas Recombinantes Previamente Selecionadas.

Recife

2012

Diego de Hollanda Cavalcanti Tavares

Desenvolvimento de Proteínas Quiméricas de *Leishmania chagasi* Utilizando Regiões Antigênicas de Proteínas Recombinantes Previamente Selecionadas.

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

Orientador: Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Coorientador: Dr. Franklin Barbalho Magalhães

Recife

2012

Catalogação na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Tavares, Diego de Hollanda Cavalcanti
Desenvolvimento de proteínas quiméricas de *Leishmania chagasi* utilizando regiões antigênicas de proteínas recombinantes previamente selecionadas / Diego de Hollanda Cavalcanti. – Recife: O Autor, 2012.

87 folhas: il.
Orientadores: Osvaldo Pompílio de Melo Neto, Franklin Barbalho Magalhães
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Genética, 2012.
Inclui bibliografia

1. Leishmaniose visceral 2. Diagnóstico parasitológico I. Melo Neto, Osvaldo (orient.) II. Magalhaes, Franklin Barbalho (coorient.) III. Título.

616.9364 CDD (22.ed.) UFPE/CCB-2014-140

Diego de Hollanda Cavalcanti Tavares

Desenvolvimento de Proteínas Quiméricas de *Leishmania chagasi* Utilizando Regiões Antigênicas de Proteínas Recombinantes Previamente Selecionadas.

Aprovado em 14/09/2014

Banca Examinadora:

_____

Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

_____

Dr. Antonio Carlos de Freitas
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Dr. Rafael Dhália
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

_____

Dra. Zulma Maria de Medeiros
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

Recife

2012

Dedico essa dissertação a Moema Maria de Hollanda Cavalcanti (minha querida Mãe), que sempre foi uma guerreira e uma vencedora. Dedico também a minha amada avó, que já não se encontra mais ao nosso lado. Ao meu super irmão companheiro para todas as horas e para minha família que sempre acreditaram em mim e fizeram de tudo para me incentivar e educar.

Agradecimentos

Primeiramente ao “garotão lá de cima”, por permitir todas as minhas conquistas pessoais e profissionais que obtive até hoje em minha vida;

A minha amada mãe por sempre ter me amado incondicionalmente, acreditado, incentivado, apoiado e muito mais. Pois sem ela, eu nada seria;

Ao meu grande irmão que nunca me deixou me sentir só, que sempre me fez me sentir mais tranquilo e querido;

À minha família, por sempre ter acreditado em mim, por sempre ter me apoiado em minhas decisões (é impossível colocar o nome de todos aqui, mas podem ter certeza que jamais esqueceria alguém, pois todos foram e são importantíssimos na minha vida);

A meus tios Eduardo, Margarida e Manoel, por sempre terem me ajudado e incentivado em todas as etapas da minha carreira estudantil e consequentemente na minha vida profissional e pessoal;

A Raphaela Miamoto que é indubitavelmente uma mulher maravilhosa. Foi ao lado dela que passei os momentos mais incríveis e inesquecíveis da minha vida. Eu amo de paixão essa Japinha linda;

A Ademar e Jô Miamoto, pela confiança, amizade, alegrias, incentivos e muito mais. Sinto como se vocês fossem meus pais e, portanto, amo de mais;

Ao meu orientador, Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto, pela confiança em mim depositada, pelos ensinamentos e orientação sempre prestada;

Ao meu co-orientador, Dr. Franklin Barbalho Magalhães, pela amizade, incentivo e todos os conhecimentos que me foram passados;

A todos os meus amigos dos laboratórios (Amaranta, André, Artur Leonel, Camila, Christian, Danielle, Janaína, Ludmila, Laís, Larissa, Mariana Marques, Marília, Mayara, Rodrigo, Rômulo, Sandra e Tamara) e funcionários pelo convívio diário, pelas risadas e conhecimentos trocados, dos quais nunca esquecerei;

Aos meus queridos amigos de faculdade, em especial Eduardo, João (Johnny), José Valter (Zé), Luiz (Buxexa), Paulinho, Kleison (mama) e Raúl pela amizade, pelos conhecimentos compartilhados e pelas alegrias que foram muitas e ainda serão;

Aos meus amigos de infância Diogo, Doryan, Hugo, Jensen, João (Boby), Pedrinho, Ricardo (Titico), que sempre compartilharam comigo grandes momentos, desde pequenas trelas, brinacadeiras, aventuras até momentos mais sérios e difíceis. Torço e desejo que as nossas amizades perdurem até o final de nossas vidas e que passem para as próximas gerações.

Aos casais queridos e preferidos Nívia e Raul Cabus e Túlio e Heloísa por terem cruzado e permanecidos em minha vida.

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

Obrigado a todos, pois sem vocês a construção desta dissertação, e mais ainda, da minha vida, provavelmente não seria tão maravilhosa e significante.

- Das belezas da arte -

“Poderia ter pintado um quadro menor, certamente eu poderia. O pincel não era dos melhores, as tintas estavam um tanto diluídas e não tinham as propriedades ORGANOLÉPTICAS adequadas. Mas nessa situação não basta apenas ser artista, faz-se mais importante a sensibilidade à técnica, e com isso reconheço que o quadro concluído é deveras belo, sublime e arrisco-me ainda em dizer que o é também gentil. Mas como gentil? Gentil, gentil como essas obras de Spinoza que mais parecem um cobertor do que realmente uma obra. Confesso que tive que ornamentá-lo ainda com um pouco de suor, mato, hidroxila, frutose, algumas mitocôndrias e até centríolos, de forma que permito que qualquer curador e crítico reclame de tudo, só não me acuse de falta de originalidade e espontaneidade”.

José Valter Jr.

Resumo

No Nordeste brasileiro, a Leishmaniose Visceral (LV), provocada pela infecção com a *Leishmania chagasi*, é um sério problema de saúde pública cujo controle depende de um diagnóstico precoce dos reservatórios caninos e indivíduos afetados. Antígenos recombinantes são a melhor solução para o uso no diagnóstico sorológico e, em trabalhos prévios, novos antígenos de *L. chagasi* foram identificados com este propósito. Quando analisados por reações imunoenzimáticas os mesmos apresentaram uma sensibilidade variável e uma alta especificidade no diagnóstico da LV, e em misturas com dois ou mais antígenos houve um aumento da sensibilidade sem prejuízo da especificidade. A produção de um sistema de diagnóstico com mais de um antígeno, entretanto, aumenta os custos de fabricação e padronização. Neste trabalho, partimos de genes sintéticos (*dof1*, *dof2* e *dof3*) desenhados com as melhores características (domínios repetitivos, regiões polares, epítopos para MHC) de antígenos selecionados e clonados em vetores plasmidiais. A partir de várias etapas de subclonagem estes genes foram utilizados na construção de genes quiméricos, codificando para as regiões repetitivas dos antígenos em diferentes combinações (*3-2-1*, *3-1-2* e *1-3-2*). Os genes quiméricos, clonados em vetores plasmidiais de expressão, foram usados para a produção das respectivas proteínas em *Escherichia coli*, fusionadas a um motivo de poli-histidinas na sua extremidade N-terminal. Após purificação, via cromatografia de afinidade, estas proteínas foram avaliadas por ensaios de ELISA-indireto com soros humanos, onde se obteve alta sensibilidade e especificidade para as três proteínas, mesmo em diluições elevadas de soro. Estes resultados confirmam o potencial de uso das proteínas quiméricas como alternativa no diagnóstico da LV.

Palavras-Chaves: diagnóstico, leishmaniose visceral, proteína quimérica, antígeno recombinante

Abstract

In Northeastern Brazil, Visceral Leishmaniasis (VL), caused by infection with *Leishmania chagasi*, is a serious public health problem whose control depends on early diagnosis of canine reservoirs and affected individuals. Recombinant antigens are the best solution for use in serological diagnosis and, in previous studies, new *L. chagasi* antigens have been identified for this purpose. When analyzed by immunoenzymatic reactions these antigens displayed a variable sensitivity and a high specificity for VL diagnosis and in mixtures of two or more antigens there was an increase in sensitivity without loss of specificity. The production of a diagnostic system with more than one antigen, however, increases the manufacturing cost and standardization. In this work, we started with synthetic genes (*dof1*, *dof2* e *dof3*) designed with the best features (repetitive areas, polar regions, epitopes to MHC) from selected antigens and cloned into plasmid vectors. Through multiple subcloning steps these genes were used for the construction of chimeric genes, encoding the antigens repetitive regions in different combinations (*3-2-1*, *3-1-2* and *1-3-2*). The chimeric genes, cloned into plasmid expression vectors, were used for the production of the respective proteins in *Escherichia coli*, fused to an N-terminal poly-histidine motif. After purification, through affinity chromatography, these proteins were assessed by indirect ELISA assays with human sera and displayed high sensitivity and specificity for all three proteins, even at high serum dilutions. These results confirm the potential use of the chimeric proteins as alternative for the diagnosis of VL.

Keywords: diagnosis, visceral leishmaniasis, chimeric protein, recombinant antigen

Lista de Ilustrações

FIGURA 1: COMPARAÇÃO ENTRE AS CERÂMICAS PRÉ–COLOMBIANAS E IMAGENS DE PACIENTES COM LESÕES CAUSADAS POR LEISHMANIOSE. 4

FIGURA 2: ESQUEMA ILUSTRATIVO DA TAXONÔMIA DE ESPÉCIES DE LEISHMANIAS. 6

FIGURA 3: FORMAS DA LEISHMANIA OBSERVADAS AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO......9

FIGURA 4: IMAGENS DOS GÊNEROS TRANSMISSORES DAS LEISHMANIOSES......9

FIGURA 5: CICLO BIOLÓGICO DAS ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* CAUSANDO AS LEISHMANIOSES. .12

FIGURA 6: DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA E VISCERAL. 14

FIGURA 7: ESTRATIFICAÇÃO DOS CASOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL, SEGUNDO A MÉDIA DE CASOS. BRASIL, 2005 A 2007.....15

FIGURA 8: SINAL CLÍNICO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA. 18

FIGURA 9: SINAL CLÍNICO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA DIFUSA. 19

FIGURA 10: SINAL CLÍNICO CARACTERÍSTICO DA LEISHMANIOSE MUCOCUTÂNEA......20

FIGURA 11: SINAL CLÍNICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL......22

FIGURA 12: ESFREGAÇO DE ASPIRADO ESPLÊNICO (BAÇO), CORADO COM GIEMSA. 28

FIGURA 13: ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS GENES SINTÉTICOS......43

FIGURA 14: ESQUEMA REPRESENTATIVO DA PRIMEIRA ETAPA DAS TRÊS SUBCLONAGENS. 47

FIGURA 15: ESQUEMA REPRESENTATIVO DA SEGUNDA ETAPA DE SUBCLONAGEM......48

FIGURA 16: ESQUEMA REPRESENTATIVO DA TERCEIRA E ÚLTIMA ETAPA DA CONSTRUÇÃO DOS GENES QUIMÉRICOS. 50

FIGURA 17: CONFIRMAÇÃO DA PRIMEIRA SUBCLONAGEM......57

FIGURA 18: DIGESTÃO COM A ENZIMA *XHO*I DOS GENES SUBCLONADOS NO PRSET A E PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS CORRESPONDENTES AO VETOR PLASMIDIAL CONTENDO A REGIÃO REPETITIVA MAIS A C-TERMINAL DOS GENES DE INTERESSE. 58

FIGURA 20: CONFIRMAÇÃO DA SEGUNDA SUBCLONAGEM. 60

FIGURA 21: CONFIRMAÇÃO DA TERCEIRA E ÚLTIMA SUBCLONAGEM. 61

FIGURA 22: MAPA DE ANTIGENICIDADE DAS TRÊS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS CONSTRUÍDAS. 62

FIGURA 24: *WESTERN BLOT* DAS TRÊS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS. 64

FIGURA 25: GRÁFICO DO ELISA INDIRETO PARA AS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS CONSTRUÍDAS. .. 65

Lista de Tabelas

TABELA 1: MUNICÍPIOS QUE MAIS NOTIFICARAM CASOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL EM PERNAMBUCO, BRASIL, 1990-2001. 15

TABELA 2: VACINA CANDIDATAS AVALIADAS CONTRA A LEISHMANIOSE VISCERAL 36

TABELA 3: AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE ELISAS. PROTEÍNAS QUIMÉRICAS FRENTE A SOROS DE 43 PACIENTES COM LV E DE 50 INDIVÍDUOS SADIOS DE ÁREA NÃO ENDÊMICA.....65

TABELA 4: VALORES PREDITIVOS NEGATIVOS E POSITIVOS. 66

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Item	Definição
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
CDC	Centro de Controle de Doenças
cDNA	DNA complementar
CPqGM	Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz
DNA	*Deoxyribonucleic Acid* – Ácido Desoxirribonucléico
DO	Densidade Ótica
ELISA	*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay* – Ensaio imunoenzimático
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
IPTG	Isopropil-tio-β-D-galactopiranosídeo
kDa	KiloDalton
LB	Luria Bertani
LMW	*Low molecular weight marker* – Marcador de baixo peso molecular
LC	Leishmaniose Cutânea

LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LPG	Complexo glicofosfoglicano
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral ou Calazar
LVH	Leishmaniose Visceral Humana
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPD	Orthophenilenediamino
Pb	Pares de Base
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	*Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase
pMK	Vetor de Clonagem Comercial
PMSF	*Phenyl-Methyl-Sulfonyl Fluoride* – Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RPM	Rotações por minuto
SDS-PAGE	Sodium *Dodecyl Sulfate* – *Polyacrylamide Gel Electrophoresis* Dodecil sulfato de sódio – Eletroforese em gel de poliacrilamida
SES-PE	Secretaria do Estadual de Saúde de Pernambuco

SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
TBS	Tampão Tris Salino
TRALd	Teste Rápido de Anticorpo contra *Leishmania donovani*

Sumário

RESUMO IX

ABSTRACT X

LISTA DE ILUSTRAÇÕES XI

LISTA DE TABELAS XIII

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS XIV

1. INTRODUÇÃO 1

2. REVISÃO DA LITERATURA 3

2.1 HISTÓRICO DAS ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* 3

2.2 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DOS AGENTES ETIOLÓGICOS DAS LEISHMANIOSES. 5

2.3 MORFOLOGIA, INSETO VETOR E CICLO BIOLÓGICO DAS ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* 7

2.3.1 Forma Evolutiva Amastigota 8

2.3.2. Forma Evolutiva Promastigota 8

2.3.3. Inseto Vetor 9

2.3.4. Ciclo Biológico do Gênero Leishmania 10

2.3.4.1. Ciclo Biológico no Hospedeiro Vertebrado 11

2.3.4.2. Ciclo Biológico no Hospedeiro Invertebrado 12

2.4. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS DAS LEISHMANIOSES 13

2.4.1. Distribuição Geográfica 13

2.4.2. Incidência e Prevalência 14

2.4.3. Manifestações Clínicas *17*

2.4.3.1. Leishmaniose Tegumentar Americana 17

2.4.3.1.1. Leishmaniose Cutânea 18

2.4.3.1.2. Leishmaniose Cutâneo-Difuso 19

2.4.3.1.3. Leishmaniose Mucocutânea 19

2.4.3.4. Leishmaniose Visceral Americana 20

2.4.3.4.1. Leishmaniose Visceral Humana 21

2.4.3.4.2 Leishmaniose Visceral Canina 22

2.4.4. Resposta Imune para Leishmaniose Visceral *23*

2.5. CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL 25

2.5.1. Tratamento da Leishmaniose Visceral Humana e Canina *33*

2.5.2. Vacinas para Controle das Leishmanioses *35*

2.5.3. Métodos de Diagnóstico da Leishmaniose Visceral *26*

2.5.3.1. Diagnóstico Parasitológico 26

2.5.3.2. Diagnóstico Molecular 28

2.5.3.3. Métodos Sorológicos Clássicos de Diagnóstico 29

2.5.3.4. Métodos Sorológicos que Fazem Uso de Proteínas Recombinantes 30

2.6. RESULTADOS PRÉVIOS QUE DERAM ORIGEM A ESTE TRABALHO 39

3. OBJETIVOS 41

3.1 GERAL 41

3.2 ESPECÍFICOS 41

4. METODOLOGIA 42

4.1 CONSTRUÇÃO DOS GENES SINTÉTICOS.....42
4.2 CONSTRUÇÃO DOS GENES QUIMÉRICOS 43
4.2.1 Digestão com enzimas de restrição.....44
4.2.2 Purificação dos insertos e dos vetores plasmidiais.....44
4.2.3 Ligação dos fragmentos nos plasmídios vetores, transformação, minipreparação e confirmação da subclonagem 45
4.2.4 Utilização da enzima de modificação Antarctic Phosphatase (NEW ENGLAND Biolabs$_{inc}$) 46
4.2.5 Estratégia de Subclonagens sucessivas dos genes sintéticos (dof1, dof2 e dof3) para formação das quimeras.....46
4.2.6 Confirmação da subclonagem e da construção das Quimeras.....50
4.3 EXPRESSÕES DAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS. 51
4.4 PURIFICAÇÕES DAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS. 51
4.5 QUANTIFICAÇÕES DAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS 52
4.6 ENSAIOS DE WESTERN BLOT 53
4.7 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA INDIRETO) 54
4.7.1 Soros utilizados no ELISA Indireto.....54
4.7.2 ELISA indireto utilizando antígenos recombinantes.....54
4.7.3 Análises estatísticas dos resultados de ELISA Indireto 55
5. RESULTADOS 57
5.1. SUBCLONAGEM DOS GENES SINTÉTICOS (*DOF1*, *DOF2* E *DOF3*) EM VETORES DE EXPRESSÃO. 57

5.1.1. Segunda Subclonagem e Consequente Construção dos Genes Quiméricos Parciais.....58

5.1.2. Construção dos Genes Quiméricos Completos.....60

5.2 MAPA DE ANTIGENICIDADE DAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS 61

5.3. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS COMPLETAS.....62

5.4. RECONHECIMENTO DAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS POR ANTICORPOS POLICLONAIS ATRAVÉS DE ENSAIOS DE WESTERN BLOT. 63

5.5. ELISA INDIRETO DAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS.....64

6. DISCUSSÃO.....67

7. CONCLUSÕES.....72

8. BIBLIOGRAFIA 73

9. CURRICULUM VITAE (LATTES).....84

1. Introdução

As leishmanioses constituem um grupo diversificado de síndromes clínicas, negligenciadas, causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* e transmitidas por insetos vetores dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima-se que 350 milhões de pessoas vivam em áreas de risco distribuídas por 98 países. Somente a leishmaniose visceral (LV) promove uma incidência anual de 500.000 novos casos sendo no Brasil uma importante causa de morbidade e mortalidade em áreas endêmicas, principalmente no Nordeste e no Norte brasileiro.

As principais medidas de controle das leishmanioses baseiam-se no diagnóstico precoce, sacrifício de animais infectados, controle epidemiológico do transmissor e quimioterapia dos indivíduos doentes. Características clínicas da LV, porém, podem ser facilmente confundidas com várias outras doenças comuns. Por isso, um diagnóstico diferencial precoce e preciso é essencial para o combate eficiente das leishmanioses, principalmente da LV. Por essas razões alguns grupos de pesquisa vêm tentando desenvolver antígenos recombinantes que possam ser utilizados na obtenção de testes sorológicos mais sensíveis e específicos, como também vacinas, compostas por proteínas recombinantes, capazes de gerar resposta imune protetora e bloqueio da transmissão para o vetor.

Em trabalhos anteriores do nosso grupo, foram identificados novos antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi* com potencial para uso no aperfeiçoamento do diagnóstico sorológico da LV. Esse estudo foi realizado com a colaboração do Laboratório de Patologia e Biointervenção do Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz (CPqGM). Esses antígenos foram analisados por reações imunoenzimáticas

apresentando uma sensibilidade variável, mas uma alta especificidade quando analisados individualmente. Misturas com duas ou mais proteínas recombinantes também foram avaliadas por ELISA e os resultados foram promissores, pois levaram a um aumento da sensibilidade, sem prejudicar a especificidade, quando testados com soros de cães. A produção de um *kit* de diagnóstico com duas, três ou mais proteínas recombinantes, entretanto, aumentaria os custos de fabricação e dificultaria sua padronização. Por estas razões, a proposta deste trabalho foi a de produzir proteínas quiméricas que reúnem as melhores propriedades dos antígenos individuais já avaliados, a fim de contribuir no desenvolvimento de um *kit* de diagnóstico para LV humana e canina de baixo custo, porém com alta sensibilidade e especificidade. Nesse sentido, foram selecionados três antígenos que reuniam as melhores características (domínios repetitivos, regiões polares, epítopos para MHC I e II) para compor a matriz das proteínas quiméricas. Os respectivos genes foram sintetizados quimicamente e, através do uso de enzimas de restrições, construímos os genes quiméricos que são compostos por misturas dos domínios repetitivos dos três genes selecionados. Após subclonagem em vetores plasmidiais e expressão em bactérias, as respectivas proteínas recombinantes foram purificadas e avaliadas, através da técnica de ELISA, em ensaios buscando avaliar o seu potencial antigênico para uso no diagnóstico sorológico da LV.

2. Revisão da Literatura

2.1 Histórico das Espécies de *Leishmania*

A origem das diferentes espécies de *Leishmania* ainda é um tema controverso, pois existem várias teorias onde alguns pesquisadores consideram que esses parasitas se originaram do Paleoártico (Kerr, 2000, 2006), outros do Neoártico (Noyes, 1998; Noyes *et al*., 2000), do Neotrópico (Lukes *et al*., 2007) e outros sugerem uma origem africana (Momen e Cupolillo, 2000). Apesar de todas essas controvérsias, tornou-se consenso que a origem e a disseminação desses protozoários seguiu a migração tanto dos hospedeiros invertebrados quanto dos vertebrados (Perrotey *et al*., 2005). A hipótese mais aceita é baseada na teoria monofilética desenvolvida por Thomas-Soccol (1993), que sugere que os subgêneros *Viannia* e *Leishmania* tiveram uma origem comum, provavelmente durante o período Mesozóico, onde houve a separação da Pangéia e formação dos continentes (final do período Cretáceo). No início da Era Cenozóica, algumas espécies vieram para o Continente Americano, através do Estreito de Bering, acompanhando a migração dos hospedeiros roedores (Kerr, 2000; Tuon *et al*., 2008). Atualmente, porém, a teoria que as espécies de *Leishmania* originaram-se na região Neotropical e migraram para o Neoártico e posteriormente para o Paleoártico está tomando grande força, pois existem vários estudos moleculares e achados sobre os vetores que suportam essa idéia (Yurchenko *et al*., 2006; Lukes *et al*., 2007).

As leishmanioses são doenças antigas que estão associadas ao homem desde os primórdios da civilização. Há relatos e descrições encontrados na literatura desde o

século I d.C., nas formas de figuras, estátuas, cerâmicas, papiros, que estão sendo discutidos no contexto de análises mais recentes de restos humanos mumificados e de descobertas arqueológicas (Altamirano-enciso, 2003; Basano e Camargo, 2004). Nas Américas, cerâmicas pré-colombianas datadas de 400 a 900 anos d.C. apresentavam mutilações de lábios e narizes, lesões na pele e deformidades faciais humanas, sinais característicos da leishmaniose mucocutânea (LMC) (Figura 1). Posteriormente, através de estudos de paleomedicina, foram descobertas múmias com lesões de pele e mucosas características da leishmaniose, além de textos do período Inca, dos séculos XV e XVI, mencionando o risco que corriam os trabalhadores nos Andes de desenvolverem lesões bastante debilitantes (Altamirano-enciso, 2003; Basano e Camargo, 2004).

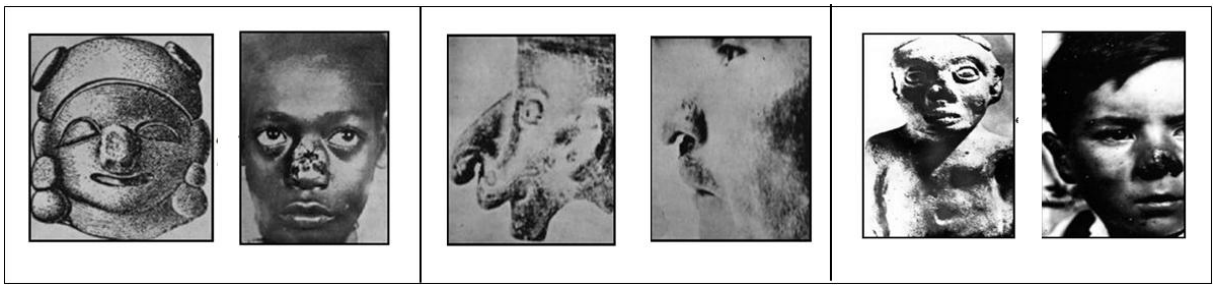

Figura 1: Comparação entre as cerâmicas pré–Colombianas e imagens de pacientes com lesões causadas por leishmaniose. A figura mostra a presença de leishmaniose em populações anteriores à colonização europeia. Fontes: Fundação Osvaldo Cruz (2012); Tuon *et al*., 2008

A primeira descoberta dos agentes etiológicos das leishmanioses, só ocorreu no final do século XIX, quando Cunningham (1885), na Índia, descreveu formas amastigotas em casos de calazar (leishmaniose visceral). Em 1903, James Wright, William Leishman e Charles Donovan descobriram, independentemente, o agente etiológico da leishmaniose, que possuía semelhanças com a forma intracelular (amastigota) do *Trypanosoma.* Ross em 1903 estabeleceu um novo gênero, o gênero

Leishmania, enquanto que em 1908, na Tunísia, Nicole identificou em cão uma nova espécie que passou a ser chamada de *Leishmania infantum* (Basano e Camargo, 2004).

No Brasil, a primeira menção da leishmaniose foi encontrada no documento da Pastoral Religiosa Político-Geográfica de 1827, onde um Frei percorrendo as regiões do vale amazônico observou a existência de indivíduos com úlceras nos braços e pernas, relacionadas as picadas de insetos, tendo como consequência lesões destrutivas de boca e nariz (Camargo e Barcinski, 2003). Em 1909, Lindenberg isolou formas do parasito idênticas a *Leishmania tropica* em lesões cutâneas de trabalhadores residentes próximos da mata no interior de São Paulo. Nesse mesmo ano, Gaspar Vianna batizou essa forma isolada de *Leishmania braziliensis* por considerar esse parasita diferente da *L. tropica*. (Pessôa e Martins, 1982; Paraguassu-chaves, 2001; Basano e Camargo, 2004).

2.2 Classificação Taxonômica dos Agentes Etiológicos das Leishmanioses

Os protozoários do gênero *Leishmania* são eucariotos pertencentes ao reino Protista, filo Euglenozoa, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatedae, e são subdivididos em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (Sharma e Singh, 2008; Tuon *et al*., 2008). Estes dois subgêneros foram criados em 1987, por Lainson e Shaw (Schmidt *et al*., 2009; Neves, 2011), com base em diferenças no desenvolvimento do parasito no intestino do inseto vetor. O subgênero *Leishmania* é composto pelas espécies dos complexos *donovani* (*L. donovani, L. infantum* e *L. chagasi*) e *mexicana (L. mexicana, L. amazonensis* e *L. venezuelensis*) e as espécies *L. tropica*, *L. major* e *L. aethiopica*, que

se desenvolvem no intestino médio do vetor, enquanto o subgênero *Viannia* é representado pelas espécies patogênicas, *L. braziliensis, L. guyanensis, L. panamensis* e *L. peruviana*, que se localizam na parte posterior do intestino do flebotomíneo (Schmidt *et al*., 2009). Atualmente, existem cerca de 30 espécies conhecidas de *Leishmania* (Figura 2), das quais 10 estão presentes no Velho Mundo e as outras 20 no Novo Mundo, sendo pelo menos 21 delas capazes de causar leishmaniose cutânea e/ou visceral (Ready, 2010; Schönian *et al*., 2011).

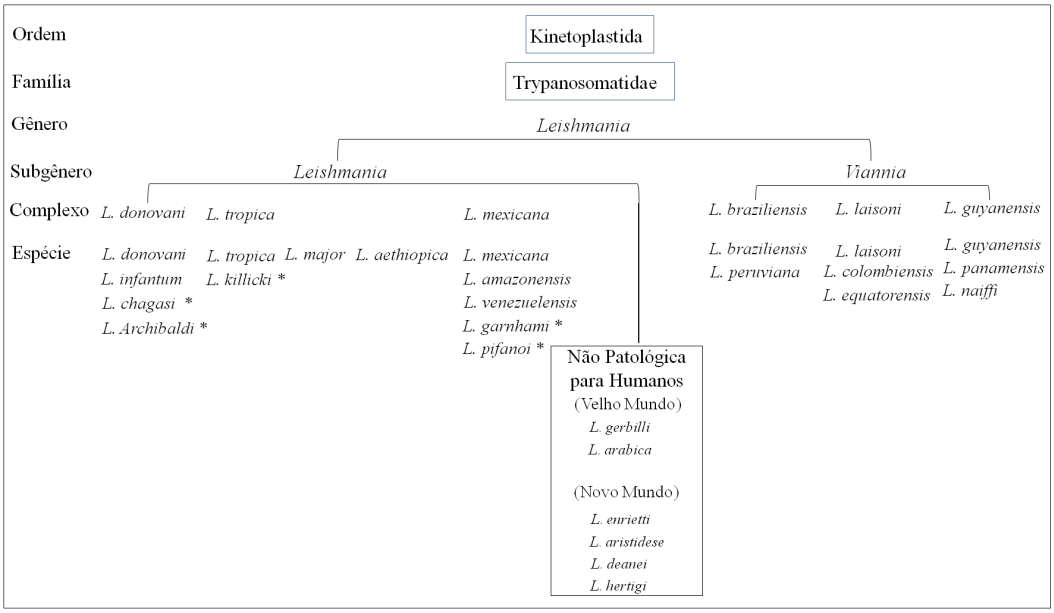

Figura 2: Esquema Ilustrativo da Taxonômia de espécies de Leishmanias. As espécies com asterisco (*) estão sendo questionadas pela comunidade científica. Fontes: adaptado de Bañuls *et al*., 2007

Existe uma grande dificuldade na classificação das espécies do gênero *Leishmania*, devido à sua grande semelhança morfológica (Schmidt *et al*., 2009). Além disso, essa classificação inicialmente se baseou em critérios ecobiológicos (vetores, distribuição geográfica, tropismo, propriedades antigênicas e manifestações clínicas), que muitas vezes se mostraram inadequados (Bañuls *et al*., 2007). Mais recentemente,

ferramentas de caracterização genética/molecular e bioquímicas passaram a serem utilizadas, e diversas classificações, bem como a origem filogenética de cada espécie, foram propostas (Lukes *et al*., 2007; Kuhls *et al*., 2011; Leblois *et al*., 2011; Schönian *et al*., 2011), porém ainda não se chegou a um consenso. Uma destas discordâncias é a classificação da *L. chagasi* e da *L. infantum*, que atualmente são considerados parasitos idênticos, da mesma espécie, sendo a *L. chagasi* originada de linhagens da *L. infantum,* trazidas para o Novo Mundo durante a colonização. Outra dúvida é se *L. archibaldi* pode ou não ser considerada um táxon válido, pois os marcadores genéticos que a distingue da *L*. *donovani* não são confiáveis e outros marcadores não geram um único clado para as suas cepas (Lukes *et al*., 2007; Kuhls *et al*., 2011; Leblois *et al*., 2011; Schönian *et al*., 2011). Para fins desse trabalho consideramos *L. chagasi* e *L*. *infantum* como mesma espécie e passaremos a utilizar *L. chagasi* para denominar o organismo em estudo.

2.3 Morfologia, Inseto Vetor e Ciclo Biológico das Espécies de *Leishmania*

Os organismos do gênero *Leishmania* possuem um complexo ciclo de vida, vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores. Para tal assumem diversas formas ao longo do seu desenvolvimento, como as formas principais promastigota e amastigota. Essas formas evolutivas representam adaptações às diferentes condições ambientais encontradas pelos parasitas dentro dos seus dois hospedeiros, o mamífero (no qual é patogênico) e o inseto vetor, pois durante a transição entre esses hospedeiros os protozoários são expostos as várias mudanças como: variações na disponibilidade de nutrientes, pH, temperatura, disponibilidade de oxigênio (Besteiro *et al*., 2007). Acredita-se que essa rápida adaptação às mudanças

ambientais, ocorre pela capacidade destes organismos de modularem a sua expressão gênica, via diferentes mecanismos (Sharma e Singh, 2008).

2.3.1 Forma Evolutiva Amastigota

A forma evolutiva amastigota (Figura 3A) está presente no hospedeiro vertebrado, apresentando-se de esferóide para ovóide (medindo de 1 a 3 µm de comprimento por 3 a 6 µm de diâmetro). São formas intracelulares obrigatórias, que não possuem motilidade, pois possuem um curto flagelo situado dentro na bolsa flagelar, a qual funciona principalmente como um local de endocitose e exocitose. Desenvolvem-se em células do sistema fagocítico mononuclear, e consequentemente, são células acidófilas, adaptadas ao baixo pH (Schmidt *et al*., 2009; Neves, 2011).

2.3.2. Forma Evolutiva Promastigota

A forma evolutiva promastigota é encontrada no intestino do vetor (hospedeiro invertebrado), apresentando-se alongada com uma grande variação no seu tamanho (medindo de 10 a 40 µm de comprimento por 1,5 a 3 µm de diâmetro). São formas extracelulares, flageladas, que podem se apresentar como promastigota procíclica (Figura 3B) que é considerada uma célula ovóide, móvel e que possui atividade replicativa, ou como promastigota metacíclica (Figura 3C) (Besteiro *et al*., 2007; Neves, 2011).

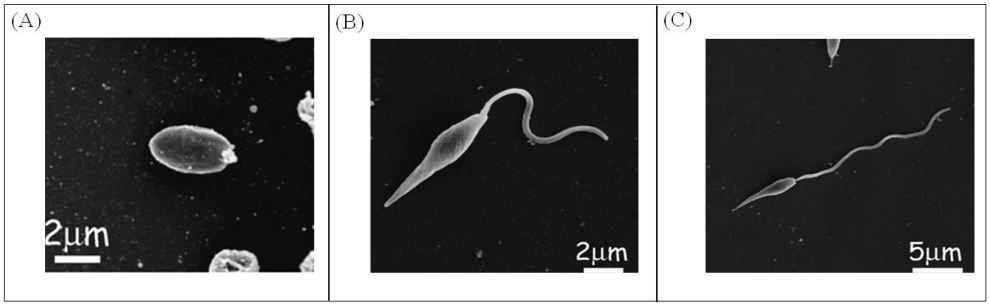

Figura 3: Formas da Leishmania observadas ao microscópio eletrônico. (A) formas amastigotas isolado de um macrófago infectado de rato. (B) e (C) forma promastigota procíclica e promastigota metacíclica, respectivamente, crescidas em cultura. Fonte: Besteiro *et al.,*2007

2.3.3. Inseto Vetor

O vetor das várias formas de leishmanioses pertence ao filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília *Phlebotominae*. Dois gêneros são conhecidos como vetores, os *Phlebotomus* (distribuído no Velho Mundo) e *Lutzomyia* (distribuído no Novo Mundo) (Figura 4) (Sharma e Singh, 2008).Esses "flebotomíneos" medem aproximadamente 2 a 3 mm de comprimento, suas cores variam de cinza-prata até quase preto, seu corpo e suas asas são cobertas por pelos e quando estão em repouso suas asas ficam em forma característica de "V". Além disso, não conseguem voar longas distâncias, geralmente voam muito baixo e são mais ativos no alvorecer e no crepúsculo (Kato *et al*., 2010).

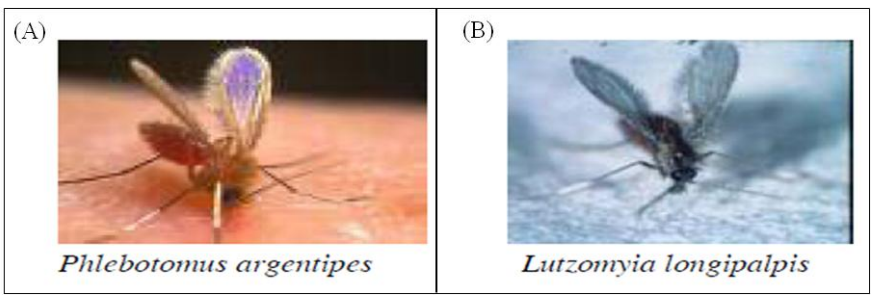

Figura 4: Imagens dos gêneros transmissores das leishmanioses. (A) Subfamília responsável por transmitir a leishmaniose no Velho Mundo. (B) Subfamília responsáveis pela transmissão da doença no Novo Mundo. Fonte: Sharma e Singh, 2008.

Do ponto de vista taxonômico, até o momento aproximadamente de 800 espécies de “flebotomíneos” foram registradas e divididas em cinco gêneros. Esses gêneros são *Phlebotomus* e *Sergentomyia* no Velho Mundo e *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e Warileya no Novo Mundo. Comprovadamente apenas os gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* são responsáveis pela transmissão das diversas formas de leishmanioses e dentre todas as espécies identificadas, menos de 10% são apontadas como insetos vetores da leishmaniose e apenas cerca de 30 espécies tem demonstrado possuir capacidade vetorial (Sharma e Singh, 2008; Kato *et al*., 2010).

No Brasil, as principais espécies de vetores capazes de transmitir as leishmanioses são: *Lutzomyia longipalpis* (que possui a denominação popular de “mosquito palha”) e *L. whitmani*. Ambos os insetos são pequenos (medindo de 1 a 3 mm de comprimento) e 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. Seu habitat é o domicílio e o peridomicílio humano, onde se alimentam de sangue do cão, do homem, de outros mamíferos e aves (Brandão-Filho *et al*., 1994; Azevedo *et al*., 1996; Mutebi *et al*., 1999; Uribe, 1999).

2.3.4. Ciclo Biológico do Gênero *Leishmania*

O ciclo biológico das espécies de *Leishmania* é heteróxeno (ou digenético), ou seja, esses parasitas se desenvolvem alternadamente entre o hospedeiro vertebrado (mamífero) e o hospedeiro invertebrado (inseto vetor) (Chow *et al*., 2011).

2.3.4.1. Ciclo Biológico no Hospedeiro Vertebrado

O ciclo evolutivo no hospedeiro vertebrado tem inicio durante o repasto sanguíneo, quando fêmeas infectadas do inseto vetor inoculam as formas promastigotas metacíclicas (Figura 5).Estas, ainda no local da inoculação, utilizam-se de mecanismos que lhes permitem resistir à ação de elementos presentes no sangue, principalmente o sistema complemento, e estimulam a sua adesão e endocitose pelos macrófagos. Moléculas de superfície dos promastigotas, como a GP63 (glicoproteína de 63 kDa) e LPG (complexo glicofosfoglicano), são importantes nesses processos (Shaw, 1994; Stuart *et al*., 2008; Schmidt *et al*., 2009; Kato *et al*., 2010). Com sua interiorização, o macrófago promove a fusão dos lisossomos com o fagossomo e o parasito. Para se adaptar às novas condições do ambiente, o protozoário sofre a transformação para a forma amastigota, intracelular obrigatória, capaz de se desenvolver e se multiplicar no meio ácido encontrado no vacúolo gerado (Besteiro *et al*., 2007). As formas amastigotas se multiplicam intensamente por divisão binária até que provocam o rompimento do macrófago, caindo no espaço intercelular e vindo a serem fagocitadas por novos macrófagos e células do SFM (Figura 5 circulo menor azul) (Sistema Fagocítico Mononuclear) (Chappuis *et al*., 2007; Stanley e Enqwerda, 2007).

2.3.4.2. Ciclo Biológico no Hospedeiro Invertebrado

Para a continuidade do ciclo das *Leishmanias*, durante um novo repasto sanguíneo sobre o hospedeiro infectado, um inseto vetor não infectado ingere as formas amastigotas (Figura 5). Dentro do tubo digestivo do inseto, no intestino médio, as amastigotas, protegidas pela matriz peritrófica, irão permanecer por três dias. Em seguida, a matriz peritrófica se degenera e as promastigotas procíclicas migram para o segmento anterior do tubo digestivo onde sofrem mais divisões e diferenciação, tornando-se promastigotas metacíclicas infectivas. Os parasitos então migram para a região do esôfago, faringe e válvula estomodeal. O tempo aproximado para completar o desenvolvimento no inseto é de seis a nove dias (dependendo da espécie). Em seguida as formas infectivas podem ser inoculadas em novo hospedeiro vertebrado em outro evento de repasto, reiniciando o ciclo (Stuart *et al*., 2008; Kato *et al*., 2010; Neves, 2011).

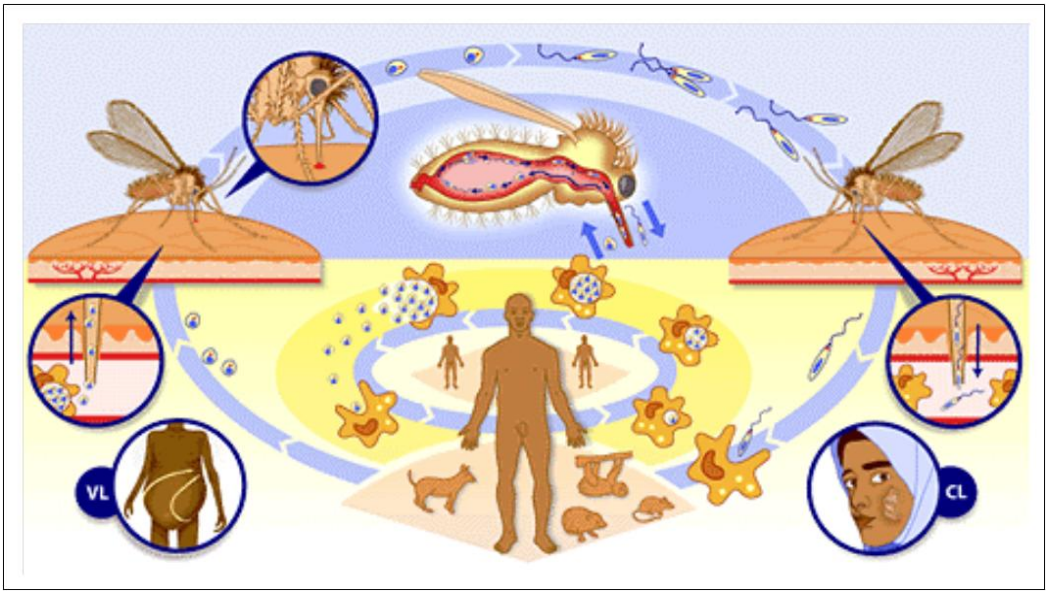

Figura 5: Ciclo biológico das espécies de *Leishmania* causando as leishmanioses. Fonte: Santos *et al*., 2008

2.4. Aspectos Epidemiológicos e Clínicos das Leishmanioses

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias que podem ser agrupadas em duas categorias gerais de acordo com a fonte de infecção que são: as leishmanioses zoonóticas (onde os hospedeiros animais estão incluídos no ciclo de transmissão) e as leishmanioses antroponóticas (onde o homem é a única fonte de infecção para o vetor) (Ready, 2010). Do ponto de vista clínico, as formas das leishmanioses podem ser classificadas como: leishmaniose cutânea (LC) ou tegumentar (LT) onde a forma nas Américas é denominada de leishmaniose tegumentar americana (LTA); leishmaniose visceral (LV) ou calazar; e leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPK) (Pavli e Maltezou, 2010; Kato *et al*., 2010).

2.4.1. Distribuição Geográfica

As leishmanioses apresentam um comportamento endêmico em países tropicais e subtropicais com vasta distribuição mundial. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) as leishmanioses estão distribuídas em 98 países, dos quais 77 são do Velho Mundo e 21 do Novo Mundo. Mais especificamente, a LV ocorre em 76 países (sendo 65 do Velho Mundo e 11 do Novo Mundo) (Figura 6), onde cerca de 90% ocorrem nas áreas rurais mais pobres e suburbanas de Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (WHO, 2010; Palatnik-de-Sousa e Day, 2011; Wang *et al*., 2012).

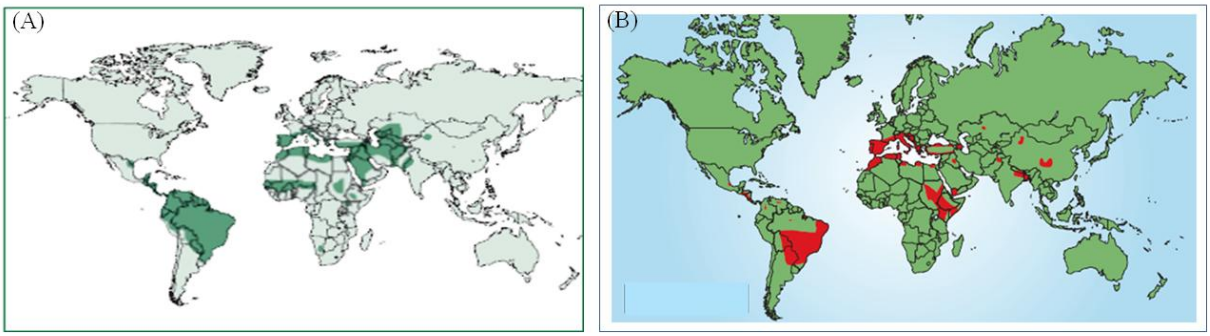

Figura 6: Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea e visceral. (A) As áreas em verde escuro representa a distribuição da leishmaniose cutânea no Velho e Novo Mundo. (B) As áreas em vermelho representa a distribuição da leishmaniose visceral pelo mundo. Fonte: adaptado de Chappuis *et al*., 2007; Reithinger *et al*., 2007; Santos *et al*., 2008

2.4.2. Incidência e Prevalência

A prevalência global das leishmanioses é de 12 milhões de pessoas com mais de 350 milhões de pessoas vivendo em situação de risco. A incidência anual é estimada de 1,0 a 1,5 milhões de novos casos para CL e de 500.000 novos casos para a LV. O número de mortos associado a LV chega a 50 000 mortos por ano, sendo que entre as doenças parasitárias só a malária supera essa taxa (WHO, 2010; Wang *et al*., 2012).

No Brasil, segundo a Fundação Nacional de Saúde, foram confirmados casos de LTA 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 1980-2003) 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 está distribuída em 21 unidades da federação (Figura 7), atingindo as cinco regiões brasileiras, tendo a região Nordeste a que apresenta o maio número de casos (com 48% do total de casos registrados no período de 1980-2003) (Brasil, 2009).

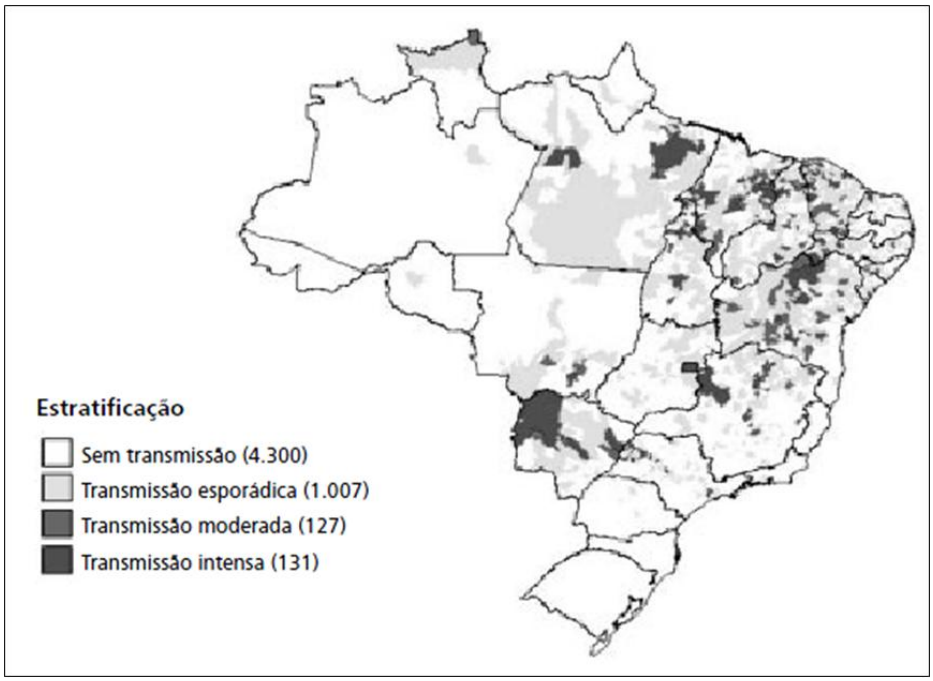

Figura 7: Estratificação dos casos de leishmaniose visceral no Brasil, segundo a média de casos. Brasil, 2005 a 2007. Fonte: (Brasil, 2009)

Em Pernambuco, o número de casos tem aumentado ao longo dos anos apresentando altos índices de prevalência da doença e com registros de casos ocorrendo em todas as regiões geográficas. De acordo com os dados da SES-PE (Secretária Estadual de Saúde de Pernambuco), foram notificados 1.737 casos de LV em Pernambuco, entre 1990 e 2001. Os municípios com maior número de casos notificados, ao longo do período estudado, encontram-se listados na Tabela 1(Dantas-torres e Brandão-Filho, 2006).

Tabela 1. Municípios que mais notificaram casos de leishmaniose visceral em Pernambuco, Brasil, 1990-2001.

Município	Casos notificados	
	nº	%
Caruaru	165	17,2
Ilha de Itamaracá	102	10,6
Salgueiro	74	7,7
Altinho	65	6,8
Surubim	63	6,5
São Caitano	51	5,3
Goiana	44	4,6
São Vicente Ferrer	42	4,4
Petrolina	42	4,4
Riacho das Almas	38	4,0
Serra Talhada	35	3,6
São Bento do Una	31	3,2
Paulista	30	3,1
Vertentes	28	2,9
Taquaritinga do Norte	27	2,8
Frei Miguelinho	27	2,8
Agrestina	25	2,6
Cachoeirinha	25	2,6
Glória do Goitá	25	2,6
Águas Belas	23	2,4
Total	**962**	**100,0**

Fonte: Dantas-torres e Brandão-Filho, 2006

As leishmanioses têm sido consideradas doenças predominantemente infantis, com 80% dos casos registrados, ocorrendo em crianças com menos de 10 anos (Melo, 2004; Costa, 2005; Dantas-torres e Brandão-Filho, 2006). A razão da maior suscetibilidade em crianças é explicada pelo estado de relativa imaturidade imunológica celular, agravado pela desnutrição, tão comum nas áreas endêmicas, além de uma maior exposição ao vetor no peridomicílio (Brasil, 2009). Contundo, ultimamente tem-se verificado uma tendência para a diminuição do número de casos em crianças e o aumento da infecção em adultos, principalmente associado a casos de HIV (Campino e Maia, 2010).

2.4.3. Manifestações Clínicas

Geralmente, as manifestações clínicas das leishmanioses são de evolução crônica, apresentando um grande polimorfismo clínico, determinado pelas características do hospedeiro, da espécie de *Leishmania* envolvida e da resposta imune do indivíduo infectado, portanto fatores genéticos e nutricionais são então variáveis importantes para a definição do desfecho clínico da infeção: o desenvolvimento da doença ou a ausência das manifestações clínicas (Almeida e Santos, 2011; Pelissari *et al*., 2011).

2.4.3.1. Leishmaniose Tegumentar Americana

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa, não contagiosa, que pode ser assintomática ou apresentar um espectro que varia desde lesões cutâneas localizadas (leishmaniose cutânea) ou disseminadas (leishmaniose cutâneo-difuso), até graves lesões mucocutâneas (leishmaniose mucocutânea). É uma doença de caráter antropozonótico e representa um sério problema de saúde pública (Brasil, 2009; Carolina *et al*., 2010; Nascimento e Alves, 2011).

A interação reservatório-parasito na LTA é considerada um sistema complexo, na medida em que é multifatorial, imprevisível e dinâmica, formando uma unidade biológica que pode estar em constante mudança, em função das alterações do meio ambiente. Essas infecções foram descritas em várias espécies de animais silvestres (algumas espécies de roedores, marsupiais, edentados e canídeos silvestres), sinantrópicos (aquelas que vivem próximas às habitações humanas) e domésticos

(canídeos, felídeos e equídeos). Com relação aos equídeos, seu papel na manutenção do parasito no meio ambiente ainda não foi definitivamente esclarecido (Brasil, 2009).

2.4.3.1.1. Leishmaniose Cutânea

A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum das leishmanioses e sua manifestação clínica está associada à infecção por várias espécies de *Leishmania*, dentre elas, *Leishmania major*, *L. aethiopica* e *L. tropica* encontradas no Velho Mundo e os complexos *mexicana* (*L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. amazonensis*, *L. pifanoi*, *L. garnhami*), *braziliensis* (*L. braziliensis* e *L. peruviana*) e *guyanensis* (*L. guyanensis* e *L. panamensis*) no Novo Mundo (Pavli e Maltezou, 2010). Sua principal manifestação clínica é o aparecimento exclusivo de lesões cutâneas (variando de 1 a 10) (Figura 8), ulcerosas ou não, porém limitadas, com presença de grande número de parasitos (Chappuis *et al*., 2007; Goto e Lindoso, 2010) e geralmente com cura espontânea (embora lentamente em indivíduos imunocompetente), pois o próprio hospedeiro desenvolve uma resposta imune adquirida através das respostas celular e humoral (Ready, 2010).

Figura 8: Sinal clínico da leishmaniose cutânea. Imagens de pacientes com lesões características de leishmaniose cutânea. Fontes: Chappuis *et al*., 2007; Goto e Lindoso, 2010

2.4.3.1.2. Leishmaniose Cutâneo-Difuso

A forma cutâneo-difuso das Leishmanioses está associada à infecção pela *L. aethiopica* (no Velho Mundo) e pela *L. amazonensis, L. mexicana,* e *L. pifanoi* (Novo Mundo), sendo as três espécies, do Novo Mundo, pertencentes ao complexo *mexicana* (Bari, 2012). Sua principal manifestação clínica é o aparecimento de lesões múltiplas não ulcerativas (Figura 9), disseminadas pelo tegumento do paciente, assemelhando-se a hanseníase lepromatosa (Claborn, 2010; Goto e Lindoso, 2010).

Figura 9: Sinal clínico da leishmaniose cutânea difusa. Imagens de pacientes com lesões características de leishmaniose cutânea difusa. Fontes: Goto e Lindoso, 2010

2.4.3.1.3. Leishmaniose Mucocutânea

A leishmaniose mucocutânea (LMC), também conhecida como espúndia, está associada à infecção pela *L. aethiopica* (no Velho Mundo) e pela *L. braziliensis*, *L. guyanensis, L. panamensis* e *L. amazonensis* (no Novo Mundo) (Kato *et al*., 2010; Bari, 2012). A LMC é uma manifestação clínica incomum (afeta 5% dos pacientes afetados com LC) e resulta da disseminação hematogênica ou linfática da forma amastigota da

pele para as mucosas naso-orofaríngeas e para o trato respiratório superior (Daneshbod *et al*., 2011). Sua principal manifestação clínica é o aparecimento de lesões ulcerosas destrutivas nas mucosas do nariz, boca, faringe e laringe (Figura 10), podendo prolongar-se por bastante tempo e provocar sérias mutilações, levando até mesmo à morte pelo comprometimento respiratório. Essas lesões não se curam espontaneamente e geralmente são observadas meses ou anos após o primeiro episódio da leishmaniose cutânea (quando os macrófagos da região naso-faringea se tornam colonizados) (Singh, 2006; Chappuis *et al*., 2007; Goto e Lindoso, 2010).

Figura 10: Sinal clínico característico da leishmaniose mucocutânea. Imagens de pacientes com lesões características de leishmaniose mucocutânea. Fontes: Chappuis *et al*., 2007; Reithinger *et al*., 2007

2.4.3.4. Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, comporta-se como uma zooantroponose rural, peri-urbana mas que nas duas últimas décadas atingiu áreas urbanas, se tornando uma endemia em franca expansão geográfica. A difusão desta protoozoose poderia ser explicada fundamentalmente por fatores climáticos e socioeconômicos (Costa, 2005; Brasil, 2009). Na área urbana, o cão (*Canis familiaris*) é a principal fonte de infecção e a enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos

humanos sendo esta mais prevalente que a infecção no homem. No ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) (Mohebali *et al*., 2005; Silva, 2007).

Devido à alta prevalência da leishmaniose canina e o baixo índice de flebotomíneos infectados em algumas regiões endêmicas alguns autores admitem a hipótese da transmissão entre a população canina através da ingestão de carrapatos (*Rhipicephalus sanguineus*) infectados e, mesmo, através de mordeduras, cópula e ingestão de vísceras contaminadas. Não existem, entretanto, evidências sobre a importância epidemiológica desses mecanismos de transmissão para humanos ou na manutenção da enzootia. Em humanos não ocorre transmissão direta da LV de pessoa a pessoa (Rubini *et al*., 2008; Yabsley *et al*., 2008; Brasil, 2009).

2.4.3.4.1. Leishmaniose Visceral Humana

A leishmaniose visceral (LVH) é a forma mais grave das leishmanioses, podendo alcançar uma letalidade de 90%, se não for realizado um tratamento adequado, sendo causada pelos parasitos do complexo *L. donovani* (*L. archibaldi*, *L.donovani, L.chagasi* e *L.infantum*) (Gontijo e Melo, 2004; Palatnik-de-Sousa e Day, 2011). O calazar possui um amplo espectro de manifestações clínicas, onde a infecção pode permanecer assintomática ou subclínica (em muitos casos), ou pode evoluir para formas agudas ou crônicas (Kumar *et al*., 2011). Os fatores predisponentes para o desenvolvimento típico dessa manifestação clínica incluem pobreza, desnutrição, idade jovem, deficiência imunologia e uma alta carga parasitária (Pavli e Maltezou, 2010). A LVH caracteriza-se

por apresentar um acentuado tropismo pelo sistema fagocítico-mononuclear, podendo ser encontrados parasitos em macrófagos na maior parte desse sistema (Chappuis *et al*., 2007).

Normalmente, o paciente infectado pela LVH se apresenta clinicamente com fraqueza, febre, palidez, emagrecimento, pancitopenia, hepatoesplenomegalia (geralmente predomina esplenomegalia) (Figura11), linfadenopatia e uma deterioração progressiva (Singh *et al*., 2006; Pavli e Maltezou, 2010; Kumar *et al*., 2011). Ocasionalmente, o calazar pode se manifestar como uma hepatite aguda, como uma coleocistite, como uma síndrome hemofagocítia e como uma síndrome de Guillain-Barré (Pavli e Maltezou, 2010).

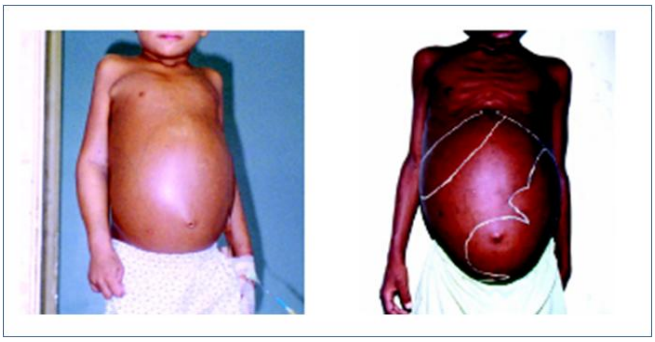

Figura 11: Sinal clínico da leishmaniose visceral. Imagens de pacientes com hepatoesplenomegalia, características clínica típica da leishmaniose visceral. Fontes: Murray *et al*., 2005

2.4.3.4.2 Leishmaniose Visceral Canina

A infecção em cães por espécies de *Leishmania* é clinicamente semelhante à infecção humana, embora no cão, além do acometimento das vísceras, são frequentemente encontradas lesões de pele nos animais infectados e sintomáticos

(Krauspenhar *et al*., 2007). O quadro clínico dos cães infectados apresenta um espectro de características clínicas que varia do aparente estado sadio (assintomáticos) a um severo estágio final (sintomáticos) (Baneth e Aroch, 2008).

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença crônica, fatal e sistêmica, sendo os principais sinais clínicos no cão representados pela caquexia, hipergamaglobulinemia, hepatoesplenomegalia, anemia e linfadenopatia. Na pele são comuns úlceras crostosas na orelha, focinho e região periorbital, descamação furfurácea e alopecia multifocal. As preparações citológicas de pele de orelha podem demonstrar a presença de formas amastigotas do parasita (Krauspenhar *et al*., 2007; Silva, 2007).

2.4.4. Resposta Imune para Leishmaniose Visceral

Em animais vertebrados, o sistema imune utiliza-se de dois conjuntos de interações celulares e moleculares distintos, que interagem entre si desencadeando a resposta imune inata e/ou a resposta imune adaptativa. Na modulação da resposta imune, o macrófago apresenta os antígenos aos linfócitos T CD4+, que podem ser subdivididos em pelo menos duas subpopulações: Th1 e Th2. A indução preferencial das células Th1 ou Th2 depende de alguns fatores, como a dose infectante, o mecanismo de apresentação pela célula apresentadora de antígeno (APC), a via de inoculação e o padrão genético do hospedeiro. Algumas das citocinas produzidas pela resposta do tipo Th1 ou Th2 possuem caráter regulador, favorecendo ou inibindo a expansão celular de um ou outro grupo (Murray *et al*., 2005; Neves, 2011).

A resposta imune adaptativa é subdividida em resposta imune humoral e resposta imune celular. Na resposta imune humoral T-dependente (Th2), os linfócitos T $CD4^+$ são produtores de citocinas (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13), que estimulam a diferenciação dos linfócitos B (para a produzirem as imunoglobulinas IgA, IgG, IgM, IgE), que funcionam como moléculas efetoras. Na resposta imune celular, também denominada de resposta imune do tipo Th1, linfócitos T $CD4^+$, produtores de citocinas como IFN-γ, interleucina-2 (IL-2) e fator de necrose tumoral (TNF) estimulam à atividade microbicida de macrófagos e/ou a atividade citolítica de linfócitos T CD8 (linfócitos citotóxicos), resultando na destruição de microrganismos presentes em compartimentos intracelulares (Piscopo e Mallia Azzopardi, 2007; Abbas *et al*., 2008).

A maioria dos estudos de mecanismos de resposta imune foi realizada em modelos murinos, entretanto os dois padrões de resposta Th1 e Th2 são similares em humanos. A resistência do hospedeiro às leishmanioses em geral está associada à ativação seletiva e diferenciação de células efetoras T *helper* $CD4^+$ (Th1), as quais secretam um padrão de citocinas específicas (IL-2, INF-γ, IL-12 e TNF-α). Estas citocinas, conhecidas como citocinas pré-inflamatórias, favorecem a ativação de células fagocíticas capazes de destruir as células de *Leishmania* dentro dos fagolisossomos, através da produção de radicais livres de óxido nítrico e de oxigênio (Stanley e Enqwerda, 2007; Goto e Prianti, 2009; El-On, 2009; Maltezou, 2010; Kaye e Aebischer, 2011; Neves, 2011). Por outro lado, a suscetibilidade a infecção está relacionada com a resposta de células $CD4^+$ (Th2), que induzem a resposta humoral, inibem a ativação de macrófagos, produzindo IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e TGF-β, responsáveis por atividades anti-inflamatórias, como: a inibição de macrófagos (pelo INF-γ produzido pelas células $TCD4^+$); a inibição da transcrição do TNF-α; e a inibição da produção de

peróxido de hidrogênico (H_2O_2) (Stanley e Enqwerda, 2007; Goto e Prianti, 2009; Kaye e Aebischer, 2011; El-On, 2009; Maltezou, 2010; Neves, 2011).

Em resumo, o sucesso da infecção e desenvolvimento da leishmaniose visceral dependerá da resposta desenvolvida pelo hospedeiro vertebrado, pois se ocorrer: o aumento da resposta do tipo Th2 em relação à do tipo Th1, a desativação de macrófagos por ação de citocinas, o aumento de IL-10 em sinergismo com IL-4 mesmo em presença de IFN-γ, levam o hospedeiro ao fracasso no controle da infecção (Goto e Prianti, 2009; Kaye e Aebischer, 2011).

2.5. Controle da Leishmaniose Visceral

Atualmente, o Ministério da Saúde (MS), por intermédio da FUNASA (Fundação Nacional de Saúde) e de Secretarias Estaduais e Municipais de Saúde, realiza o Programa de Controle da LV no Brasil, centrado num tripé de ações que atuam no inseto vetor, no hospedeiro vertebrado e no diagnóstico/tratamento precoces dos casos humanos incluindo co-infecções com HIV (Alves e Bevilacqua, 2004). As ações antivetoriais constituem um dos principais elementos desse programa e se baseiam na aplicação de inseticidas e uso de equipamentos de proteção individual (barreiras que impeçam o acesso de vetores, tais como redes) em áreas com transmissão de LV. Outro ponto bastante explorado no controle da LV é a identificação de hospedeiros vertebrados (cães) doentes ou infectados e sua subseqüente eliminação. Apesar de ser uma das ações propostas, pela FUNASA, o impacto dela tem sido discutido por se mostrar trabalhoso e de eficácia duvidosa (Chappuis *et al*., 2007; Clem, 2010).

O desenvolvimento de estratégias, tanto no campo da terapêutica como no controle do vetor, e eliminação do hospedeiro doméstico, não tem se mostrado eficaz em conter a epidemia de leishmanioses (Maia-elkhoury e Sena, 2008). Desta forma, a busca de novas ferramentas que contribuam de forma determinante e efetiva no combate às leishmanioses é imprescindível. E uma dessas ferramentas seria a vacina, embora atualmente, não existam vacinas eficazes contra a leishmaniose visceral seja na sua forma humana ou canina.

2.5.1. Métodos de Diagnóstico da Leishmaniose Visceral

O diagnóstico precoce da leishmaniose visceral é fundamental para o controle das complicações da doença e diferentes técnicas podem ser utilizadas para o diagnóstico de leishmaniose visceral humana e canina. O diagnóstico é rotineiramente realizado com base em parâmetros clínicos e epidemiológicos, porém, o diagnóstico clínico é complexo, visto que algumas doenças compartilham sintomatologia similar a outras patologias presentes nas áreas onde incide a LV como: Doença de Chagas, malária, esquistossomose, febre tifóide e tuberculose. Muitos avanços têm ocorrido nos últimos anos, mas a despeito do grande número de testes disponíveis para o diagnóstico da LV, nenhum apresenta 100% de sensibilidade e especificidade (Alves e Bevilacqua, 2004; Singh, 2006; Srivastava *et al*., 2011).

2.5.1.1. Diagnóstico Parasitológico

A visualização direta de amastigotas a partir de amostras clínicas é o padrão ouro para confirmação do diagnóstico da leishmaniose visceral, devido a sua especificidade. A demonstração do parasito pode ser feita em material de biópsia ou punção aspirativa do baço, fígado, medula óssea ou linfonodos (Figura 12). O material obtido é utilizado para a confecção de esfregaço ou impressão em lâminas, histologia, isolamento em meios de cultura ou inoculação em animais de laboratório. A especificidade desses métodos é de 100%, mas a sensibilidade é muito variável pois a distribuição dos parasitas não é homogênea no mesmo tecido (Murray *et al*., 2005; Chappuis *et al*., 2007; Assis *et al*., 2008; Srivastava *et al*., 2011). A sensibilidade da pesquisa direta em esfregaços em lâmina varia de 95 a 98% para o aspirado de baço, 76 a 91% para o de fígado, 52 a 89% para o de medula-óssea e 52 a 69% para o de linfonodos. O cultivo dos parasitos aumenta a sensibilidade da pesquisa (acima de 80%), mas pode retardar o diagnóstico em semanas (Assis *et al*., 2008). Assim, apesar desses métodos serem considerados o padrão ouro, muitos dos testes são invasivos para o paciente, exigem ambientes apropriados para a coleta e requerem laboratoristas experientes. Além disso, são laboriosos, não apresentem sensibilidade ideal e não são procedimentos adequados para estudos epidemiológicos em larga escala. Entretanto eles continuam sendo considerados padrão ouro devido à inexistência de melhores alternativas (Desjeux, 2004; Gontijo e Melo, 2004; Murray *et al*., 2005; Assis *et al*., 2008).

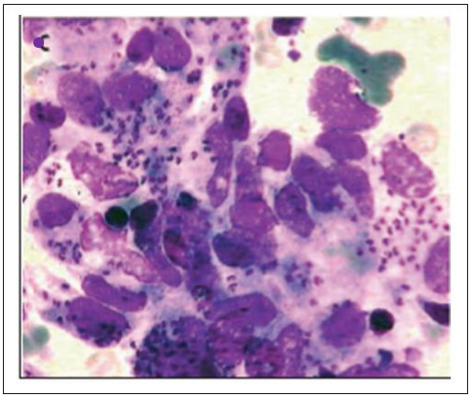

Figura 12: Esfregaço de aspirado esplênico (Baço), corado com Giemsa. Conglomerado de células mononucleares infectadas por numerosas amastigotas. Fonte: Murray *et al*., 2005

2.5.1.2. Diagnóstico Molecular

Diversas técnicas de biologia molecular foram desenvolvidas para a detecção e identificação precisa dos parasitas do gênero *Leishmania*, sem necessidade de isolamento do parasita em cultura. A principal técnica é Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction*). Esta técnica tem sido descrita como um método sensível e específico para a detecção do parasita, independente da imunocompetência ou da história clínica do paciente. O PCR tem sido ainda utilizado com várias finalidades além do diagnóstico, tais como o monitoramento do tratamento e estudos epidemiológicos (Gontijo e Melo, 2004; Singh, 2006; Srivastava *et al*., 2011).

Diferentes sequências de DNA do genoma de *Leishmania* ja foram documentadas para o uso no diagnóstico e prognóstico da leishmaniose visceral, tais como: sequencia telomérica, regiões dos minicirculos do DNA do kinetoplasto, entre outras, ja foram documentadas no uso para o diagnóstico e prognóstico da leishmaniose

visceral. Como prova diagnóstica a técnica de PCR 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) (Gontijo e Melo, 2004; Singh, 2006; Brasil, 2009; Srivastava *et al*., 2011).

2.5.1.3. Métodos Sorológicos Clássicos de Diagnóstico

Os diagnósticos sorológicos para as leishmanioses baseiam-se na presença da resposta imune humoral, em outras palavras, utilizam técnicas imunológicas para detecção de anticorpos (imunoglobulinas) anti-*Leishmania*, através das reações de: ELISA (ensaio imunoenzimático), RIFI (imunofluorescência indireta), DAT (teste de aglutinação direta), *Imunoblotting* e teste rápido (Srivastava *et al*., 2011). No Brasil, os testes imunológicos (ou sorológicos) mais utilizados no diagnóstico de LV humana e canina são o ELISA e o RIFI, sendo o primeiro, o teste de escolha para inquéritos populacionais e o segundo, o mais utilizado para imunodiagnóstico de leishmaniose visceral por ser um pouco mais sensível que o ELISA (Gontijo e Melo, 2004; Brasil, 2009).

O teste RIFI baseia-se na detecção de anticorpos, conjugados a fluorocromo, na fase inicial da infecção. A sensibilidade desse teste é de 96% e a especificidade é de 98%, mas a exigência de condições laboratoriais sofisticadas impede que esse teste seja aplicado no campo, ou seja, em estudos epidemiológicos. Consideram-se como positivas as amostras reagentes a partir da diluição de 1:80. Nos títulos iguais a 1:40, com clínica sugestiva de LV, recomenda-se a solicitação de nova amostra em 30 dias

(Brasil, 2009; Srivastava *et al*., 2011). Já o ensaio de ELISA é uma ferramenta muito valiosa, pois é muito útil em análises de laboratório, em testes epidemiológicos, e é um dos testes sorológicos mais sensíveis para a LV. A sensibilidade e a especificidade, do ELISA, dependem do antígeno a ser utilizado. O resultado do teste é expresso em unidades de absorbância a um raio de luz, em uma reação com diluições fixas ou mais comumente, apenas como reagente ou não (Gontijo e Melo, 2004; Singh, 2006; Brasil, 2009; Srivastava *et al*., 2011). Ambos os métodos possuem duas grandes limitações: a primeira é que pacientes com recaída para LV não podem ser novamente diagnosticados, pois os níveis séricos de anticorpos, após um tratamento bem sucedido, ainda podem ser detectados por vários anos após a cura; e a segunda é que uma proporção significativa de indivíduos saudáveis que vivem em áreas endêmicas sem história de LV são positivos para anticorpos anti-*Leishmania* devido a infecções assintomáticas. A soroprevalência em populações saudáveis varia de menos que 10% (áreas endêmicas de baixa a moderada) a maior que 30% em focos de alta transmissão (Chappuis *et al*., 2007).

2.5.1.4. Métodos Sorológicos que Fazem Uso de Proteínas Recombinantes

Apesar de amplamente utilizados, os testes sorológicos utilizados mais comumente no diagnóstico das leishmanioses apresentam sensibilidade e especificidade limitadas, visto que os antígenos utilizados nestes testes diagnósticos são quase sempre derivados de promastigotas de cultura, parasitos intactos ou moléculas solúveis proveniente do lisado do parasito. Estes antígenos geralmente apresentam reações cruzadas com outras espécies da família Trypanosomatidae, e mesmo com outros

microrganismos filogeneticamente distantes. Por conta disso, a pesquisa de novos antígenos recombinantes, com a finalidade de aperfeiçoar os métodos diagnósticos para a leishmaniose visceral humana e canina, tem sido o foco de trabalhos de pesquisa de inúmeros grupos, no Brasil e em outros países. Nesse sentido deve ser dada ênfase à pesquisa de componentes antigênicos purificados que possam ser utilizados como ferramenta para obtenção de um diagnóstico específico, assegurando maior sensibilidade e especificidade aos testes (Gontijo e Melo, 2004; Kubar e Fragaki, 2005; Dourado *et al*., 2007).

Vários antígenos com diferentes massas moleculares têm sido identificados com potencial para uso no diagnóstico das leishmanioses, mas vale destacar o antígeno recombinante rK39, um polipeptídeo que consiste de repetições de 39 aminoácidos e que faz parte de uma proteína denominada de kinesina, cuja sequência de aminoácidos é conservada no complexo de *L. donovani* (Burns *et al*., 1993). Esse antígeno, quando empregado no ELISA, mostrou 100% de especificidade e 96% de sensibilidade para o diagnóstico da leishmaniose visceral. Uma importante característica deste antígeno é que ele pode ser empregado em pacientes coinfectados com HIV, nos quais os níveis de anticorpos contra rK39 declinam rapidamente com o sucesso do tratamento (Kubar e Fragaki, 2005; Singh, 2006; Chappuis *et al*., 2006, 2007; Srivastava *et al*., 2011).

Um teste imunocromatográfico simples e rápido, baseado na reação do soro ou sangue do paciente, foi desenvolvido utilizando-se o rK39 fixado em papel de nitrocelulose (Teste Rápido Anticorpo *Leishmania donovani* - TRALd). Numa avaliação clínica inicial foram observados 100% de sensibilidade e 98% de especificidade. Com isso, o TRALd passou a ser visto como um instrumento promissor em programas de controle da LV, pois requer pequena quantidade de sangue periférico, é de rápida

execução e leitura (entre 10 e 20 minutos) e poderia ser utilizado em condições de campo (Delgado *et al*., 2001; Carvalho *et al*., 2003; Chappuis *et al*., 2006, 2007; Gomes *et al*., 2008; Srivastava *et al*., 2011). Entretanto, foram levantadas discrepâncias entre trabalhos que, utilizando o K39 no mesmo formato em diferentes países do mundo, mostraram resultados marcadamente diferentes. Estes dados sugerem que o formato do teste em que o antígeno recombinante é empregado pode interferir em sua sensibilidade (Zijlstra *et al*., 2003). Recentemente uma nova versão do TRALd foi produzida que difere pelo acréscimo de um segundo antígeno, o K26 (também uma kinesina conservada no complexo *L. donovani*), 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 (da Costa *et al*., 2003; Gontijo e Melo, 2004; Mohebali *et al*., 2004; Singh, 2006; Chappuis *et al*., 2006, 2007; Srivastava *et al*., 2011).

Outros antígenos considerados candidatos para o diagnóstico da LV são o recombinante A2 e os antígenos, recombinantes ou purificados, derivados das glicoproteínas de membranas gp63, gp70, gp72, todas específicas do gênero *Leishmania*. A proteína A2 recombinante é expressa em amastigotas como uma família de proteínas que apresenta um número de repetições de dez aminoácidos e estudos sugerem que ela é particularmente útil para o diagnóstico da LVC (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).

Embora as pesquisas, em detectar e avaliar antígenos recombinantes, com a finalidade de aperfeiçoar os métodos diagnósticos para a leishmaniose visceral humana

e canina, apresentem resultados promissores nos trabalhos publicados são indispensáveis estudos mais aprofundados em relação à acurácia dos testes, visto que variações na especificidade e sensibilidade dos mesmos podem ser observadas em estudos realizados em diferentes regiões endêmicas (Assis *et al*., 2008; Oliveira *et al*., 2011).

2.5.2. Tratamento da Leishmaniose Visceral Humana e Canina

Por mais de sessenta anos o tratamento das leishmanioses vem sendo realizado com a administração de antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}), que são os medicamentos de primeira escolha para o tratamento dos pacientes infectados. Há dois tipos de antimoniais pentavalentes que podem ser utilizados: o antimoniato de N-metil glucamina e o stibogluconato de sódio (esse último não comercializado no Brasil). A vantagem do uso dessas drogas se deve pelo fato delas poderem ser administradas no nível ambulatorial, o que diminui os riscos relacionados à hospitalização (Gontijo e Melo, 2004; Brasil, 2011; Croft e Olliaro, 2011; Seifert, 2011). Os antimoniais pentavalentes são drogas consideradas leishmanicidas, pois interferem na bioenergética das formas amastigotas de *Leishmania*. Tanto a glicólise, quanto a oxidação dos ácidos graxos, processos localizados em organelas peculiares, são inibidos, sendo que essa inibição é acompanhada de redução na produção de ATP e GTP (Brasil, 2009; Seifert, 2011).

Nos últimos anos, por recomendação da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do Centro de Controle de Doenças (CDC) dos Estados Unidos da América, doses progressivamente maiores dos antimoniais têm sido recomendadas devido ao

aparecimento de resistência primária do parasito a essas drogas, principalmente em países como Sudão, Quênia e Índia (Bhattacharya *et al*., 2006a, 2006b). No Brasil, apesar de não existirem relatos da presença de cepas de *L. chagasi* resistentes aos antimoniais, recomenda-se o tratamento da leishmaniose visceral com a dose de 20mg de Sb^{+5} kg/dia, com aplicação endovenosa ou intramuscular, por no mínimo 20 e no máximo 40 dias (Singh *et al*., 2006; Brasil, 2009; Pavli e Maltezou, 2010). Não havendo resposta satisfatória com o tratamento pelo antimonial pentavalente, as drogas de segunda escolha são a anfotericina B (é a droga leishmanicida mais potente disponível comercialmente) e o isotionato de pentamidina, caracterizadas pela alta eficácia, custo elevado e diversos efeitos colaterais. A anfotericina B é a única opção no tratamento de gestantes e de pacientes que tenham contra-indicações ou que manifestem toxicidade ou refratariedade relacionada ao uso dos antimoniais pentavalentes (Singh *et al*., 2006; Brasil, 2011; Croft e Olliaro, 2011).

Com relação ao tratamento canino existe bastante controvérsia, pois apesar dos cães apresentarem redução da carga parasitaria e remissão das manifestações clínicas por meio de fármacos tradicionalmente utilizados no tratamento humano, (antimomiais associados ao alopurinol, a aminosidina e a anfotericina B), com grande frequência, apresentam recaídas após a interrupção do tratamento, mesmo na ausência de re-infecção. Além disso, animais supostamente “curados” ainda podem servir como reservatórios do parasito e com isso a eutanásia de todos os animais doentes e/ou portadores é indicada por lei. (Melo, 2004; Brasil, 2006; Miró *et al*., 2008).

Apesar de existir tratamento quimioterápico para a LV, todas as drogas são tóxicas, nem sempre efetivas, e na LV são usadas em esquemas prolongados. A utilização delas apresenta sérias complicações e contra-indicações como: insuficiência

renal, insuficiência hepática, insuficiência cardíaca, hipersensibilidade aos componentes da formulação além de serem contra-indicadas na gravidez. No que concerne a sua transmissão, o impacto do controle da LVC através da remoção e sacrifício dos cães soropositivos tem também sido um ponto de discussão por se mostrar de eficácia duvidosa, mas ao mesmo tempo é reforçado pela ausência de tratamento eficaz ou profilático para o animal infectado (Gontijo e Melo, 2004; Brasil, 2011). Diante dessas problemáticas se fazem necessários mais estudos sobre esses parasitas com o objetivo de elucidar sua biologia para o desenvolvimento de novos e melhores produtos quimioterápicos e desenvolver novos meios de controle dessa doença.

2.5.3. Vacinas para Controle das Leishmanioses

Muitas pesquisas têm sido realizadas buscando auxiliar o desenvolvimento de uma vacina efetiva contra as leishmanioses. Várias destas têm investigado diferentes formulações antigênicas e vias de imunização, como a utilização de parasitas mortos ou atenuados, proteínas recombinantes de *Leishmania* e vacinas de DNA, além do uso de imunomoduladores derivados da saliva do inseto vetor (Tabela 2) (Evans e Kedzierski, 2012).

Tabela 2: Vacina candidatas avaliadas contra a leishmaniose visceral

Antígenos	Fonte do Antígeno	Tipo de Vacina	Modelo Animal	Resultado	Referêcias
KMPII, TRYP, LACK e GP63	*L. infantum*	Vacina de DNA	Cão	Sem Proteção	Rodríguez-Cortés *et al*.,2007
H2A, H2B, H3 e H4	*L. infantum*	Vacina de DNA	Rato	Sem Proteção	Carrión *et al*., 2008
p36 LACK	*L. infantum*	Vacina de DNA + Proteína expressa no vírus vaccinia	Rato	Proteção	Dondji *et al*., 2008
p36 LACK	*L. infantum*	Vacina de DNA	Rato	Sem Proteção	Marques-da –Silva *et al*., 2005
p36 LACK	*L. infantum*	Vacina de DNA	Rato	Proteção	Gomes *et al*., 2007
p36 LACK	*L. infantum*	Vacina de DNA + Proteína expressa no vírus vaccinia	Cão	Proteção	Ramiro *et al*., 2003
p36 LACK	*L. infantum*	Vacina de DNA + Proteína expressa no vírus vaccinia	Cão	Proteção	Ramos *et al*., 2008
CPA e CPB	*L. infantum*	Vacina de DNA + Proteína recombinante	Rato	Proteção	Rafati *et al*., 2006
CPA e CPB	*L. infantum*	Vacina de DNA + Proteína recombinante	Cão	Proteção	Rafati *et al*., 2005
CTE do CPIII	*L. infantum*	Vacina de DNA + Proteína recombinante	Rato	Sem Proteção	Rafati *et al*., 2008
CPC	*L. infantum*	Vacina de DNA + Proteína recombinante	Rato	Proteção	Khoshgoo *et al*., 2008
LCR1	*L. infantum*	Proteína Recombinante	Rato	Proteção Parcial	Wilson *et al*., 1995
LCR1	*L. infantum*	Proteína expressa em BCG	Rato	Proteção Parcial	Streit *et al*., 2000
PapLe22	*L. infantum*	Vacina de DNA	Hamster	Proteção Parcial	Fragaki *et al*., 2001
NH36	*L. donovani*	Vacina de DNA	Rato	Proteção Parcial	Aguilar-Be *et al*., 2001
FML	*L. donovani*	Proteína	Rato	Proteção Parcial	Aguilar-Be *et al*., 2005

FML	*L. donovani*	Proteína	Rato	Proteção	Oliveira-Freitas *et al*., 2006
Q protein	*L. infantum*	Proteínas recombinantes fusionadas (Lip2a, Lip2b, P0, e H2A) + BCG	Cão	Proteção	Molano *et al*., 2003
Q protein	*L. infantum*	Proteínas recombinantes fusionadas (Lip2a, Lip2b, P0, e H2A) + BCG	Rato	Proteção Parcial	Parody *et al*., 2004
A2	*L. donovani*	Proteína Recombinante	Cão	Proteção Parcial	Fernandes *et al*., 2008
A2 e NH	*L. donovani*	Vacina de DNA	Rato	Proteção Parcial	Zanin *et al*., 2007
LiESAp	*L. infantum*	Proteína Nativa	Cão	Proteção	Lemesre *et al*., 2005 e 2007
LiESAp	*L. infantum*	Proteína Nativa	Cão	Proteção	Bourdoiseau *et al*., 2009
Leish-111f	*L. major*	Poliproteína Recombinante (TSA, LmSTI1 e LeIF	Cão	Sem Proteção	Gradoni *et al*., 2005
Leish-111f	*L. major*	Poliproteína Recombinante (TSA, LmSTI1 e LeIF	Cão	Proteção	Coler *et al*., 2007
Leish-111f	*L. major*	Poliproteína Recombinante (TSA, LmSTI1 e LeIF	Cão	Proteção	Trigo *et al*.,2010

Legendas: CP: Cisteína Proteinase; CTE: Extensão do C-terminal; BCG: bacillus *Mycobacterium bovis* Calmette-Guerin; SLA: Antígenos solúveis de *Leishmanias* sp.; FML: Ligação fucose-manose; LiESAp: Antígeno purificado secretado e excretado de *Leishmania infantum*; LPG: Lipofosfoglicano. Fonte: adaptado de (Evans and Kedzierski, 2012).

As vacinas de primeira geração são aquelas produzidas através da imunização com parasitos vivos, atenuados ou mortos. A “leishmanização” é descrita como a estratégia de imunização mais bem sucedida em humanos e desenvolve imunidade

duradoura após infecção induzida com parasitas viáveis não atenuados. Essas vacinas mimetizam o curso natural da infecção e induzem imunidade após a cura, entretanto sua utilização, embora promissora, não é segura (Palatnik-de-Sousa, 2008; Tavares *et al*., 2009; Evans e Kedzierski, 2012). Por conta disso, seu uso foi restringido já que não é possível utilizar este tipo de abordagem profilática. Em contrapartida, a possibilidade de vacinação com parasitos vivos atenuados tem sido de grande interesse porque, além de mimetizar o curso da infecção, grande quantidade de antígeno é depositada, assegurando a indução de uma resposta imune protetora. Apesar de atenuados, estes parasitas podem reverter esta situação e tornarem-se infectivos, levando ao desenvolvimento de doença. Já as vacinas com parasitas mortos ou com os lisados dos mesmos, não produz uma proteção eficaz e, além disso, carecem de padronização e apresentam um custo elevado pela manutenção dos parasitos (Palatnik-de-Sousa, 2008; Tavares *et al*., 2009; Evans e Kedzierski, 2012).

As vacinas de segunda geração incluem proteínas recombinantes, poliproteínas, vacinas de DNA, moléculas purificadas entre outros. As vacinas de DNA são mais estáveis em comparação com as outras vacinas, 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. 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 (Evans e Kedzierski, 2012). 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.

2.6. Resultados Prévios que Deram Origem a este Trabalho

Em trabalhos anteriores, numa colaboração entre as unidades da FIOCRUZ de Recife (Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães) e Salvador (Laboratório de Patologia e Biointervenção, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz) buscou-se idenficar novos polipeptídeos de *L. chagasi* com potencial para uso no diagnóstico sorológico da LV. Novos antígenos foram então identificados através do rastreamento de duas bibliotecas de expressão de *L. chagasi* (uma genômica e outra de cDNA) com soros de animais e pacientes humanos acometidos por esta doença. Como resultado deste rastreamento, e após análise por homologia das sequências dos clones obtidos com sequências de bancos de dados genômicos de *L. infantum* e *L. major*, foram identificados clones codificando sete proteínas distintas (Magalhães, 2007). Quatro destas foram avaliadas quanto ao seu potencial no diagnóstico da leishmaniose visceral por meio de ensaios de ELISA com soros de animais e humanos portadores de LV. Os ensaios de ELISA foram realizados utilizando soros humanos e soros caninos organizados em três grupos: soros confirmadamente positivos para LV; soros controle negativos, e soros com outras parasitoses (Oliveira *et al*., 2011). Foram realizados ELISAs utilizando extrato total de *L. chagasi* e as proteínas recombinantes, a fim de investigar seu uso potencial para o diagnóstico das LV humana e canina. Todas as proteínas recombinantes apresentaram especificidade de 100% frente aos soros de indivíduos sadios e cães controle. Além disso, essas proteínas recombinantes apresentaram uma sensibilidade variável frente aos soros de indivíduos sadios e cães

controle (Magalhães, 2007). Um resultado importante derivado destas análises é que os antígenos mais eficientes na detecção da LV humana não eram os melhores para a LV canina e vice-versa, ressaltando a importância de se avaliar em separado os dois sistemas, humano e canino, na hora de se otimizar os testes de detecção da LV (Magalhães, 2007; Oliveira *et al*., 2011; e dados não publicados).

Misturas com duas ou mais proteínas recombinantes também foram avaliadas por ELISA e os resultados foram promissores, quando testados com soros de cães (dados não publicados). Contudo a produção de um *kit* de diagnóstico com duas, três ou mais proteínas recombinantes, aumenta os custos e dificulta a padronização, portanto, o ideal seria produzir uma única proteína quimérica que apresente sensibilidade comparada aos mixes dessas proteínas. Dessa forma, nosso grupo identificou possíveis regiões antigênicas dessas proteínas e desenhou, através de recursos de bioinformática, genes que reuniam essas regiões dos melhores candidatos. Esses genes foram enviados para a síntese comercial para, no decorrer do presente trabalho, serem utilizados na construção de genes e proteínas quiméricas com o intuito de avaliar a sua eficiência do diagnóstico da LV.

3. Objetivos

3.1 Geral

Contribuir no aperfeiçoamento dos testes sorológicos da leishmaniose visceral humana e canina, utilizando proteínas quiméricas compostas por regiões antigênicas de proteínas pré-selecionadas.

3.2 Específicos

- Construir os genes quiméricos compostos pelas regiões repetitivas, em diferentes combinações, das proteínas pré-selecionadas;

- Estabelecer a melhor condição para expressão e purificação das respectivas proteínas quiméricas;

- Avaliar a sensibilidade e a especificidade utilizando ensaios de ELISA.

4. Metodologia

4.1 Construção dos Genes Sintéticos

Em trabalhos anteriores em colaboração com o Laboratório de Patologia e Biointervenção do Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz – CPqGM / Fiocruz, foram desenhados e enviados para a síntese comercial alguns genes sintéticos (Figura 13) candidatos a componentes de vacina para leishmaniose visceral humana e canina desenvolvida pelo grupo. Esses genes sintéticos reúnem regiões altamente antigênicas de proteínas recombinantes pré-selecionadas. Para a construção desses genes sintéticos foram utilizados programas de bioinformática como Protean (DNAstar), cascade SVM (PMID: 14978300), além de busca em bancos de dados com acesso disponível pela internet, com o objetivo de localizar e selecionar regiões que apresentem motivos repetitivos, regiões polares e epítopos para MHC I e II. Além disso, as sequências foram unidas e otimizadas pelo programa LETO 1.0 levando em consideração a fase de leitura, freqüência de códon, estrutura secundária do mRNA, distribuição do conteúdo de GC e sítios de restrição. Posteriormente, as seqüências otimizadas foram fusionadas a dois sítios múltiplos de clonagem: 5' (*Sal*I, *Nhe*I, *Xho*I e *Xba*I) e 3'(*EcoR*I, *Kpn*I e *Hind*III).

Para preservar a identidade desses genes e garantir o direito da propriedade intelectual esses genes doravante serão denominados de genes *dof1*, *dof2* e *dof3*.

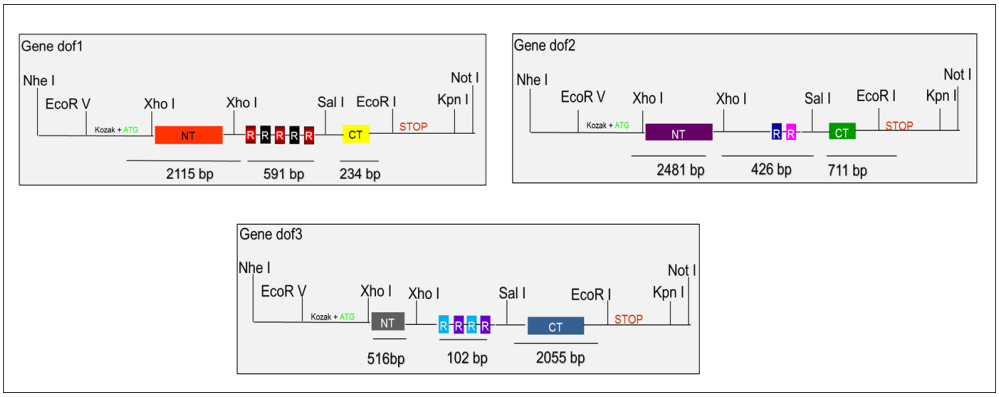

Figura 13: Esquema representativo dos genes sintéticos. Observamos que as todas as regiões de interesse foram desenhadas entre sítios de enzimas de restrição e portanto podemos formular várias estratégias de subclonagens. As siglas NT, R e CT significam: região N-Terminal, região repetitiva e região C-Terminal respectivamente.

4.2 Construção dos Genes Quiméricos

Após a identificação, através de duas bibliotecas de expressão de *L. chagasi* (uma genômica e outra de cDNA), e de testes preliminares dos genes *dof1*, *dof2* e *dof3* em trabalhos anteriores, os mesmos foram otimizados e enviados a sintése comercial como mencionado no item anterior.

Então, de posse dos genes (*dof1*, *dof2* e *dof3*) sintéticos, foram traçadas estratégias utilizando o programa DNASTAR, para subclonar os insertos desejados, em vetores plasmidiais de expressão da série pRSET, através de digestões com enzimas de restrição (*NEW ENGLAND Biolabs*$_{inc.}$) a 37ºC por 2 horas. Esses plasmídios foram escolhidos porque eles fusionam a proteína induzida a uma sequencia de seis histidinas na sua extremidade N-terminal, o que facilita sua purificação.

Para a construção de cada um dos genes quiméricos foi necessário a realização de três etapas de subclonagens sucessivas.

4.2.1 Digestão com Enzimas de Restrição

De acordo com a estratégia traçada, os genes sintéticos (*dof1*, *dof2* e *dof3*) foram digeridos com a dupla de enzimas *Xho*I / *EcoR*I, a fim de excisá-los do plasmídio de clonagem pMK e posterioemente subclona-los no vetor de expressão da séria pRSET. Além disso, também foi necessário o uso das enzimas *Xho*I / *Sal*I para exisar as regiões repetitivas desses mesmos genes. Para correta utilização das enzimas foram seguidas todas as instruções do fabricante (*NEW ENGLAND Biolabs*$_{inc.}$).

4.2.2 Purificação dos Insertos e dos Vetores Plasmidiais

Após as digestões, os insertos foram purificados e separados do vetor pMK através de corrida eletroforética em gel de agarose 1% com *SYBR safe* DNA (*Invitrogen*), sendo a análise da digestão feita por comparação entre o tamanho das bandas geradas pela digestão e o tamanho dos fragmentos esperados pelo mapeamento do sequenciamento. A documentação desta etapa foi feita através da fotografia do gel de agarose 1% com *SYBR safe* sob iluminação ultravioleta. Após a confirmação do sucesso das digestões, as bandas desejadas foram separadas das demais com a continuação da eletroforese por um tempo maior e com o auxílio de um bisturi, o gel foi excisado na posição das bandas dos insertos desejados. Foi realizada a purificação dos fragmentos através do kit de extração de DNA em gel de agarose *GFX*^{TM} *PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE *Healthcare*) seguindo o protocolo do fabricante.

4.2.3 Ligação dos Fragmentos nos Plasmídios Vetores, Transformação, Minipreparação e Confirmação da Subclonagem

O vetor plasmidial foi usado para construção do plasmídio recombinante através da ligação do plasmídio digerido e fragmento purificado com a enzima T4 DNA ligase (*NEW ENGLAND Biolabs*$_{inc.}$) a 16ºC por 12 horas. As construções foram então utilizadas para transformar bactérias *Escherichia coli* (DH10β) competentes através de choque térmico (30 minutos imersas em gelo e 5 minutos em banho-maria à 37ºC) em solução tamponada de cloreto de magnésio. Em seguida, estas células, foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina na concentração de 100 μg/mL, crescendo durante 16 horas em estufa a 37ºC.

Após análise das placas, colônias de cada gene quimérico foram escolhidas aleatoriamente, isoladas e inoculadas em tubos contendo 2 mL de meio LB líquido com ampicilina (100 μg/mL). Os inóculos foram então colocados sob agitação constante em temperatura de 37ºC por aproximadamente 14 horas. Após o crescimento, foram retiradas alíquotas de 1,5 mL dos inóculos, para obtenção de um sedimento através de centrifugação à 12.000 g por 3 minutos. A partir do sedimento foi realizado o protocolo da extração de DNA plasmidial (minipreparação), segundo Sambrook e Russel em 2001, e análise foi feita em gel de agarose a 1%, para escolha das prováveis quimeras.

4.2.4 Utilização da Enzima de Modificação *Antarctic Phosphatase* (NEW ENGLAND Biolabs$_{inc}$)

A enzima de modificação *Antarctic Phosphatase* (*NEW ENGLAND Biolabs*$_{inc}$), que possui a função de desfosforilar a extremidade 5' do DNA e sua utilização foi necessária pois tantos os insertos quantos os fragmentos repetitivos sofreram a ação do par de enzimas *Xho*I e *Xho*I /*Sal*I (respectivamente) que são complementares, evitando assim, que as construções se religassem. Para fins de utilização dessa enzima foi seguido às instruções do fabricante. A escolha desta enzima (*Antarctic Phosphatase*) de modificação em relação a *Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal* (CIP) se deu pelo fato da primeira possuir temperatura de inativação facilitando assim seu uso, pois possibilita um maior controle da reação.

4.2.5 Estratégia de Subclonagens Sucessivas dos Genes Sintéticos (*dof1*, *dof2* e *dof3*) para Formação das Quimeras.

Na primeira subclonagem, foi utilizada a dupla de enzimas *Xho*I / *EcoR*I, para excisar os insertos inteiros (*dof1*, *dof2* e *dof3*) do plasmídio de clonagem pMK que pode ser observado esquematicamente na Figura14. O produto dessas digestões geraram fragmentos que foram subclonados no plasmídio pRSET A.

Esse esquema representativo só está sendo ilustrado para o gene *dof1* mas foram feitos da mesma maneira para os outros dois genes (*dof2* e *dof3*).

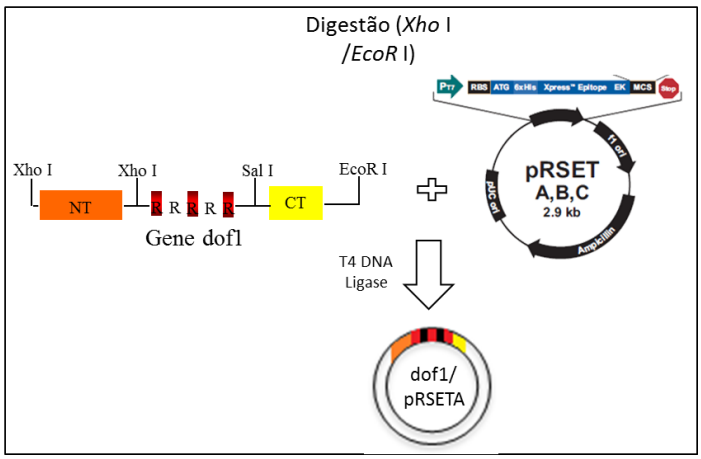

Figura 14: Esquema representativo da primeira etapa das três subclonagens. Os genes sintéticos *dof1*, *dof2* e *dof3*, juntamente com o plasmídio de expressão foram submetidos ao tratamento com a dupla de enzima *Xho*I/ *EcoR*I. No caso dos genes sintéticos, essa estratégia foi usada para retirá-los do plasmídio comercial e subclona-los no vetor pRSET A.

Para a segunda etapa, foi necessário fazer digestões das regiões repetitivas dos genes de interesse com o par de enzimas *Xho*I/*Sal*I gerando novos insertos que foram (Figura 15a) foram também purificados e ligados as construções obtidas na primeira etapa (*dof1*/pRSET A, *dof2*/pRSET A e *dof3*/pRSET A) (Figura 15b). Na segunda e terceira subclonagem foi necessário analisar, através do sequenciamento e por programas de bioinformática (BioEdit), a orientação em que as regiões repetitivas foram subclonadas, já que as mesmas foram obtidas através de digestão com a dupla de enzima *Xho*I/*Sal*I, que são complementares, ou seja, ao cortar o DNA em sequencias específicas elas formas extremidades coesivas e como consequência elas podem serem subclonadas tanto numa orientação quanto na orientação inversa. Com este processo foram obtidos seis construções descritas abaixo:

- O clone *dof1*/pRSET A, formado pela região repetitiva mais a C-terminal, foi ligado só à região repetitiva do gene *dof2* (*2-1*/pRSET A) ou do gene *dof3* (*3-1*/pRSET A);

- O clone *dof2*/pRSET A, formado pela região repetitiva mais a C-terminal, foi ligado só à região repetitiva do gene *dof1* (*1-2*/pRSET A) ou do gene *dof3* (*3-2*/pRSET A);
- O clone *dof3*/pRSET A, formado pela região repetitiva mais a C-terminal, foi ligado só à região repetitiva do gene *dof1* (*1-3*/pRSET A) ou a do gene *dof2* (*2-3*/pRSET A).

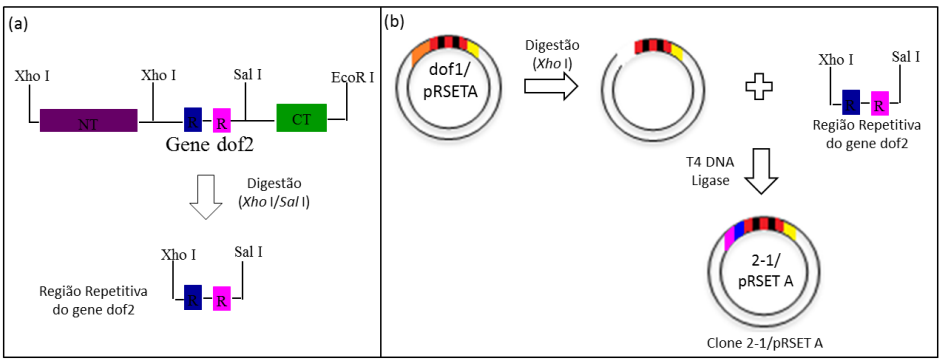

Figura 15: Esquema representativo da segunda etapa de subclonagem. (a) Digestão, dos genes já subclonados no vetor pRSET A, com as enzimas *Xho*I/*Sal*I para obtenção das regiões repetitivas. (b) Digestão, dos genes já subclonados no plasmídio de expressão, com a enzima *Xho*I e consequente ligação das regiões repetitivas aos plasmídios já digeridos. Nesse caso está sendo representado a construção do gene quimérico parcial *2-1*/pRSET A, mas essas estratégias foram utilizadas para obtenção de todas as quimeras parciais.

Para fins didáticos, o termo gene quimérico parcial, se refere ao gene quimérico contendo apenas duas regiões repetitivas, de genes diferentes, em vez das três regiões repetitivas.

Para finalizar a construção dos genes quiméricos, as construções sintetizadas anteriormente sofreram digestões com a enzima *Xho*I. Como essas construções só possuem um único sítio de *Xho*I não houve liberação de fragmentos, houve somente a

linearização das mesmas. Então, novamente os insertos repetitivos purificados foram ligados (Figura 16), formando seis construções completas como descrito abaixo:

- O clone *2-1*/pRSET A, formado pela região repetitiva do gene *dof2* mais a região repetitiva e a C-terminal do gene *dof1*, foi ligado só à região repetitiva do gene *dof3* (*3-2-1*/pRSET A);
- O clone *3-1*/pRSET A, formado pela região repetitiva do gene *dof3* mais a região repetitiva e a C-terminal do gene *dof1*, foi ligado só à região repetitiva do gene *dof2* (*2-3-1*/pRSET A);
- O clone *1-2*/pRSET A, formado pela região repetitiva do gene *dof1* mais a região repetitiva e a C-terminal do gene *dof2*, foi ligado só à região repetitiva do gene *dof3* (*3-1-2*/pRSET A);
- O clone *3-2*/pRSET A, formado pela região repetitiva do gene *dof3* mais a região repetitiva e a C-terminal do gene *dof2*, foi ligado só à região repetitiva do gene *dof1* (*1-3-2*/pRSET A);
- O clone *1-3*/pRSET A, formado pela região repetitiva do gene *dof1* mais a região repetitiva e a C-terminal do gene *dof3*, foi ligado só à região repetitiva do gene *dof2* (*2-1-3*/pRSET A);
- O clone *2-3*/pRSET A, formado pela região repetitiva do gene *dof2* mais a região repetitiva e a C-terminal do gene *dof3*, foi ligado só à região repetitiva do gene *dof1* (*1-2-3*/pRSET A);

Vale salientar que ao final das três etapas de subclonagens sucessivas no vetor pRSET A, obtivemos genes quiméricos formados apenas por regiões repetitivas em

diferentes combinações e regiões C-Terminais, ou seja, nenhuma das quimeras possuem regiões N-Terminais.

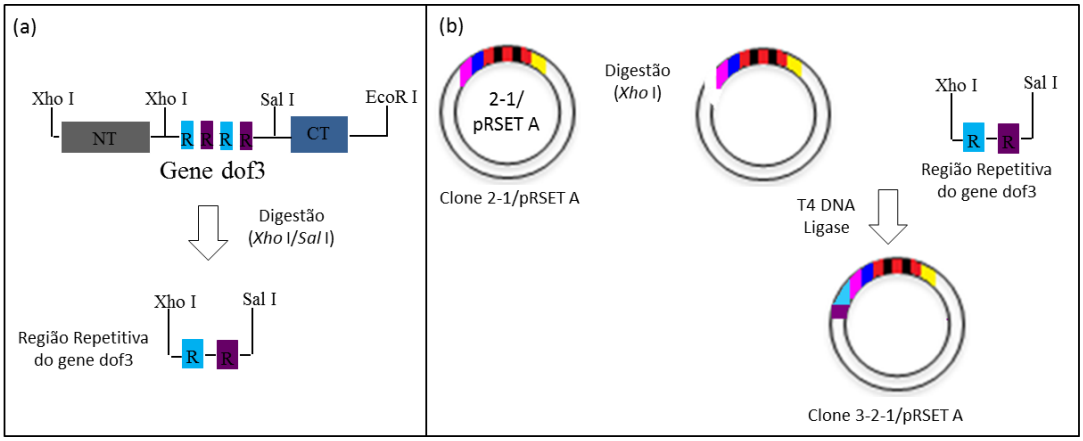

Figura 16: Esquema representativo da terceira e última etapa da construção dos genes quiméricos. (a) digestões parciais para obtenção das regiões repetitivas dos genes de interesse. (b) Digestões dos genes quiméricos parciais, obtidos na etapa anterior, com a enzima *Xho*I e subsequente ligação da última região repetitiva que falta para construir os genes quiméricos completos. Nesse esquema está sendo representado a construção do gene quimérico completo *3-2-1*/pRSET A, mas essa mesma estratégia foi realizada para a construção de todos os genes quiméricos completos.

4.2.6 Confirmação da Subclonagem e da Construção das Quimeras.

A confirmação das subclonagens foi feita através do sequenciamento das minipreparações e por digestões com a dupla de enzima *Xho*I/*EcoR*I. Depois de confirmada a subclonagem, algumas minipreparações foram selecionadas e transformadas novamente em células competentes de *E. coli* da linhagem DH10B para realização de maxipreparação, extração de DNA em larga escala (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

4.3 Expressões das Proteínas Quiméricas.

Uma vez sintetizadas os genes quiméricos, esses foram utilizados para transformar células competentes de *E. coli* BL21star e induzidas na presença de isopropil-Beta-D-galactosídeo (IPTG) . A partir das células transformadas, foram feitos pré-inóculos em 20 ml de LB (Luria Bertani) na presença de ampicilina (100 µg/ml), a 37ºC e 160 rpm. Dessa cultura, l5 ml foram inoculado em 500 ml de meio LB com ampicilina (100 µg/ml), até ser atingida uma densidade óptica (D.O) de 0,5 num comprimento de onda de 600 nm, onde foi acrescentado IPTG para uma concentração final de 0,1 mM. Após 3 horas de agitação a 28°C e 160 rpm, retirou-se uma alíquota, que foi fracionada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%). O resultado foi visualizado através da coloração do gel com Comassie Blue R-250.

4.4 Purificações das Proteínas Quiméricas.

Para a obtenção das proteínas recombinantes, os sedimentos celulares obtidos após a indução com IPTG foram resuspensos em 20 mL de tampão de lise e equilíbrio (100 mM fosfato de sódio, 10 mM Tris, 8 M de Uréia, 20 mM de imidazol – pH 8,0) e solubilizados por ultra-sonicação, em 4 pulsos de 30 segundos com intervalos de 1 minuto, a 4ºC, e pela adição de Triton X-100 (1%). O material em seguida foi centrifugado a 12.000 g por 10 minutos, a 4ºC. O sobrenadante resultante da centrifugação foi incubado por 1 hora com 500 µL de resina Ni-NTA agarose (*Qiagen*) e 2,5 mM de imidazol, a 4ºC, sob leve agitação. O sobrenadante também foi incubado com

a resina sob as mesmas condições. Após a incubação com a resina, o material foi centrifugado a 6.000 g por 2 minutos, o sobrenadante descartado, e a resina lavada três vezes com 1 ml de tampão de equilíbrio (como descrito acima) através de etapas de suspensão e centrifugação. Mais duas lavagens foram realizadas com tampão desnaturante em pH 6,0 (100 mM fosfato de sódio, 10 mM Tris, 8 M de Uréia, 30 mM de imidazol), seguida da eluição das proteínas recombinantes realizada por meio de lavagens sucessivas com o tampão de eluição 100 mM fosfato de sódio, 10 mM Tris, 8 M de Uréia, 1 M de imidazol – pH 4,5). Todos os sobrenadantes desta etapa foram separados e guardados a –80^{o}C. Em seguida foram separados 10 µL de cada eluato e da resina, acrescidos de igual volume de tampão de amostra para SDS-PAGE duas vezes concentrado com 2-mercaptoetanol (50 µl/mL), fracionados em gel SDS-PAGE 15% e visualizados após coloração com Azul de Comassie R-250.

4.5 Quantificações das Proteínas Quiméricas

Para a quantificação, amostras das proteínas purificadas foram quantificadas segundo protocolo de Braddford (Bradford, 1976), utilizando uma curva de SAB. Cada ponto da curva foi preparado em duplicata e a leitura foi feita a 600 nm em espectrofotômetro. A concentração proteica das amostras foi inferida por regressão linear a partir da curva padrão.

4.6 Ensaios de *Western Blot*

Para verificação do reconhecimento antigênico e confirmação das purificações foram realizados ensaios de *western-blot* (Wb) com diversas diluições das proteínas quiméricas purificadas incubadas com soros de coelhos (produzidos em trabalhos anteriores) que possuíam anticorpos policlonais produzidos através da imunização com as proteínas recombinantes individuais. As proteínas quiméricas diluídas foram fracionadas em gel SDS-PAGE 15% e transferidos para membranas de PVDF (*Immobilon-P Millipore*®), as quais sofreram bloqueio em solução de leite a 5% em TBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH7,5) suplementadas com Tween-20 a 1% por 1 hora. Posteriormente, foram incubadas com os anticorpos em diluições finais de 1:3000 e 1:1000 para as proteínas dof2 e dof3, em solução de leite a 5% em TBS / Tween-20 a 1% por 1h. As membranas foram lavadas três vezes com TBS/ Tween-20 a 1% por 10 minutos cada. Realizou-se nova incubação, durante 1 hora, com o segundo anticorpo (anti IgG de coelho, Jackson Immunoresearch Laboratories), marcado com peroxidase, numa diluição fixa de 1:10000 em solução de leite a 5% suplementado com TBS / Tween-20 a 1%. Em seguida, foram novamente lavadas três vezes com TBS / Tween-20 a 1% por 10 minutos. Após essas lavagens, as membranas foram banhadas numa solução de luminol 1,2 mM, iodofenol 0,4 mM e peróxido de hidrogênio 0,03% por 1 minuto, para realização da reação de quimioluminescência, em seguida secas e, posteriormente, expostas a um filme de auto-radiografia durante 1 e 10 minutos. O filme foi revelado com uma solução de Dektol (1:2) por 1 minuto e lavado em solução de ácido acético diluído e fixado por 3 minutos.

4.7 Ensaio Imunoenzimático (ELISA Indireto)

4.7.1 Soros Utilizados no ELISA Indireto

Para avaliação do potencial das proteínas recombinantes para uso em diagnóstico da leishmaniose visceral (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 leishmaniose visceral (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 leishmaniose visceral com diagnóstico clinico e laboratorial (confirmado por exame parasitológico), gentilmente cedidos pelo Dr. Carlos Henrique Costa, da Universidade Federal do Piauí.

4.7.2 ELISA Indireto Utilizando Antígenos Recombinantes

Após quantificação as proteínas recombinantes foram utilizadas para sensibilização de placas (“Cliniplate”), diluídas em tampão carbonato-bicarbonato (0,05 M; pH 9,6), para uma concentração de 400 ng (1 µg para o extrato total do parasito *Leishmania chagasi*, utilizado como controle da reação) por 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 por poço acrescido de 10% de leite desnatado e incubado em câmara úmida por 1 hora em temperatura ambiente. Após o bloqueio a placa foi lavada três vezes com 200 µl de PBS Tween-20 a 0,05% por poço. Os soros humanos a serem testados foram diluídos em PBS Tween-20 a 0,05% acrescido de leite desnatado 10%, para uma diluição final de 1:2000 (para as proteínas quiméricas 3-2-1/pRSET A e 1-3-2/pRSET A) e para 1:6000 (para a proteína quimérica 3-1-2/pRSET A) a em cada poço, e incubados por 1hora a temperatura ambiente em câmara úmida. Seguiram-se novamente etapas de lavagem descritas anteriormente. Realizou-se nova incubação com o conjugado (anti-IgG Humano 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 150 µl de substrato peróxido de hidrogênio, o cromógeno OPD (Orthophenilenediamino) mais tampão citrato-fosfato (0,1 M, pH:5,0), numa concentração de 0,01% por 25 minutos, em câmara escura, sendo então interrompida a reação com 100 µl de ácido sulfúrico 2,5 M por poço. A leitura foi realizada em filtro de 490 nm através do aparelho Bio-Rad (Benchmark plus) Microplate Mananger 5.2.

4.7.3 Análises Estatísticas dos Resultados de ELISA Indireto

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).

5. Resultados

5.1. Subclonagem dos Genes Sintéticos (*dof1*, *dof2* e *dof3*) em Vetores de Expressão.

De posse dos genes *dof1*, *dof2* e *dof3* sintetizados comercialmente e do plasmídio de expressão pRSET A foi realizado a extração do DNA plasmidial em larga escala, com o objetivo de obter uma grande quantidade de material genético plasmidial dos clones.

Seguindo a estratégia traçada para a primeira subclonagem como descrito na metodologia e representado na Figura 14, os genes sintéticos *dof1*, *dof2* e *dof3* foram subclonados no vetor de expressão pRSET A e suas confirmações foram realizado através de digestões, onde o perfil de digestão pode ser observado de forma representativa na Figura17, e por análise de sequenciamento.

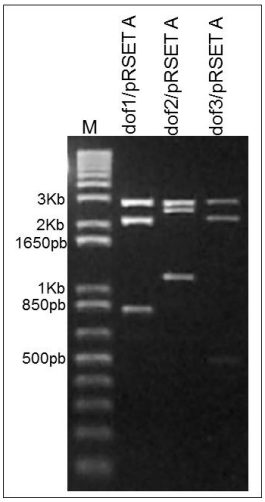

Figura 17: Confirmação da primeira subclonagem. Gel de agarose 1% mostrando o fracionamento e consequentemente a liberação dos insertos preditos após digestão com a dupla de enzima *Xho*I/*Eco*RI. Marcador utilizado foi o Ladder 1 Kb plus.

5.1.1. Segunda Subclonagem e Consequente Construção dos Genes Quiméricos Parciais

As construções *dof1*/pRSET A, *dof2*/pRSET A e *dof3*/pRSET A, devidamente confirmadas por digestão e por sequenciamento, foram digeridas com a enzima *Xho*I (Figura 18a). Essas digestões liberaram insertos correspondentes a região N-terminal de cada gene, as quais foram desprezadas. O restante das construções (região repetitiva + a região C-terminal + o plasmído pRSET A), nos tamanhos preditos de 3825, 4117 e 5157 pb para os genes *dof1*, *dof2* e *dof3* respectivamente (setas), foram purificados (Figura 18b).

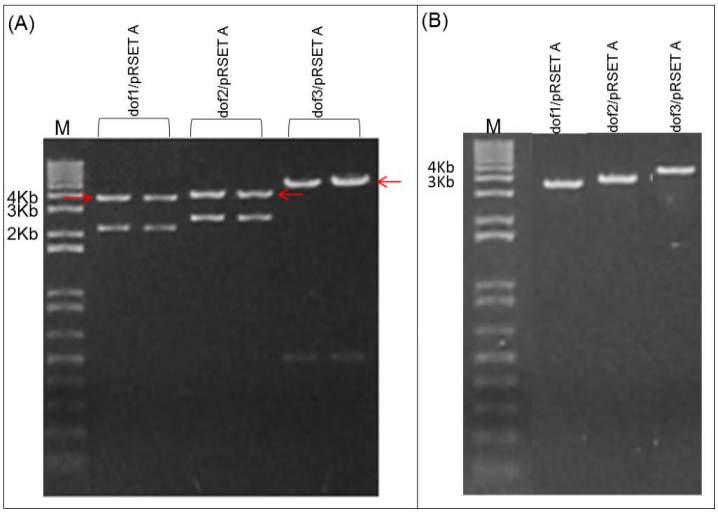

Figura 18: Digestão com a enzima *Xho*I dos genes subclonados no pRSET A e purificação dos fragmentos correspondentes ao vetor plasmidial contendo a região repetitiva mais a C-terminal dos genes de interesse. (A) Fracionamento em gel de agarose 1% mostrando (setas) os fragmentos desejados de 3825, 4117 e 5157 pb (dos genes *dof1*, *dof2* e *dof3* respectivamente). (B) Gel de agarose 1% evidenciando a purificação dos insertos nos tamanhos preditos de 3825, 4117 e 5157 pb (dos genes *dof1*, *dof2* e *dof3* respectivamente).

Também foram necessárias digestões para obtenção das regiões repetitivas dos genes *dof1*, *dof2* e *dof3*. Como consequência dessas digestões, houve a liberação de três fragmentos com tamanhos de 591 (gene *dof1*), 426 (gene *dof2*) e 102 pb (gene *dof3*), com pode ser observado de forma representativa na Figura 19.

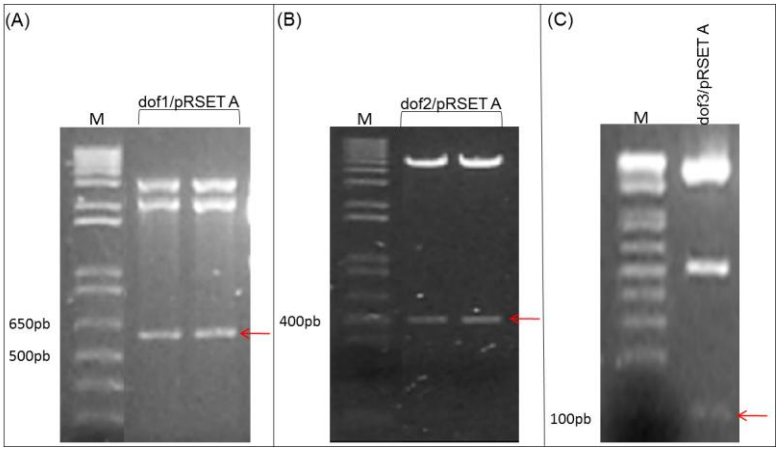

Figura 19: Digestão com a dupla de enzima *Xho*I/*Sal*I para obtenção das regiões repetitivas de interesse. As figuras A, B e C mostram a liberação dos fragmentos referentes às regiões repetitivas (setas) das construções *dof1*/pRSET A (591 pb), *dof2*/pRSET A (426 pb) e *dof3*/pRSET A (102 pb) respectivamente. Marcador usado foi o Ladder 1 Kb plus.

Esses fragmentos de 591, 426 e 102 pb (das contruções *dof1*/pRSET A, *dof2*/pRSET A e *dof3*/pRSET A respectivamente) foram excisados do gel de agarose e purificados.

De posse dos genes *dof1*/pRSET A, *dof2*/pRSET A e *dof3*/pRSET A, sem a região N-terminal, e das regiões repetitivas de cada gene em questão purificadas e quantificadas, iniciou-se a segunda etapa das subclonagens, como mencionado na metodologia e exemplificado na Figura 15. Consequentemente foram obtidos três construções (*2-1*/pRSET A, *1-2*/pRSET A, *3-2*/pRSET A) de um total de seis possíveis. Essas construções foram confirmadas por digestão, onde houve a liberação dos genes

quiméricos parciais nos tamanhos esperados de 1017, 528 e 1017 pb como observado de forma representativa na Figura 20 e por sequenciamento.

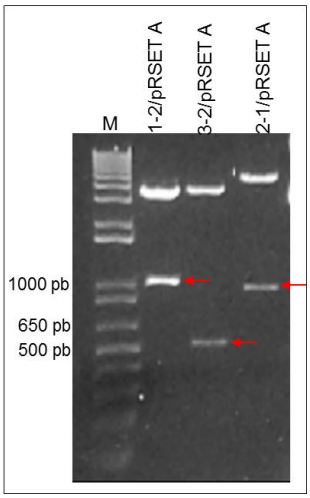

Figura 19: Confirmação da segunda subclonagem. Géis de agarose 1% mostrando, através da digestão com a dupla de enzima *Xho*I/*Sal*I, a liberação dos insertos esperados. Confirmando assim as subclonagens das regiões repetitivas e consequentemente construção dos três genes quiméricos parciais. Marcador utilizado foi o Ladder 1 Kb plus.

5.1.2. Construção dos Genes Quiméricos Completos

Com as construções parciais, obtidas na etapa anterior, e com os insertos repetitivos purificados e quantificados, eles foram ligados em diferentes combinações como mencionado na metodologia e mostrado esquematicamente na Figura 16. Como consequência foram construídos três genes quiméricos completos (*3-2-1*/pRSET A, *3-1-2*/pRSET A e *1-3-2*/pRSET A) de um total de seis possíveis. Essas três construções completas foram confirmados por digestões, onde houve a liberação dos genes quiméricos completos nos tamanhos esperados de 1353 pb (*3-2-1*/pRSET A) e 1830 pb, (*3-1-2*/pRSET A e *1-3-2*/pRSET A), como pode ser visualizados de forma representativa na Figura 21.

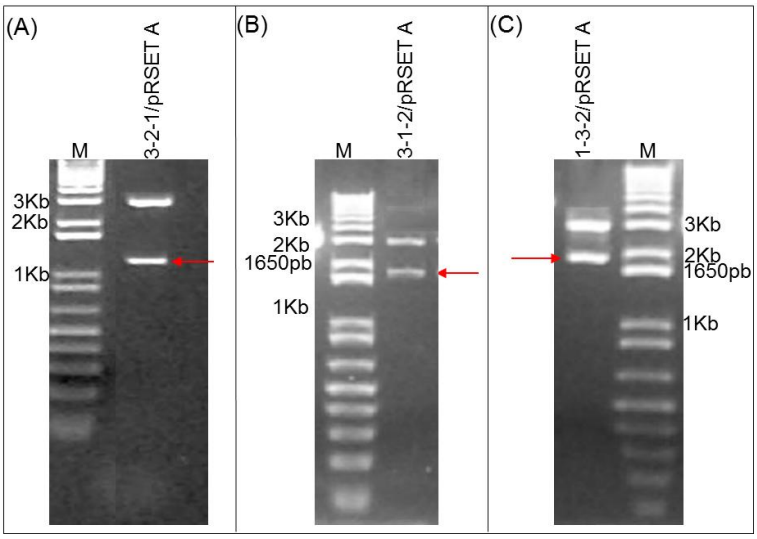

Figura 20: Confirmação da terceira e última subclonagem. (a, b e c) Géis de agarose 1% mostrando, através da digestão com a dupla de enzima *Xho*I/*Eco*RI, a liberação dos genes quiméricos completos nos tamanhos esperados de 1353 pb (*3-2-1*/pRSET A), 1850 pb (*3-1-2*/pRSET A e *1-3-2*/pRSET A). Confirmando assim as subclonagens das regiões repetitivas e consequentemente construção dos três genes quiméricos. Marcador utilizado foi o Ladder 1 Kb plus.

5.2 Mapa de Antigenicidade das Proteínas Quiméricas

Foram realizadas analises *in silico* das sequencias das quimeras com o objetivo de verificar se as mesmas manteriam uma grande proporção de regiões antigênicas, hidrofílicas e de prováveis epítopos de MHC I e II como representado na Figura 22. Através desses gráficos podemos confirmar que de fato as três proteínas quiméricas são compostas por regiões bastante antigênicas e hidrofílicas.

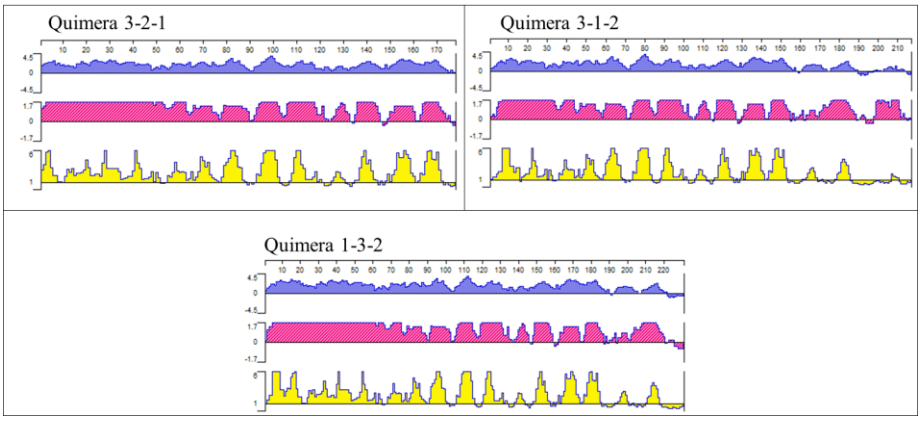

Figura 21: Mapa de antigenicidade das três proteínas quiméricas construídas. Nos gráficos são observados os picos referentes as regiões hidrofílicas (azul), as regiões antigênicas (rosa) e a regiões de superfícies (amarelo). A escala está representando o tamanho da sequencias em aminoácidos

5.3. Expressão e Purificação das Proteínas Quiméricas Completas

As proteínas quiméricas completas foram transformadas em células BL21, induzidas e purificadas por cromatografia de afinidade apresentando os seguintes pesos moleculares: 3-2-1 (cerca de 66 kDa), 3-1-2 (aproximadamente 97 kDa) e 1-3-2 (acima 100 kDa) (Figura 23). Como pode ser observado na mesma figura, todas as três proteínas quiméricas apresentaram certo grau de degradação, mesmo após a utilização de inibidores de proteases.

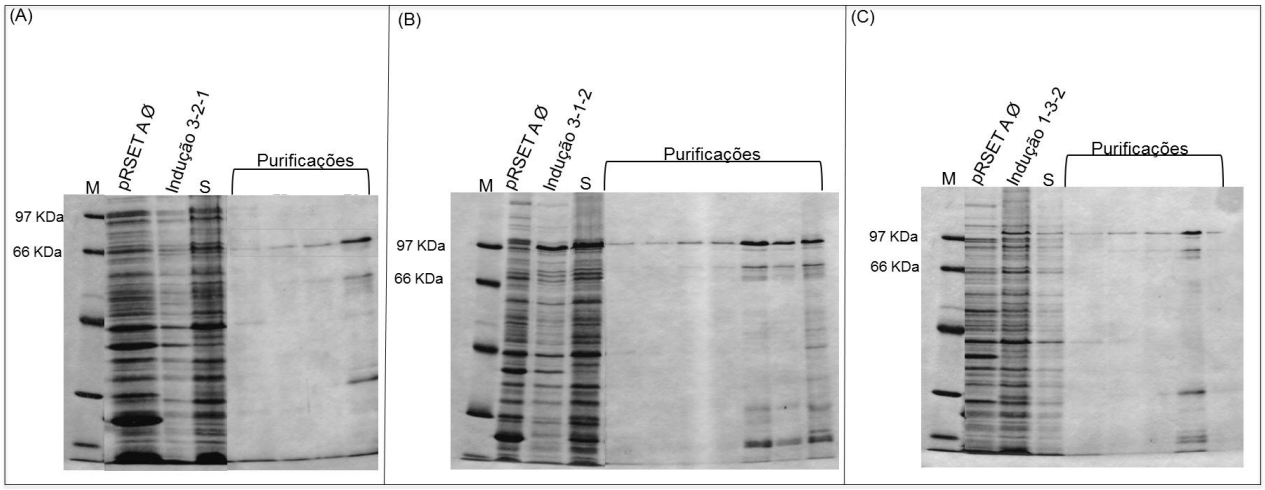

Figura 23: Indução e purificação das proteínas quiméricas completas. Fracionamento em gel de poliacrilamida (SDS-Page 15%, coradas com azul de Coomassei) das quimeras 3-2-1, 3-1-2 e 1-3-2, apresentando pesos moleculares de aproximadamente 66, 97 e 100 kDa respectivamente. Como controle negativo usado o pRSET a Ø (vazio), ou seja, o plasmídio fechado. Como os tampões possuem ureia 8 M, não formam sedimentos e a fração sobrenadante (S) indica a fração de proteínas que não se ligou a resina. Marcador Utilizado foi o LMW.

5.4. Reconhecimento das Proteínas Quiméricas por Anticorpos Policlonais Através de Ensaios de *Western Blot*.

Como pode ser observado, as proteínas quiméricas foram reconhecidas pelos soros policlonais produzidos, em trabalhos anteriores contra as proteínas recombinates individuais (dof2 e dof3) (Figura 25), nas concentrações de 50, 25, 12,5 e 6,125 ng. Também nota-se que as proteínas quiméricas 3-2-1 e 3-1-2 são fracamente reconhecidas pelo anticorpo anti-dof3. Nessa etapa não foi possível testar as proteínas quiméricas construídas frente ao anticorpo anti-dof1, pois não dispúnhamos do mesmo no laboratório.

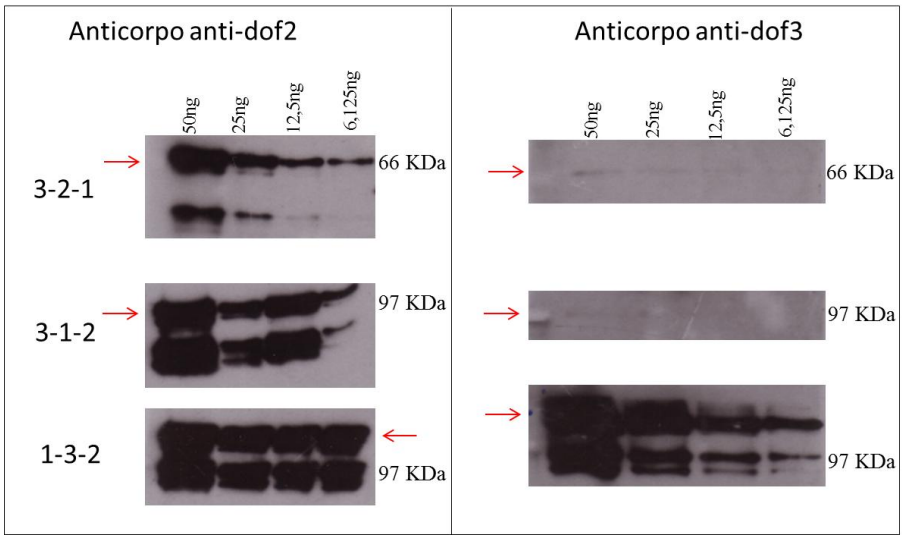

Figura 22: *Western blot* das três proteínas quiméricas. As três proteínas foram reconhecidas nas concentrações de 50, 25, 12,5 e 6,125 ng e as diluições dos anticorpos foram de 1:3000. Todas estão nos tamanhos esperados de 66, 97 e 100 kDa para as proteínas 3-2-1, 3-1-2 e 1-3-2 respectivamente.

5.5. ELISA Indireto das Proteínas Quiméricas

Para avaliação do desempenho de cada proteína quimérica em relação ao diagnóstico sorológico da LVH, foram padronizados ELISAs indiretos para cada uma das proteínas recombinantes que foram expressas e purificadas com sucesso (3-2-1, 3-1-2 e 1-3-2) os resultados das densidades ópticas estão representadas na Figura 25.

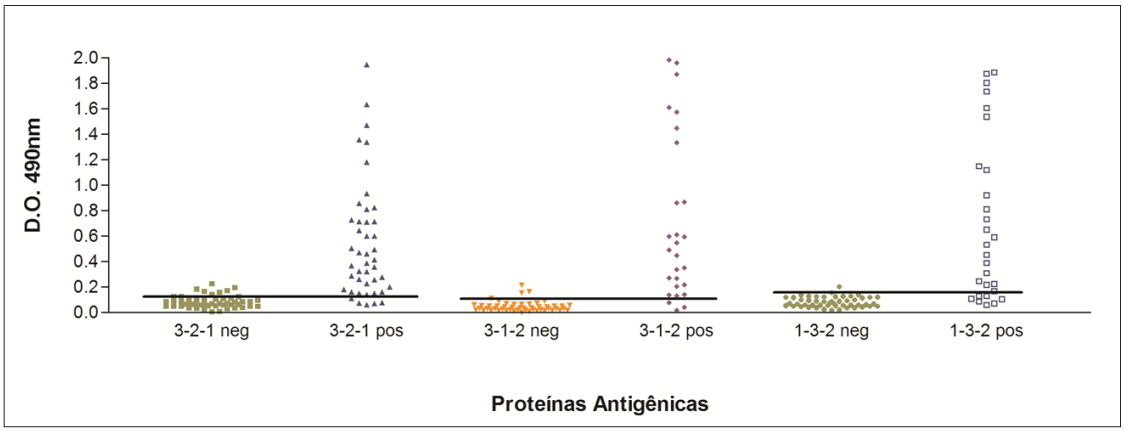

Figura 23: Gráfico do ELISA indireto para as proteínas quiméricas construídas. As proteínas 3-2-1, 3-1-2 e 1-3-2 apresentaram os valores de 90%, 94% e 86%, para sensibilidade, respectivamente. As leituras foram realizadas na densidade óptica de 490nm (D.O). Cada símbolo corresponde à média, em densidade óptica (DO), dos resultados obtidos com triplicatas de cada soro individual subtraída do valor do branco. As barras horizontais pretas representam o *cut off* que corresponde à média mais dois desvios padrões dos resultados obtidos com os soros do grupo controle negativo (indivíduos sadios).

Os resultados dos ELISAs com cada proteína frente a um painel de soros provenientes de pacientes com LV (com parasitológico confirmado, n= 50), e indivíduos sadios de área não endêmica (n=50), estão apresentados na Tabela 3 com intrevalo de confiança de 95%.

Tabela 3: Avaliação do desempenho de ELISAs. Proteínas quiméricas frente a soros de 43 pacientes com LV e de 50 indivíduos sadios de área não endêmica

Antígeno utilizado no ELISA	Sensibilidade (Intervalo de confiança)	Especificidade (Intervalo de confiança)
3-2-1	90%* (78,2 - 96,7%)	88% (75,7 – 95,5%)
3-1-2	94%* (83,5 - 98,7%)	94% (83,45 – 98,75%)
1-3-2	86%* (73,3 - 94,2%)	98% (89,35 – 99.95%)

* Porcentagem de soro produzindo resultados acima da linha de corte (média dos valores da densidade óptica dos indivíduos saudáveis mais dois desvios padrões).

Os valores preditivos negativos (VPN) e positivos (VPP), são parâmetros que dependem não só da sensibilidade e da especificidade do teste, mas também da prevalência da doença. Quanto maior a prevalência da doença, maior será o VPP do teste e quanto menor for a prevalência, maior será o VPN do teste. Com isso podemos

relacionar alguns parâmetros como: Quanto maior a sensibilidade, maior será o valor preditivo negativo, isto é, maior será a probabilidade de, perante um resultado negativo, não haver doença; Quanto maior a especificidade, maior será o valor preditivo positivo, isto é, maior será a probabilidade de, perante um resultado positivo, haver doença; Quanto maior a prevalência da doença, maior será o valor preditivo positivo e menor será o valor preditivo negativo, isto é, quanto mais frequente é uma doença mais provável é encontrar verdadeiros positivos (aumentando o valor preditivo positivo), mas também é mais provável encontrar falsos negativos (diminuindo o valor preditivo negativo). Como pode ser observado de forma representativa na Tabela 4 foram calculados os valores preditivos negativos e positivos com o intervalo de confiança de 95%. Estes valores foram mais elevados para a proteína 3-1-2.

Tabela 4: Valores preditivos negativos e positivos.

Antígeno utilizado no ELISA	Valor preditivo negativo (Intervalo de confiança)	Valor preditivo positivo (Intervalo de confiança)
3-2-1	89,80% (77,77 - 96,60 %)	88,24% (76,13 – 95,56%)
3-1-2	94,00% (83,45 - 98,75%)	94,00% (83,45 – 98,75%)
1-3-2	87,50% (75,93 - 94,82%)	97,73% (87,98 – 99,94%)

Estatisticamente as quimeras 3-2-1, 3-1-2 e 1-3-2 mostraram-se úteis para avaliação de indivíduos sabidamente doentes com valores de $p < 0,0001$ (segundo teste de qui-quadrado), quando comparamos o reconhecimento dos grupos de indivíduos doentes e saudáveis.

6. Discussão

Um diagnóstico precoce, conclusivo, simples, econômico, para a leishmaniose visceral permanece um desafio. Além disso, o diagnóstico é uma importante ferramenta para o combate e controle dessa doença. Por essas razões vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos para identificar novos antígenos que possam ser utilizados tanto no aperfeiçoamento das técnicas de diagnóstico, como também no desenvolvimento de vacina ou na imunoterapia contra LV (Desjeux, 2004; Srivastava *et al*., 2011). Como alternativa para esse painel, o desenvolvimento de antígenos que reúnam vários determinantes antigênicos numa única molécula (quimera), facilitando assim a sua padronização, pode resultar em uma excelente saída, já que existem relatos mostrando que uma molécula contendo vários determinantes antigênicos permite uma melhor distribuição do antígeno na placa de ELISA (Houghton *et al*., 2000; da Silveira *et al*., 2001; Aguirre *et al*., 2006; Camussone *et al*., 2009). Além disso, a produção de uma única molécula, composta por diferentes epítopos antigênicos, torna o custo final da produção de um *kit* menos dispendioso e oneroso em comparação a *kits* produzidos apartir de duas ou mais proteínas recombinantes individuais.

Baseado nos trabalhos relatados, esse estudo se propôs a construir proteínas quiméricas formadas por regiões repetitivas derivadas de genes sintéticos pré-selecionados (*dof1*, *dof2* e *dof3*) e analisar os seus potenciais antigênicos visando o aprimoramento de testes sorológicos para diagnosticar a LVH e/ou LVC em nosso país. Nesse presente estudo conseguimos construir, expressar, purificar e avaliar três proteínas quiméricas (3-2-1, 3-1-2 e1-3-2) que diferem apenas na ordem de posicionamento das regiões repetivas, dos antígenos selecionados, ao longo da

sequencia e na presença da regiao C-terminal das proteinas. Na etapa de purificação das proteínas quiméricas foi observado que todas as proteínas apresentaram certo grau de degradação mesmo após a utilização de inibidor de protease como também de várias modificações no protocolo (diminuição da temperatura, aumento da densidade óptica, diminuição do tempo de indução, adição de uréia aos tampões, entre outras). Acreditamos que essa degradação ocorra devido aos motivos repetitivos que compõe essas proteínas quiméricas. Outra explicação possível seria o esgotamento de RNA transportador (tRNA) das bactérias visto que ocorre uma repetitividade das sequencias que compõe as proteínas. Ou ainda pelo fato dos genes utilizados, para compor as quimeras, terem sido otimizados para expressão em eucariotos e não em procariotos (Kane, 1995; Jana e Deb, 2005; Sørensen e Mortensen, 2005; Rosano e Ceccarelli, 2009).

Apesar dos problemas metodológicos encontrados, foi possível analisar a antigenicidade das proteínas recombinantes, pois a positividade dos testes foi estabelecida a partir da média das leituras dos soros controles (humanos saudáveis) mais dois desvios padrões (95% de certeza). É possível que alguns epítopos antigênicos tenham sido destruídos pelo processo de degradação e pela confecção das quimeras, uma vez que na etapa de reconhecimento das proteínas quiméricas através do ensaio de *western blot*, onde foram usados dois anticorpos policlonais diferentes, foi observado que as proteínas quiméricas 3-2-1 e 3-1-2 foram fracamente reconhecidas pelo anticorpo anti-dof3. Acreditamos que esse fato ocorreu pela conformação final que essas proteínas quiméricas adquiriram, pois os epítopos repetitivos referente à proteína dof3 poderiam está ocultos quando posicionados na extremidade N-terminal da proteína, como é o caso, dificultando assim o reconhecimento pelo anticorpo específico (Melo *et*

al., 2007; Ha e Loh, 2012). Outra justificativa seria pela estratégia adotada, pois utilizamos na etapa de purificação soluções com 8M de uréia, que desnatura a proteína, interrompendo as interações moleculares que proporcionam a estrutura tridimensional, com isso as proteínas podem estar alterada a tal ponto, que não consegue retornar à conformação original, podendo perder determinantes antigênicos fundamentais para a atividade desejada (Sambrook e Russell, 2001).

Após a realização dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA), observamos que todas as proteínas quiméricas apresentaram uma alta sensibilidade (variando de 86 a 94%). Além disso, o objetivo de construir proteínas altamente antigênicas foi alcançado, pois utilizamos essas proteínas frentes a soros bastante diluídos, como descrito na metodologia e mesmo assim houve um ótimo reconhecimento. Esses resultados indicam que a construção de proteínas quiméricas compostas somente por epítopos repetitivos é uma alternativa bastante interessante para o aperfeiçoamento de diagnósticos sorológicos da LVH. Relatos na literatura mostram que proteínas contendo grandes repetições em tandem, são capazes de promover, sozinhas, resposta imune desencadeada por células B, ou seja, são capazes de produzir anticorpos específicos (Kemp *et al*., 1987; Reeder e Brown, 1996; Goto *et al*., 2007). Além disso, existem evidências a respeito do forte estímulo de linfócitos B promovido por antígenos formados por vários domínios repetitivos e isso provavelmente ocorre por uma via alternativa, T independente, devido à ligação de vários antígenos repetitivos de forma inespecífica e variada aos receptores de célula B. Por essas razões, anticorpos contra proteínas compostas por domínios repetitivos são tão utilizados em triagens sorológicas (Kotera *et al*., 1994; Vos *et al*., 2000; Hinton *et al*., 2008).

Algumas hipóteses foram criadas para explicar o fato de que moléculas quiméricas são mais eficientes do que os mesmos antígenos analisados dentro de misturas de vários antígenos. Uma delas diz que peptídeos em misturas podem diminuir sua antigenicidade individual, uma vez adsorvido na fase sólida, por causa do bloqueio das cadeias essenciais (Camussone *et al*., 2009). Outra explicação seria que, os peptídeos antigênicos presente numa mistura adsorvidos numa microplaca, podem competir pelos mesmos sítios de ligação e diminuir assim a sensibilidade (Kenny e Dunsmoor, 1983; Camussone *et al*., 2009). Por outro lado, quando microplacas são sensibilizadas com uma construção quimérica, a proteína pode adsorver através de determinados sítios deixando o resto da molécula livre para reagir sem impedimento estérico. Mas, mesmo que possa ocorrer o bloqueio de alguns epítopos, outros ainda podem ser expostos apropriadamente para interagir com seus anticorpos específicos (Camussone *et al*., 2009). Em outras palavras, proteínas compostas por repetições em tandem possuem uma maior proporção de epítopos antigênicos e consequentemente conseguem se ligar a diferentes sítios de ligação, aumentando assim sua sensibilidade.

É importante destacar que os resultados, de sensibilidade e especificidade, obtidos nesse trabalho são comparáveis com os de outros estudos com antígenos recombinantes previamente avaliados para diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina e humana (Badaró *et al*., 1996; Mettler *et al*., 2005; Takagi *et al*., 2007; Oliveira *et al*., 2011). Mas, ainda há muito que fazer, pois não foram realizados testes contra soros de pacientes com outras doenças (LTA, Chagas entre outras) e ainda precisamos refazer novas otimizações como por exemplo: as dos códons preferencias para bactérias. Além disso, precisaremos realizar ensaios imunoenzimático das proteínas sintéticas individuais para termos uma comparação mais robusta. Pois,

compararíamos as proteínas recombinantes, com as sintéticas e com as quimeras produzidas nesse trabalho.

7. Conclusões

- As três construções quiméricas obtitidas a partir de combinações de diferentes regiões repetitivas, demostraram uma alta antigenicidade;

- As sensibilidades (de 90, 94 e 86%) e as especificidades (de 88, 94, 98%) bastante elevadas das proteínas quiméricas 3-2-1, 3-1-2 e 1-3-2 respectivamente, torna possível seu uso em *kits* de diagnósticos para LV.

- Das três proteínas quiméricas construídas a mais eficiente é a quimera 3-1-2 segundo o teste estatístico aplicado.

8. Bibliografia

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., e Pillai, S. (2008). IMUNOLOGIA CELULAR E MOLECULAR 6th ed. (ELSEVIER Ltd).

Aguirre, S., Silber, A. M., Brito, M. E. F., Ribone, M. E., Lagier, C. M., e Marcipar, I. S. (2006). Design, construction, and evaluation of a specific chimeric antigen to diagnose chagasic infection. Journal of Clinical Microbiology *44*, 3768–3774.

Almeida, O. L. S., e Santos, J. B. (2011). Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos : uma revisão sistemática ten years : a systematic literature review. Anais brasileiros de dermatologia *86*, 497–506.

Altamirano-enciso, A. J. (2003). On the origin and spread of cutaneous and mucosal leishmaniasis, based on pre- and post-Colombian historical sources. História, Ciências, Saúde- Manguinho *10*, 853–882.

Alves, W. A., e Bevilacqua, P. D. (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.

Assis, T. S. M. de, Braga, A. S. da C., Pedras, M. J., Barral, A. M. P., Siqueira, I. C. de, Costa, C. H. N., Costa, D. L., Holanda, T. A., Soares, V. Y. R., e Biá, M., et al. (2008). Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. Epidemiologia e Serviços de Saúde *17*, 107–116.

Azevedo, C., Vilela, M. L., Souza, N. a, Andrade-Coelho, C. a, Barbosa, F., Firmo, L., e Rangel, E. F. (1996). The sand fly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of a focus of cutaneous leishmaniasis in Ilhéus, State of Bahia, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz *91*, 75–79.

Badaró, R., Benson, D., Eulálio, M. C., Freire, M., Cunha, S., Netto, E. M., Pedral-Sampaio, D., Madureira, C., Burns, J. M., e Houghton, R. L., et al. (1996). rK39: a cloned antigen of Leishmania chagasi that predicts active visceral leishmaniasis. The Journal of Infectious Diseases *173*, 758–761.

Baneth, G., e Aroch, I. (2008). Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. Veterinary Journal (London, England : 1997) *175*, 14–15.

Bari, A. (2012). linical spectrum of cutaneous leishmaniasis: an overview from Pakistan. Dermatology online Journal *18*, 4.

Basano, S. D. A., e Camargo, L. M. A. (2004). Leishmaniose tegumentar americana : histórico , epidemiologia e perspectivas de controle American cutaneous leishmaniasis : *7*, 328–337.

Bañuls, A.-L., Hide, M., e Prugnolle, F. (2007). Leishmania and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. Advances in Parasitology *64*, 1–109.

Besteiro, S., Williams, R. a M., Coombs, G. H., e Mottram, J. C. (2007). Protein turnover and differentiation in Leishmania. International Journal for Parasitology *37*, 1063–1075.

Bhattacharya, S. K., Sur, D., e Karbwang, J. (2006a). Childhood visceral leishmaniasis. The Indian Journal of Medical Research *123*, 353–356.

Bhattacharya, S. K., Sur, D., Sinha, P. K., e Karbwang, J. (2006b). Elimination of leishmaniasis (kala-azar) from the Indian subcontinent is technically feasible & operationally achievable. The Indian Journal of Medical Research *123*, 195–196.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal.Biochem**.** v.72. p.248-54.

Brandão-Filho, S. P., de Carvalho, F. G., de Brito, M. E., Almeida, F. D., e Nascimento, L. a (1994). American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, Brazil: eco-epidemiological aspects in “Zona da Mata” region. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz *89*, 445–449.

Brasil. (2006). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em saúde. Departament 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, J. M., Shreffler, W. G., Benson, D. R., Ghalib, H. W., Badaro, R., e Reed, S. G. (1993). Molecular characterization of a kinesin-related antigen of Leishmania chagasi that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *90*, 775–779.

Camargo, L. M. A., e Barcinski, M. A. (2003). Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. Ciência e Cultura *55*, 34–37.

Campino, L., e Maia, C. (2010). [Epidemiology of leishmaniases in Portugal]. Acta Pédica Portuguesa *23*, 859–864.

Camussone, C., Gonzalez, V., Belluzo, M. S., Pujato, N., Ribone, M. E., Lagier, C. M., e Marcipar, I. S. (2009). Comparison of recombinant Trypanosoma cruzi peptide mixtures versus multiepitope chimeric proteins as sensitizing antigens for immunodiagnosis. Clinical and Vaccine Immunology : CVI *16*, 899–905.

Carolina, A., Albuquerque, L. D., Pereira, J. V., Sarmento, V. D. A., e Silva, D. F. (2010). Estudo da prevalência de Leishmaniose Tegumentar Americana com repercussão na cavidade bucal no município de Alagoa Grande (PB). Revista de Ciências Médicas e Biológicas *9*, 108–112.

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, S. F. G., Lemos, E. M., Corey, R., e Dietze, R. (2003). Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene *68*, 321–324.

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, R. W., Alvar, J., e Boelaert, M. (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? Nature reviews. Microbiology *5*, 873–882.

Chow, C., Cloutier, S., Dumas, C., Chou, M.-N., e Papadopoulou, B. (2011). Promastigote to amastigote differentiation of Leishmania is markedly delayed in the absence of PERK eIF2alpha kinase-dependent eIF2alpha phosphorylation. Cellular Microbiology *13*, 1059–1077.

Claborn, D. M. (2010). The biology and control of leishmaniasis vectors. Journal of Global Infectious Diseases *2*, 127–134.

Clem, A. (2010). A current perspective on leishmaniasis. Journal of Global Infectious Diseases *2*, 124–126.

Costa, J. (2005). Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil Epidemiology of the Leishmaniasis in Brazil. Gazeta Médica da Bahia *1*, 3–17.

da Costa, R. T., França, J. C., Mayrink, W., Nascimento, E., Genaro, O., e Campos-Neto, A. (2003). Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens K39 and K26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene *97*, 678–682.

Croft, S. L., e Olliaro, P. (2011). Leishmaniasis chemotherapy--challenges and opportunities. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases *17*, 1478–1483.

Daneshbod, Y., Oryan, A., Davarmanesh, M., e Shirian, S. (2011). Mucosal Leishmaniasis and Literature Review. Archives of Pathology *135*, 478–482.

Dantas-torres, F., e Brandão-Filho, S. P. (2006). Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco Geographical expansion of visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical *39*, 352–356.

Delgado, O., Feliciangeli, M. D., Coraspe, V., Silva, S., Perez, A., e Arias, J. (2001). Value of a dipstick based on recombinant RK39 antigen for differential diagnosis of American visceral leishmaniasis from other sympatric endemic diseases in Venezuela. Parasite (Paris, France) *8*, 355–357.

Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases *27*, 305–318.

Dourado, Z. F., Silva, H. D., e Silveira-, E. D. P. (2007). Panorama Histórico do Diagnóstico Laboratorial da Leishmaniose Visceral até o Surgimento dos Testes Imunocromatográficos (rK39). Revista de Patologia Tropical *36*, 205–214.

El-On, J. (2009). Current status and perspectives of the immunotherapy of leishmaniasis. The Israel Medical Association journal *11*, 623–628.

Evans, K. J., e Kedzierski, L. (2012). Development of Vaccines against Visceral Leishmaniasis. Journal of Tropical Medicine *2012*, 892817.

Gomes, Y. M., Paiva Cavalcanti, M., Lira, R. A., Abath, F. G. C., e Alves, L. C. (2008). Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. Veterinary Journal (London, England : 1997) *175*, 45–52.

Gontijo, C., e Melo, M. (2004). Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas Visceral Leishmaniasis in Brazil. Revista Brasileira de Epidemiologia *7*, 338–349.

Goto, H., e Lindoso, J. A. L. (2010). Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Expert review of Anti-Infective Therapy *8*, 419–433.

Goto, H., e Prianti, M. D. G. (2009). Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo *51*, 241–246.

Goto, Y., Coler, R. N., e Reed, S. G. (2007). Bioinformatic identification of tandem repeat antigens of the Leishmania donovani complex. Infection and Immunity *75*, 846–851.

Góes, M. A. de O., Melo, C. M. de, e Jeraldo, V. de L. S. (2012). Time series of visceral leishmaniasis in Aracaju, state of Sergipe, Brazil (1999 to 2008): human and canine aspects. Revista brasileira de epidemiologia = Brazilian Journal of Epidemiology *15*, 298–307.

Ha, J.-H., e Loh, S. N. (2012). Protein conformational switches: from nature to design. Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany) *18*, 7984–7999.

Hinton, H. J., Jegerlehner, A., e Bachmann, M. F. (2008). Pattern recognition by B cells: the role of antigen repetitiveness versus Toll-like receptors. Current topics in Microbiology and Immunology *319*, 1–15.

Houghton, R. L., Benson, D. R., Reynolds, L., McNeill, P., Sleath, P., Lodes, M., Skeiky, Y. a, Badaro, R., Krettli, a U., e Reed, S. G. (2000). Multiepitope synthetic peptide and recombinant protein for the detection of antibodies to Trypanosoma cruzi in patients with treated or untreated Chagas' disease. The Journal of Infectious Diseases *181*, 325–330.

Jana, S., e Deb, J. K. (2005). Strategies for efficient production of heterologous proteins in Escherichia coli. Applied Microbiology and Biotechnology *67*, 289–298.

Kane, J. F. (1995). Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in Escherichia coli. Current Opinion in Biotechnology *6*, 494–500.

Kato, H., Gomez, E. a, Cáceres, A. G., Uezato, H., Mimori, T., e Hashiguchi, Y. (2010). Molecular epidemiology for vector research on leishmaniasis. International Journal of Environmental Research and Public Health *7*, 814–826.

Kaye, P. M., e Aebischer, T. (2011). Visceral leishmaniasis: immunology and prospects for a vaccine. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases *17*, 1462–1470.

Kemp, D. J., Coppel, R. L., e Anders, R. F. (1987). Repetitive proteins and genes of malaria. Annual Review of Microbiology *41*, 181–208.

Kenny, G. E., e Dunsmoor, C. L. (1983). Principles, problems, and strategies in the use of antigenic mixtures for the enzyme-linked immunosorbent assay. Journal of Clinical Microbiology *17*, 655–665.

Kerr, S. F. (2000). Palaearctic origin of Leishmania. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz *95*, 75–80.

Kerr, S. F. (2006). Molecular trees of trypanosomes incongruent with fossil records of hosts. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz *101*, 25–30.

Kotera, Y., Fontenot, J. D., Pecher, G., Metzgar, R. S., e Finn, O. J. (1994). Humoral immunity against a tandem repeat epitope of human mucin MUC-1 in sera from breast, pancreatic, and colon cancer patients. Cancer Research *54*, 2856–2860.

Krauspenhar, C., Beck, C., Sperotto, V., Alves, A., Rodrigues, B. L., Visceral, L., Um, E. M., Cruz, C. D. E., Do, R. I. O. G., e Maria, S. (2007). Universidade Federal de Santa Maria Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta , Rio Grande do Sul , Brasil Visceral leishmaniasis in a dog in Cruz Alta , Rio Grande do Sul , south Brazil. Ciência Rural *37*, 907–910.

Kubar, J., e Fragaki, K. (2005). Recombinant DNA-derived leishmania proteins: from the laboratory to the field. The Lancet Infectious Diseases *5*, 107–114.

Kuhls, K., Alam, M. Z., Cupolillo, E., Ferreira, G. E. M., Mauricio, I. L., Oddone, R., Feliciangeli, M. D., Wirth, T., Miles, M. a, e Schönian, 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.

Kumar, N., Sinha, P. K., Pandey, K., Verma, N., Lal, C. S., Ranjan, A., Verma, R. B., e Das, P. (2011). A rare case of Visceral leishmaniasis with multiple relapse and multi-drug unresponsive: successfully treated with combination therapy. International Journal of Clinical Pharmacy *33*, 726–729.

Leblois, R., Kuhls, K., François, O., Schönian, G., e Wirth, T. (2011). Guns, germs and dogs: On the origin of Leishmania chagasi. Infection, genetics and evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases *11*, 1091–1095.

Lukes, J., Mauricio, I. L., Schönian, G., Dujardin, J.-C., Soteriadou, K., Dedet, J.-P., Kuhls, K., Tintaya, K. W. Q., Jirků, M., Chocholová, E., *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.

Magalhães, F. B. (2007). Identificação e avaliação de novos antígenos recombinantes para o diagnóstico da Leishmaniose visceral humana e canina. 161f. Tese (Doutorado em Imunologia). Universidade Federal da Bahia, Bahia.

Maia-elkhoury, A. N. S., e Sena, J. M. D. (2008). Visceral leishmaniasis in Brazil : trends and challenges Leishmaniose visceral no Brasil : Evolução e Desafios. Cad. Saúde Pública *24*, 2941–2947.

Maltezou, H. C. (2010). Drug resistance in visceral leishmaniasis. Journal of Biomedicine & Biotechnology *2010*, 617521.

Melo, E. S. P., Araújo, F. R., Ramos, C. a. N., Soares, C. O., Rosinha, G. M. S., Elisei, C., e Madruga, C. R. (2007). ELISA com MSP5 recombinante truncada para

detecção de anticorpos contra Anaplasma marginale em bovinos. Pesquisa Veterinária Brasileira *27*, 301–306.

Melo, M. (2004). Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. Revista Brassileira de Parasitologia Veterinária *23*, 41–45.

Mettler, M., Grimm, F., Capelli, G., Camp, H., e Deplazes, P. (2005). Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic Leishmania infections in dogs. Journal of Clinical Microbiology *43*, 5515–5519.

Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Oliva, G., e Baneth, G. (2008). Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. Trends in Parasitology *24*, 371–377.

Mohebali, M., Taran, M., e Zarei, Z. (2004). Rapid detection of Leishmania infantum infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rk39 test and direct agglutination. Veterinary Parasitology *121*, 239–245.

Mohebali, M., Hajjaran, H., Hamzavi, Y., Mobedi, I., Arshi, S., Zarei, Z., Akhoundi, B., Naeini, K. M., Avizeh, R., e Fakhar, M. (2005). Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniosis in the Islamic Republic of Iran. Veterinary Parasitology *129*, 243–251.

Momen, H., e Cupolillo, E. (2000). Speculations on the origin and evolution of the genus Leishmania. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz *95*, 583–588.

Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R., e Saravia, N. G. (2005). Advances in leishmaniasis. Lancet *366*, 1561–1577.

Mutebi, J., Alexander, B., e Sherlock, I. (1999). Breeding structure of the sand fly Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva) in Brazil. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene *61*, 149–157.

Nascimento, A., e Alves, J. (2011). Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Primavera do Leste, Mato Grosso, MT, Brasil. Saúde Coletiva *08*, 210–214.

Nascimento, M. B. (2009). Análise da Antigenicidade e Expressão de Quatro Novas Proteínas Hipotéticas de *Leishmania* (*Leishmania*) *Chagasi.* 79f. Dissertação (Mestrado em Genética). Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco.

Neves, D. P. (2011). Parasitologia Humana 12th ed. (Atheneu).

Noyes, H. (1998). Implications of a Neotropical origin of the genus Leishmania. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz *93*, 657–661.

Noyes, H. a, Morrison, D. a, Chance, M. L., e Ellis, J. T. (2000). Evidence for a neotropical origin of Leishmania. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz *95*, 575–578.

Oliveira, G. G. S., Magalhães, 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., *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.

Palatnik-de-Sousa, C. B. (2008). Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. Vaccine *26*, 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.

Paraguassu-chaves, C. (2001). Geografia Médica ou da Saúde - Espaço e Doença na Amazônia Ocidental 1° ed. (Porto Velho).

Pavli, A., e Maltezou, H. C. (2010). Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. International Society for Infectious Diseases *14*, e1032–9.

Pelissari, D. M., Cechinel, M. P., Sousa-Gomes, M. L. D., e Lima Júnior, F. E. F. D. (2011). Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. Epidemiologia e Serviços de Saúde *20*, 107–110.

Perrotey, S., Mahamdallie, S., Pesson, B., Richardson, K., Gállego, M., e Ready, P. (2005). Posglacial dispersal of Phlebotomus perniciosus into France. Journal de la Société Française de Parasitologie *12*, 283–291.

Pessôa, S. B., e Martins, A. V. (1982). Parasitologia Médica 11° ed. (Guanabara Kooban).

Piscopo, T. V., e Mallia Azzopardi, C. (2007). Leishmaniasis. Postgraduate Medical Journal *83*, 649–657.

Ready, P. D. (2010). Leishmaniasis emergence in Europe. Euro surveillance : bulletin européen sur les maladies transmissibles. European Communicable Disease Bulletin *15*, 19505.

Reeder, J. C., e Brown, G. V. (1996). Antigenic variation and immune evasion in Plasmodium falciparum malaria. Immunology and Cell Biology *74*, 546–554.

Reithinger, R., Dujardin, J., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., Brooker, S., Washington, G., Leopold, P., Bailey, M. S., e Lockwood, D. N. J. (2007). Cutaneous leishmaniasis. Clinics in Dermatology *25*, 203–211.

Rosano, G. L., and Ceccarelli, E. a (2009). Rare codon content affects the solubility of recombinant proteins in a codon bias-adjusted Escherichia coli strain. Microbial Cell Factories *8*, 41.

Rubini, A. S., dos Santos Paduan, K., Von Ah Lopes, V., e O'Dwyer, L. H. (2008). Molecular and parasitological survey of Hepatozoon canis (Apicomplexa: Hepatozoidae) in dogs from rural area of Sao Paulo state, Brazil. Parasitology Research *102*, 895–899.

SAMBROOK, J., e RUSSEL, D. (2001). Expression of Cloned Genes in *Escherichia coli*. In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York, Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, vol 1.

Santos, D. O., Coutinho, C. E. R., Madeira, M. F., Bottino, C. G., Vieira, R. T., Nascimento, S. B., Bernardino, A., Bourguignon, S. C., Corte-Real, S., Pinho, R. T., et al. (2008). Leishmaniasis treatment--a challenge that remains: Parasitology Research *103*, 1–10.

Schmidt, G., Roberts, L., e Janovy, Lj. (2009). Foundations of Parasitology. 8th ed.

Schönian, G., Kuhls, K., e Mauricio, I. L. (2011). Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of Leishmania. Parasitology *138*, 405–425.

Seifert, K. (2011). Structures, targets and recent approaches in anti-leishmanial drug discovery and development. The open medicinal chemistry journal *5*, 31–39.

Sharma, U., e Singh, S. (2008). Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control. Journal of Vector Borne Diseases *45*, 255–272.

Shaw, J. J. (1994). Taxonomy of the genus Leishmania: present and future trends and their implications. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz *89*, 471–478.

Silva, F. S. (2007). Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina Pathology and pathogenesis of canine visceral leishmaniasis. Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas *1*, 20–31.

da Silveira, J. F., Umezawa, E. S., e Luquetti, A. O. (2001). Chagas disease: recombinant Trypanosoma cruzi antigens for serological diagnosis. Trends in Parasitology *17*, 286–291.

Singh, R. K., Pandey, H. P., e Sundar, S. (2006). Visceral leishmaniasis (kala-azar): challenges ahead. The Indian Journal of Medical Research *123*, 331–344.

Singh, S. (2006). New developments in diagnosis of leishmaniasis. The Indian Journal of Medical Research *123*, 311–330.

Srivastava, P., Dayama, A., Mehrotra, S., e Sundar, S. (2011). Diagnosis of visceral leishmaniasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene *105*, 1–6.

Stanley, A., e Enqwerda, C. (2007). Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. Immunology and Cell Biology *85*, 138–147.

Stuart, K., Brun, R., Croft, S., Fairlamb, A., Gürtler, R. E., McKerrow, J., Reed, S., e Tarleton, R. (2008). Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. The Journal of Clinical Investigation *118*, 1301–1310.

Sørensen, H. P., e Mortensen, K. K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. Journal of Biotechnology *115*, 113–128.

Takagi, H., Islam, M. Z., Itoh, M., Islam, A. U., Saifuddin Ekram, a R. M., Hussain, S. M., Hashiguchi, Y., e Kimura, E. (2007). Short report: production of recombinant kinesin-related protein of Leishmania donovani and its application in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene *76*, 902–905.

Tavares, N., Santos, D., e Oliveira, C. (2009). Estratégias De Vacinação Contra Leishmaniose Visceral E Cutânea : Lições Dos Modelos Experimentais. Gazeta Médica da Bahia *79*, 110–121.

Tuon, F. F., Neto, V. A., e Amato, V. S. (2008). Leishmania: origin, evolution and future since the Precambrian. FEMS Immunology and Medical Microbiology *54*, 158–166.

Uribe, S. (1999). The status of the Lutzomyia longipalpis species complex and possible implications for Leishmania transmission. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz *94*, 729–734.

Vos, Q., Lees, A., Wu, Z. Q., Snapper, C. M., e Mond, J. J. (2000). B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. Immunological Reviews *176*, 154–170.

WHO (2010). Control of the leishmaniases. World Health Organization technical report series, xii–xiii, 1–186, back cover.

Wang, J.-Y., Cui, G., Chen, H.-T., Zhou, X.-N., Gao, C.-H., e Yang, Y.-T. (2012). Current epidemiological profile and features of visceral leishmaniasis in People's Republic of China. Parasites & Vectors *5*, 31.

Yabsley, M. J., McKibben, J., Macpherson, C. N., Cattan, P. F., Cherry, N. A., Hegarty, B. C., Breitschwerdt, E. B., O'Connor, T., Chandrashekar, R., Paterson, T., *et al*. (2008). Prevalence of Ehrlichia canis, Anaplasma platys, Babesia canis vogeli, Hepatozoon canis, Bartonella vinsonii berkhoffii, and Rickettsia spp. in dogs from Grenada. Veterinary Parasitology *151*, 279–285.

Yurchenko, V. Y., Lukes, J., Jirku, M., Zeledón, R., e Maslov, D. a (2006). Leptomonas costaricensis sp. n. (Kinetoplastea: Trypanosomatidae), a member of the novel phylogenetic group of insect trypanosomatids closely related to the genus Leishmania. Parasitology *133*, 537–546.

Zhang, W. W., 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, E. E., Musa, A. M., Khalil, E. A. G., El-Hassan, I. M., and El-Hassan, A. M. (2003). Post-kala-azar dermal leishmaniasis. The Lancet Infectious Diseases *3*, 87–98.

9. Curriculum vitae (Lattes)

Diego de Hollanda Cavalcanti Tavares
Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Diego de Hollanda Cavalcanti Tavares
Filiação Moema Maria de Hollanda Cavalcanti
Nascimento 26/10/1984 - Recife/PE - Brasil
Carteira de Identidade 6900654 SDS - PE - 10/05/2001
CPF 054.035.314-08

Formação acadêmica/titulação

2010 Mestrado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Desenvolvimento de Proteínas Quiméricas de Leishmania chagasi Utilizando Regiões Antigênicas de Proteínas Recombinantes Previamente Selecionadas
Orientador: Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto
Co-orientador: Dr.Franklin Barbalho Magalhães
Bolsista do (a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco

2006 - 2009 Graduação em Biomedicina.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Análise da expressão e localização subcelular de um ortólogo de Trypanosoma brucei da proteína NOM1
Orientador: Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Formação complementar

2008 - 2011 Curso de Inglês.
Serviço Nacional de Aprendizagem Comercial, SENAC, Brasil

2006 - 2006 Curso de curta duração em Parasitologia Clínica.

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

2006 - 2006 Curso de curta duração em Interpretação de Exames Laboratoriais. Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, SBAC, Brasil

---

Atuação profissional

1. Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Vínculo institucional

2010 - Atual Vínculo: Estudante de Mestrado, Enquadramento funcional: Bolsista Mestrado, Regime: Parcial

---

Atividades

03/2010 - Atual: Projetos de pesquisa, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Participação em projetos:
Desenvolvimento de Proteínas Quiméricas de Leishmania chagasi Utilizando Regiões Antigênicas de Proteínas Recombinantes Previamente Selecionadas

2. Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães - CPQAM

Vínculo institucional

2010 - Atual Vínculo: Bolsista de Mestrado, Enquadramento funcional: Bolsista Mestrado, Carga horária: 40h, Regime: Integral

2008 - 2010 Vínculo: Bolsista-PIBIC, Enquadramento funcional: Iniciação Científica , Carga horária: 20, Regime: Dedicação exclusiva

Atividades

12/2008 - 01/2009 Estágio, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

Estágio: Clonagem e Expressão em Escherichia coli de umj ortólogo de Leishmania major e Trypanosoma brucei da Proteína NOM1

3. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

2007 - 2007 Vínculo: Iniciação Científica, Enquadramento funcional: Estágio de Iniciação Científica em Genética, Carga horária: 20h, Regime: Parcial

Atividades

08/2007 - 12/2007 Estágio, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Genética

Estágio: Orientador(a); Drª. Tânia Rieger - Área: Biologia Molecular de gafanhotos.

Áreas de atuação

1. Biologia Molecular
2. Genética Molecular e de Microorganismos

Projetos

Projetos de pesquisa **2010 – 2012 :** Desenvolvimento de Proteínas Quiméricas de *Leishmania chagasi* Utilizando Regiões Antigênicas de Proteínas Recombinantes Previamente Selecionadas

Descrição: Nosso grupo vem fazendo a identificação de novos antígenos recombinantes de Leishmania chagasi, com o objetivo de aperfeiçoar o diagnóstico sorológico e para a confecção de uma vacina para leishmaniose visceral canina.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa
Integrantes: Diego de Hollanda Cavalcanti Tavares (Responsável);
Financiador(es): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco-FACEPE

Idiomas

Inglês Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Bem

Português Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem