

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA**

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE DUAS PROTEÍNAS
QUIMÉRICAS - PQ10 e PQ20- QUANTO À
IMUNOGENICIDADE E USO EM IMUNODIAGNÓSTICO
PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

ANGÉLICA ROSA FARIA

Belo Horizonte

2014

Angélica Rosa Faria

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE DUAS PROTEÍNAS
QUIMÉRICAS - PQ10 e PQ20- QUANTO À
IMUNOGENICIDADE E USO EM IMUNODIAGNÓSTICO
PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

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

Área de concentração: Protozoologia

Orientadora: Prof. Dra Héliida Monteiro de Andrade

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
2014

043

Faria, Angélica Rosa.

Produção e avaliação de duas proteínas quiméricas - PQ10 e PQ20- quanto a imunogenicidade e uso em imunodiagnóstico para leishmaniose visceral canina [manuscrito] / Angélica Rosa Faria. - 2014.

88 f.: il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Héli da Monteiro de Andrade.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Leishmaniose visceral - Teses. 2. Teste imunodiagnóstico - Teses. 3. Diagnóstico - Teses. 4. Proteína recombinante. 5. Proteínas quiméricas. 6. Parasitologia - Teses I. Andrade, Héli da Monteiro de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576.88/.89

AGRADECIMENTO

À vida, à luz.

A toda minha família, pela oportunidade, pelo carinho, pelo aprendizado e pelo apoio em todas as horas.

Ao meu marido, que me acompanhou em toda essa trajetória, pelo incondicional companheirismo, confiança e compreensão, em todos os momentos que precisei.

À Professora Héli da Monteiro de Andrade, minha querida orientadora, pelo carinhoso acolhimento desde o mestrado, pela confiança, pela grande amizade, pelos incentivos constantes, pelo entusiasmo com o trabalho, e pelo enorme aprendizado para toda a vida.

Aos amigos do Laboratório de Leishmanioses/UFMG, em especial ao João Carlos pela ajuda (com os coelhos, com as culturas de *Leishmania...*), e também pelo seu bom humor todos os dias; à Simone, pela sua disponibilidade em ajudar e ensinar em todos os momentos, a Ivana, Kléber e Jordana pela ajuda com alguns experimentos, ao Prof. Alexandre Ferreira Marques, pelas valiosas sugestões no projeto e ao Luciano, pela síntese da PQ20. Aos amigos Aliani, Ana Paula, Bruna, Elaine, Gabriela, Fernanda, Mariana, Nayara, Janaína, Jordana, Júnior, Ramon, Sílvia, Talita, Tamara, pela agradável convivência diária.

Ao Dr. Leonardo Miranda Damasceno, pela enorme colaboração com a síntese da PQ10, juntamente com todos os membros do IMPAR, em especial à Eneida, Fernando Marçal e Aretha.

Ao Dr. Wendel Coura Vital, pela enorme ajuda nos experimentos na UFOP, juntamente com os alunos de doutorado, Henrique e Gleiciane.

Aos professores Ricardo Fujiwara, Maria Norma Melo, Alexandre Barbosa Reis, e também ao Centro de Controle de Zoonoses, pela doação dos soros caninos, que foram de grande valia nesse trabalho.

Aos bioteristas Elen Márcia, Manoel Carlos, Batata e Zé Carlos, pela imensa ajuda no cuidado com os animais de experimentação.

À comissão organizadora do III Encontro de Pesquisa em Parasitologia, Bruna Torres, Érica, João, Júlia, Júnior e Mateus, pela agradável convivência durante todos os meses de preparação do Encontro.

Aos colegas da turma de mestrado, Alexandre, Emília, Fernando, Laila, Lanuze, Letícia, Luiza, Pedro e Rafaela, pela amizade cultivada desde a nossa entrada na Pós-Graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, do Departamento de Parasitologia/UFMG, pela oportunidade de desenvolver o presente trabalho, e em especial a Sumara e Sibebe, pela disponibilidade e atenção, em todos os momentos.

COLABORADORES

Este trabalho contou com a colaboração do professor Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli e do Dr. Leonardo Miranda Damasceno, ambos do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG, do Dr. Wendel Coura Vital e do Dr. Alexandre Barbosa Reis, ambos do Laboratório de Imunopatologia do NUPEB/UFOP, do Dr. Alexandre Ferreira Marques e do mestre Luciano Veloso, do Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Parasitologia da UFMG.

FINANCIADORES

Este trabalho foi financiado pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais) e pelo INCTV (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Vacinas).

RESUMO

A leishmaniose visceral é a mais grave dentre as leishmanioses e sua forma zoonótica, causada por *Leishmania infantum*, representa 20% da leishmaniose visceral humana mundial. No Brasil, uma das medidas de controle é a identificação e eliminação de cães infectados. Os métodos diagnósticos utilizados para identificação desses animais não são capazes de detectar 100% deles, o que compromete a eficácia dessa medida de controle. Além disso, o desenvolvimento de uma vacina eficiente seria altamente desejável. Dessa forma, visando contribuir para o diagnóstico e o controle da Leishmaniose Visceral Canina (LVC), tivemos o objetivo de produzir e testar dois novos antígenos. Anteriormente, realizamos um trabalho no qual dez peptídeos foram identificados como antigênicos em ELISA para diagnóstico da LVC. Na atual proposta, esses dez peptídeos foram reunidos em um gene sintético. Além disso, outros vinte peptídeos foram identificados como bons epitopos para células T em publicação do nosso grupo. Da mesma forma, esses peptídeos foram unidos em uma molécula. Ambos os genes foram clonados e expressos em *Escherichia coli*, produzindo duas proteínas quiméricas: PQ10 e PQ20. Esses antígenos foram utilizados em ELISA para LVC com sensibilidades de 80,1% para a PQ10 e 84,9% para a PQ20 e especificidade de 65,6% para ambas. Esses antígenos foram capazes de identificar cães assintomáticos (80% do total) de maneira mais eficiente que o DPP® (10%) e o ELISA Biomanguinhos (0%), testes atualmente utilizados pelo programa de controle da LVC. Além disso, a detecção de cães no início da infecção também ocorreu, com positividade oscilando entre 23% e 65%, de acordo com o período da coleta. Em amostras de soros de uma coorte, a soroconversão ocorreu mais precocemente para as PQs do que para o ELISA Biomanguinhos. As proteínas se mostraram imunogênicas na obtenção do soro policlonal em coelhos. Com esse soro, foi possível identificar que apenas alguns peptídeos são os maiores responsáveis pela imunogenicidade das proteínas quiméricas. Em ensaios de imunização de camundongos e de estímulo de células mononucleares do sangue periférico de cães, foi possível observar que as proteínas estimulam um padrão de resposta imune do tipo Th2, com produção de IL-4 e IL-10. Em suma, nossos estudos demonstram que as proteínas quiméricas construídas com epitopos para células B possuem um grande potencial em imunodiagnóstico, podendo beneficiar programas de controle da leishmaniose visceral canina.

Palavras chave: Leishmaniose Visceral Canina, diagnóstico, proteína recombinante, ELISA.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is the most severe form among leishmaniasis. The zoonotic disease, caused by *Leishmania infantum*, represents 20 % of the world's human visceral leishmaniasis with increasing incidence in urban areas of the tropics. In Brazil, one of the control measures is the identification and elimination of infected dogs. The diagnostic methods used to identify these animals are not able to detect 100 % of them, which may compromise the effectiveness of this control measure . Furthermore, the development of an effective vaccine would be highly desirable. Thus, to contribute to the diagnosis and control of Canine Visceral Leishmaniasis, we aimed to develop and test two new antigens. Previously, we published a work in which ten antigenic peptides were identified in ELISA anti - LVC. In the current proposal, these ten peptides were assembled into a synthetic gene. Furthermore, another twenty peptides were identified as good T cell epitopes in a publication by our group. Similarly, these peptides were joined in a molecule. Both genes have been cloned and expressed in *Escherichia coli*, producing two chimeric recombinant proteins, PQ10 and PQ20. These antigens have been used in ELISA anti-LVC with a sensitivity of 80.1% (PQ10) and 84.9% (PQ20) and specificity of 65.6% for both. The proteins were able to identify asymptomatic dogs (80%) more effectively than ELISA Biomanguinhos (0%) and DPP® (10%). Moreover, detection of dogs in the beginning of the infection also occurred, with positivities ranging from 23 and 65%, depending upon the phase in which sera was acquired. The proteins were immunogenic in the raising of polyclonal serum in rabbits. With this serum, we found that only a few peptides were the most responsible for the immunogenicity of the chimeric proteins. In mice immunization and in stimulation of canine peripheral blood mononuclear cells, we observed that the proteins stimulate a pattern of Th2 - type immune response, with IL-10 and IL-4 production. In summary, our studies demonstrate that the use of the constructed chimeric proteins based on B cells epitopes has a great potential in immunodiagnosis and can benefit canine visceral leishmaniasis control programs.

Keywords : Canine Visceral Leishmaniasis , diagnosis , recombinant protein ELISA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fluxograma da produção das proteínas quiméricas	25
Figura 2	Representação esquemática da imunização realizada em camundongos.....	34
Figura 3	Sequência de nucleotídeos das proteínas quiméricas.....	38
Figura 4	Gel de poliacrilamida das frações solúveis e insolúveis da cultura de indução bacteriana, indicando bandas correspondentes às proteínas PQ10 e PQ20.....	39
Figura 5	Gel de poliacrilamida. A: PQ10 pré- purificação; B-F: Fração. Membrana <i>western blotting</i> anti-HIS. G: PQ10 pré- purificação; H: Fração.....	40
Figura 6	Padronização das condições de sensibilização de placas BD Falcon® utilizando a PQ10 a 0,5 µg/mL.....	41
Figura 7	Padronização das diluições de soros e conjugados em placas BD Falcon® utilizando a PQ10 a 0,5 µg/mL.....	41
Figura 8	ELISA com a PQ10 comparando soros de cães não infectados (n=9) e infectados por <i>L. infantum</i> (n=98).....	42
Figura 9	ELISA-PQ10 comparando diferentes grupos de cães.....	44
Figura 10	ELISA-PQ20 comparando diferentes grupos de cães.	45
Figura 11	Fluxograma dos ensaios realizados com as amostras classificadas como falso negativas pelas PQs	47
Figura 12	Diagnóstico de 42 cães (inicialmente PCR -) por PCR, EIE-Biomanguinhos, PQ10 e PQ20 em diferentes coletas.....	49

Figura 13	Diagnóstico de 38 cães (inicialmente PCR +) por PCR, EIE-BioManguinhos, PQ10 e PQ20 em diferentes coletas.....	50
Figura 14	Ocorrência de reações cruzadas com a PQ10 (A) e PQ20 (B).....	52
Figura 15	Membranas de <i>western blotting</i> com as PQs incubadas com soro de coelho antes (T0) e após (T6) imunização.....	53
Figura 16	Absorbâncias dos soros antes e após imunização dos coelhos com as PQs.....	54
Figura 17	Diferença entre absorbâncias dos soros antes e após imunização dos coelhos para cada um dos peptídeos que compõem a PQ10.....	55
Figura 18	Diferença entre absorbâncias dos soros antes e após imunização dos coelhos para cada um dos peptídeos que compõem a PQ20.....	56
Figura 19	Níveis séricos de IgG total dos camundongos imunizados com PQ10 e PQ20	57
Figura 20	Níveis de IFN- γ produzidos por esplenócitos de camundongos imunizados com PQ10 (A) e PQ20 (B).....	59
Figura 21	Níveis de IL-4 produzidos por esplenócitos de camundongos imunizados com PQ10 (A) e PQ20 (B).....	60
Figura 22	Níveis de IFN- γ produzido por PBMC de cães infectados (A) e não infectados (B) sob diferentes estímulos.....	61
Figura 23	Níveis de IL-10 produzido por PBMC de cães infectados (A) e não infectados (B) sob diferentes estímulos.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Grupos de camundongos imunizados	34
Tabela 2	Comparação do desempenho dos ensaios ELISA PQ10, DPP® e ELISA Biomanguinhos.....	43
Tabela 3	Comparação do desempenho do ELISA-PQ10 considerando diferentes grupos...44	
Tabela 4	Comparação do desempenho do ELISA-PQ20 considerando diferentes grupos...45	
Tabela 5	Desempenho global das proteínas quiméricas no diagnóstico canino.....	46
Tabela 6	Resultado comparativo da positividade (em porcentagem) de amostras que apresentavam inicialmente resultado PCR -.....	49
Tabela 7	Resultado comparativo da positividade (em porcentagem) de amostras que apresentavam inicialmente resultado PCR +.....	50
Tabela 8	Índice Kappa entre resultados pareados de PCR, ELISA Biomanguinhos, PQ10 e PQ20.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
APS	<i>Ammonium persulfate</i>
AUC	Área sob a curva ROC
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
DAT	<i>Direct agglutination test</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DPP	<i>Dual-Path Platform</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EIE	Ensaio imunenzimático
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELISA-PQs	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay realizado com as proteínas quiméricas</i>
FAST	<i>Fast agglutination screening test</i>
FML	Antígeno ligante de fucose e manose
HIS	Histidina
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
IgG	Imunoglobulina da classe G
IL	Interleucina
IFN-γ	Interferon-gama
IPTG	<i>Isopropylthio-β-galactoside</i>
LB	Luria-Bertani
LRP	<i>Leishmania species ribosomal proteins</i>
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
MG	Minas Gerais
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>

NBT/BCIP	<i>Nitro-blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate</i>
OPD	<i>Ortho-phenylenediamine</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PBS/T	<i>Phosphate Buffer Saline, Tween 0,05%</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PHA	Fitohemaglutinina A
PI	Piauí
PQ	Proteína quimérica
PSI	<i>Pound force per square inch</i>
Qsp	<i>Quod Satis para</i> (quantidade suficiente para)
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic Curve</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SINAM	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
TMB	Tetrametilbenzidina

SUMÁRIO

1 . INTRODUÇÃO	1
1.1 .Importância e quadros clínicos	2
1.2 . Controle da leishmaniose visceral	5
1.3 . Diagnóstico da leishmaniose visceral canina.....	9
1.4 . Novos antígenos para diagnóstico da leishmaniose visceral canina.....	13
1.5 .Resposta imune anti- <i>Leishmania infantum</i>	15
2 . JUSTIFICATIVA	18
3 . OBJETIVOS.....	20
3.1 . Objetivo geral	20
3.2 . Objetivos específicos.....	20
4 . MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1 .Produção das proteínas quiméricas.....	21
4.1.1) Desenho dos genes sintéticos.....	21
4.1.2) Clonagem.....	21
4.1.3) Expressão e purificação.....	23

4.2 .ELISA.....	26
4.2.1) Padronização da técnica.....	26
4.2.2) Testes iniciais.....	26
4.2.3) Validação dos antígenos.....	27
4.2.4) Avaliação da capacidade de detecção da LVC em fase inicial.....	29
4.2.5) Avaliação da ocorrência de reações cruzadas.....	30
4.2.6) Avaliação do desempenho.....	30
4.3 .Verificação da imunogenicidade das proteínas quiméricas.....	31
4.3.1) Resposta imune humoral.....	31
4.3.1.1) Resposta imune humoral em coelhos.....	31
4.3.1.1.a) Imunização.....	31
4.3.1.1.b) <i>Western blotting</i>	32
4.3.1.1.c) ELISA (proteínas e peptídeos).....	33
4.3.1.2) Resposta imune humoral em camundongos.....	33
4.3.1.2.a) ELISA - IgG.....	33
4.3.2) Resposta imune celular.....	35
4.3.2.1) Produção de IFN- γ e IL-4 por esplenócitos de camundongos.....	35
4.3.2.2) Produção IFN- γ e IL-10 por células mononucleares do sangue periférico de cães.....	36

5 . RESULTADOS.....	37
5.1. Produção das proteínas quiméricas.....	37
5.2. ELISA.....	40
5.2.1) Padronização da técnica.....	40
5.2.2) Testes iniciais.....	42
5.2.3) Validação dos antígenos.....	43
5.2.4) Avaliação da capacidade de detecção da LVC em fase inicial.....	48
5.2.5) Avaliação da ocorrência de reações cruzadas.....	51
5.3 .Verificação da imunogenicidade das proteínas quiméricas.....	53
5.3.1-Resposta imune humoral.....	53
5.3.1.1) Resposta imune humoral em coelhos.....	53
5.3.1.1.a) <i>Western blotting</i>	53
5.3.1.1.b) ELISA (proteínas e peptídeos).....	54
5.3.1.2) Resposta imune humoral em camundongos.....	56
5.3.1.2.a) ELISA-IgG.....	56
5.3.2) Resposta imune celular.....	58
5.3.2.1) Produção de IFN- γ e IL-4 por esplenócitos de camundongos.....	58
5.3.2.2) Produção IFN- γ e IL-10 por células mononucleares do sangue periférico de cães.....	61
6 . DISCUSSÃO.....	63

7 .CONCLUSÕES.....	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
9. ANEXOS.....	83
9.1) Plasmídeos utilizados na clonagem e na expressão das proteínas quiméricas	83
9.2) Resultados dos testes diagnósticos realizados em amostras de soro canino provenientes de 3 diferentes coletas.....	84

1 - INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecciosas causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, originalmente descrito por Ross em 1903. São protozoários da ordem Kinetoplastidae e família Trypanosomatidae, que podem infectar humanos e outros vertebrados. Agrupam-se no gênero cerca de 30 espécies, sendo aceito que aproximadamente 21 delas, pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (esse último presente apenas no Novo Mundo) tenham a capacidade de produzir patologias em humanos (Herwaldt, 1999; Pavli & Maltezou, 2010).

O gênero *Leishmania* é constituído por parasitos heteroxenos, sendo os seus hospedeiros invertebrados dípteros conhecidos por flebotomíneos. As espécies transmissoras estão incluídas nos gêneros *Phlebotomus* - vetores do Velho Mundo- e *Lutzomyia* - vetores do Novo Mundo (Sacks & Kamhawi, 2001). Já foram descritas aproximadamente 700 diferentes espécies de flebotomíneos, sendo apenas 30 capazes de transmitir o parasito (Killick-Kendrick, 1999; Moncaz et al., 2012).

O ciclo dos parasitos do gênero *Leishmania* se inicia quando uma fêmea de flebotomíneo se alimenta em um mamífero parasitado e ingere células do sistema fagocítico mononuclear contendo amastigotas. Dentro de 12 a 18 horas, as amastigotas se transformam em formas flageladas, denominadas promastigotas procíclicas. Essas formas se multiplicam intensamente, e em cerca de 30 a 60 horas, ocorre a transformação em formas alongadas denominadas nectomonas, que se aderem ao intestino médio do flebotomíneo. Nos parasitos do subgênero *Viannia*, acrescenta-se uma fase de divisão de paramastigotas ovóides e promastigotas que se aderem às paredes do intestino posterior (Lainson & Shaw, 1978). Cerca de sete dias depois, quando se completa a digestão do sangue, estas formas migram para a região torácica do intestino, onde se transformam em promastigotas metacíclicas. Estas formas são infectantes para o hospedeiro vertebrado e migram para o esôfago, faringe e probóscida do flebotomíneo (Lainson & Shaw, 1978).

A infecção dos hospedeiros vertebrados irá ocorrer através da picada dos flebotomíneos infectados. As fêmeas hematófagas inoculam as formas promastigotas ao realizarem o repasto sanguíneo em humanos ou em outros mamíferos, como canídeos, marsupiais e roedores (Lainson & Rangel, 2005). Haverá fagocitose dessas formas promastigotas pelas células do sistema fagocítico mononuclear, onde ocorre a transformação para a forma amastigota. Apesar dos

macrófagos consistirem na principal célula fagocítica a albergar o parasito, já foi demonstrado que neutrófilos são recrutados dentro das primeiras horas após a inoculação das formas infectantes, apresentando grande importância no processo da infecção. Os neutrófilos serão fagocitados pelos macrófagos, o que proporciona ao parasito acesso à principal célula que o alberga (Müller et al., 2001; Laufs et al., 2002; Peters et al., 2008). As formas amastigotas do parasito irão se multiplicar no interior das células fagocíticas e poderão infectar os flebotomíneos que, por ventura, alimentem-se nesses hospedeiros infectados.

1.1 - Importância e quadros clínicos

As leishmanioses são endêmicas em países tropicais, subtropicais e temperados, ocorrendo em 98 países com aproximadamente 12 milhões de infectados e 350 milhões de pessoas sob risco de contrair a infecção. Como a notificação da doença é compulsória em apenas 32 países afetados pelas Leishmanioses, um grande número de casos não é contabilizado. De fato, considera-se que aproximadamente 2 milhões de novos casos ocorram anualmente (<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>; WHO, Control of the leishmaniasis, 2010; Alvar et al., 2012).

No Brasil, as leishmanioses estão amplamente distribuídas e são agravos de notificação compulsória. Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do Ministério da Saúde, no ano de 2012 e nos 8 primeiros meses de 2013, foram notificados 4.497 casos de LV e 33.418 de LTA (<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>). Isso representa um grave problema de saúde pública.

Dependendo da espécie de *Leishmania* e da resposta imune do hospedeiro, há várias manifestações clínicas da doença, podendo haver acometimento cutâneo, mucoso ou visceral. De acordo com as manifestações clínicas, pode-se dividir a doença em dois grandes grupos: leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral.

A leishmaniose tegumentar (LT) possui ampla distribuição mundial e é endêmica em mais de 70 países, sendo 90% dos casos no Afeganistão, Brasil, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e Síria (Desjeux, 2004). Nas Américas, a doença pode ser causada por diferentes espécies de *Leishmania*, como *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (L.) venezuelensis*, *L. (Viannia)*

braziliensis e *L. (V.) guyanensis*, sendo uma infecção zoonótica que acomete pele e mucosas (Cupollilo et al., 1994).

A LT está presente em todas as regiões brasileiras e foi, inicialmente, resultado de ações antrópicas sobre o ambiente silvestre, o que alterou o padrão de transmissão entre os reservatórios silvestres e seus vetores. Ações contínuas de agricultura exploratória, construção de rodovias, exploração mineral, dentre outras, estabeleceu outro padrão epidemiológico da doença, que tem sido observada atualmente em ambientes periurbanos. A destruição do habitat silvestre dos flebotomíneos fez que eles se adaptassem a ambientes peridomiciliares e até intradomiciliares para sua sobrevivência (Gomes et al., 1990; Desjeux, 2001; Da Costa et al., 2007).

A LT pode se apresentar clinicamente sob diferentes formas, que podem ser subdivididas em leishmaniose cutânea localizada, leishmaniose cutânea difusa, leishmaniose cutânea disseminada e leishmaniose mucocutânea, o que é dependente da espécie do parasito e também da resposta imune do hospedeiro (Silveira et al., 2004).

A leishmaniose visceral (LV) é a forma mais grave da doença (fatal quando não tratada), caracterizada por febre, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatia e anemia. A doença em humanos também é conhecida como “calazar” (Desjeux, 2004; Rabello et al., 2003)

Clínica e epidemiologicamente, existem duas formas principais de LV: a LV zoonótica, em que o cão e/ou outros canídeos desempenham papel de reservatórios da doença, e a LV antroponótica, existente em Bangladesh, Índia e Nepal, por exemplo, que é transmitida entre humanos através da picada de flebotomíneos infectados. A forma antroponótica é causada por *Leishmania (L.) donovani*, enquanto a LV zoonótica é causada pela espécie *L. (L.) infantum* (sinonímia de *L. (L.) chagasi*) (Quinnell & Courtenay, 2009; Maurício et al., 2000)

No Brasil, a principal espécie de vetor envolvida na transmissão de *L. infantum* é *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006), que apresenta ampla distribuição geográfica e pode colonizar áreas peridomiciliares. Esses flebotomíneos têm demonstrado facilidade em adaptar-se tanto a áreas periurbanas quanto a áreas urbanas, com tendência a invadir domicílios (Lainson & Rangel, 2005).

Indivíduos imunossuprimidos e crianças compõem o grupo mais frequentemente atingido pela LV zoonótica. Entretanto, isso não ocorre para a LV antroponótica, em que todas as faixas etárias são igualmente atingidas pela doença (Alvar et al., 1996).

Os parasitos apresentam tropismo pelas células do sistema fagocítico mononuclear. Após um período de incubação que geralmente dura entre 2 e 6 meses, os pacientes apresentam sintomas referentes a uma infecção sistêmica persistente (febre, fadiga, fraqueza, perda de apetite e de peso) e também sintomas referentes à invasão de parasitas em células do sistema fagocítico mononuclear, tais como aumento de tamanho de linfonodos, baço e fígado (Marinkelle, 1980).

No Brasil, a LV apresenta nos dias de hoje expansão geográfica para os estados da região Sul e franco processo de urbanização em cidades localizadas nas regiões Nordeste e Sudeste (Alves & Bevilacqua, 2004; Costa, 2008). Entretanto, apesar da expressiva urbanização da doença, a forma rural ainda persiste. O êxodo rural origina aglomerações urbanas que oferecem para o parasito um vasto número de hospedeiros susceptíveis, frequentemente mal nutridos, aumentando ainda mais o risco de se contrair a doença (<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en>).

A pandemia de HIV/AIDS tornou-se um fator preocupante na epidemiologia da LV sendo essa coinfeção considerada doença emergente de alta gravidade em várias regiões do mundo. Nesses pacientes imunocomprometidos, a doença apresenta curso clínico inespecífico com sintomas que podem ser mascarados por infecções oportunistas (Alvar et al., 1997). Considera-se que haja subnotificação dessa coinfeção, devido a problemas no diagnóstico de uma ou de ambas as patologias (Ezra et al., 2010).

A região metropolitana de Belo Horizonte enfrenta um grave problema de saúde pública, com grande número de casos de LV. Segundo dados da Gerência de Epidemiologia e Informação da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte, houve média anual de 93 casos humanos entre os anos de 2010 e 2012. A média de óbitos ocorridos nesse mesmo período foi de 18,6 (<http://portalpbh.pbh.gov.br>).

De acordo com Margonari et al. (2006), a distribuição de áreas de pobreza parece não influenciar a concentração e a emergência de casos de LV em Belo Horizonte. A facilidade de disseminação, a riqueza e a adaptação de vetores associada à presença do parasito e do hospedeiro, e a falta de informação da população são todas variáveis favoráveis para a expansão da doença. Isso faz com que atualmente, a LV seja encontrada em variados nichos econômicos de Belo Horizonte.

Os cães desempenham papel fundamental na epidemiologia da LV zoonótica, sendo considerados os principais reservatórios do agente etiológico da doença humana (Deane & Deane, 1955). Isso se explica devido ao fato de serem altamente susceptíveis à infecção, por possuírem intenso parasitismo cutâneo e principalmente pelo seu convívio junto ao homem (Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006).

Dependendo da fase da doença e das condições imunológicas, muitos cães infectados se apresentam assintomáticos. Em torno de 60% a 80% dos cães pertencentes a áreas endêmicas podem ter contato com o parasito e não desenvolver sinais clínicos da doença. Além disso, existem evidências de que a taxa de prevalência da infecção em cães assintomáticos pode ser mais alta do que as obtidas por estudos sorológicos (Evans et al., 1990; Queiroz et al., 2010).

Já foi possível demonstrar que os cães infectados assintomáticos são fonte de infecção para os flebotomíneos e, conseqüentemente, têm papel ativo na transmissão de *Leishmania* (Alvar et al., 1994; Molina et al., 1994; Abranches et al., 1998; Silva, 2005; Laurenti et al., 2013). No Brasil, a forma assintomática da doença é encontrada com índices variados; geralmente representa 40 a 60% de uma população canina (Marzochi & Marzochi, 1997; Silva et al., 2008; Camargo-Neves & Katz, 1999; Tolezano et al., 1999). A detecção desses cães representa um ponto importante na epidemiologia da LV.

Em Belo Horizonte, são realizados inquéritos sorológicos para a detecção de cães positivos como parte das ações do programa de controle desenvolvido pela Secretaria Municipal de Saúde através do Departamento de Controle de Zoonoses. No período de 2010 a 2012, foram examinadas 572.065 amostras de sangue canino com taxa média de positividade de 5,47% (<http://portalpbh.pbh.gov.br>).

1.2 - Controle da Leishmaniose Visceral

As campanhas de controle da LV no Brasil tiveram seu início na década de 50. Entretanto, durante a década de 60, as ações foram interrompidas e apenas em 1982 o programa foi retomado, quando a extinta Superintendência de Controle de Endemias detectou um aumento do número de casos de LV no Brasil. Atualmente, o Ministério da Saúde, por intermédio da Fundação Nacional de Saúde e de Secretarias Estaduais e Municipais de Saúde, realiza o Programa de Controle da LV centrado nas seguintes medidas: diminuição da densidade populacional do vetor, identificação

e eliminação dos cães infectados e identificação e tratamento das pessoas doentes (Alves & Bevilacqua, 2004; Maia-Elkhoury et al., 2008). O Brasil é o único país endêmico para LV que regularmente conduz um programa epidemiológico e profilático no combate à doença (Palatnik-de-Souza et al., 2001).

Dentre as medidas de controle para a LV, a eliminação de cães infectados é a mais controversa. O processo de detecção de reservatórios infectados, uma vez que envolve questões de cunho afetivo por parte de alguns proprietários que não concordam com a perda do seu animal (Lainson & Rangel, 2005), requer métodos diagnósticos confiáveis. Nesse sentido, o cão assume uma importância muito grande para o controle da doença, pois a eutanásia deste animal irá envolver a delicada e polêmica relação homem-cão, criando resistência ao combate da LV canina (Bevilacqua, 1999). Nunes et al. (2010) verificaram que a redução da incidência de LV humana estava estatisticamente correlacionada à taxa de eutanásia de cães infectados, em um estudo realizado em Araçatuba, São Paulo. Entretanto, o mesmo grupo havia relatado anteriormente a importância epidemiológica decorrente da reposição de cães eliminados por parte dos proprietários no distrito de Alvorada, Araçatuba, São Paulo. Além da ocorrência da substituição de cães eliminados por outros mais jovens e susceptíveis à doença, foi relatada também a substituição por cães já infectados, o que sugere a manutenção da LVC naquela área (Nunes et al., 2008).

Estudos realizados por Dietze et al. (1997) em Pancas, Espírito Santo, demonstraram que a eliminação dos cães soropositivos reduziu apenas temporariamente a força de transmissão entre os cães, sendo por isto considerada medida insuficiente para o controle da LVC. De acordo com esse grupo de pesquisadores, entre os anos de 1990 e 1994, quase cinco milhões de cães foram submetidos a exames sorológicos e mais de 80.000 animais foram eutanasiados no Brasil; todavia, a LV humana aumentou em quase 100% no mesmo período. Entretanto, Palatnik-de-Souza et al. (2001) relataram que a eliminação de cães soropositivos de fato é eficiente para reduzir a incidência de LV. Segundo esses autores, apesar do alto custo e da dificuldade de execução, as campanhas de controle da população canina realizadas no Brasil devem ser mantidas, uma vez que o tratamento de cães soropositivos é uma intervenção inviável, tanto pelo custo proibitivo, quanto pela sua ineficiência. Dessa maneira, observa-se que ainda não há um consenso quanto à questão da eutanásia canina no controle da LV (Palatnik-de-Souza & Day, 2011).

Vários estudos já foram realizados visando o desenvolvimento de vacinas anti-LVC como método de controle dessa doença. Dentre esses trabalhos, destaca-se o de Mayrink et al. (1996), no qual cães foram imunizados com antígeno bruto de *L. braziliensis*, associado ao BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) como adjuvante, em uma preparação conhecida como Leishvacin®. Essa vacina demonstrou 90% de proteção contra a infecção experimental por promastigotas de *L. infantum*, cepa MHOM/BR/72/BH46 (Mayrink et al., 1996). Entretanto, a mesma vacina não apresentou nenhuma diferença significativa na proteção se comparada a placebos em teste de campo realizados no município de Montes Claros, Minas Gerais, área endêmica para LV (Genaro et al., 1996).

Atualmente, a vacina Leishmune® encontra-se disponível para comercialização no Brasil. Esta vacina é composta pelo antígeno complexo glicoprotéico ligante de fucose e manose (FML) de *L. donovani* (Palatnik et al., 1989). Embora trabalhos tenham demonstrado eficácia dessa vacina envolvendo cães em área endêmica para LVC (da Silva et al., 2001; Borja-Cabrera et al., 2004) de Amorim et al., (2010) demonstraram que 63% dos grupo de cães vacinados apresentaram resultados positivos para PCR. A vacina também possui a desvantagem de que cães imunizados apresentam altos níveis de imunoglobulinas similares àquelas observadas em cães infectados (Borja-Cabrera et al., 2002; de Amorim et al., 2010). Em estudo recente, Marcondes et al. (2013) demonstraram que cães vacinados com Leishmune® apresentam sorologia positiva para RIFI, ELISA Biomanguinhos e inclusive DPP® até 6 meses após a vacinação. Além disso, o Ministério da Saúde não autoriza a utilização desta vacina como medida de controle da leishmaniose visceral no Brasil, por entender que os estudos até agora realizados referem-se apenas à eficácia vacinal canina e por não ter sido estudado o impacto na incidência humana, assim como estudos de custo/efetividade (Ministério da Saúde, 2005).

Outra vacina presente no mercado brasileiro é a Leish-Tec®, que utiliza antígeno específico de amastigotas: o recombinante A2. Segundo dados publicados por Fernandes et al. (2008), a vacina induz proteção parcial em cães, além de manter negativos os exames sorológicos dos cães vacinados.

A vacina denominada CaniLeish® possui em sua composição antígenos excretados/secretados, encontrados no sobrenadante da cultura de *L. infantum*, associados à saponina. Esse produto encontra-se comercialmente disponível na Europa desde 2011. Essa

vacina foi capaz de induzir um perfil de citocinas do tipo Th1 e reduzir a carga parasitária *in vitro* de macrófagos infectados de cães imunizados (Moreno et al., 2012).

Outro importante pilar do controle da LV é diminuição da população de vetores (Ministério da Saúde, 2006). Modelos matemáticos sugerem que o controle de vetores e a vacinação canina podem ser mais eficazes se comparado à eutanásia de cães soropositivos (Dye, 1996). Entretanto, De Souza et al. (2008) publicaram um estudo randomizado que comparou três medidas: o efeito da aplicação de piretróides visando a diminuição dos vetores, a aplicação de piretróides associada à eutanásia canina, e nenhuma intervenção. Após dois anos, apesar de ter sido observada uma incidência menor de LV nos grupos submetidos às ações de controle, não houve diferenças estatisticamente significantes entre as intervenções (De Souza et al., 2008).

O tratamento dos casos humanos, após diagnóstico positivo é outra medida de controle da LV preconizada pelo Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2006), visando a diminuição da morbi-mortalidade. Entretanto, as opções de tratamento são limitadas. Todos os fármacos disponíveis devem ser administrados por via parenteral e durante um longo período de tempo (geralmente 20 dias), além de serem potencialmente tóxicos. No Brasil, recomenda-se o tratamento com a dose de 20mg/Kg/dia de antimoniato N-metil glucamina pentavalente por via endovenosa ou intramuscular por no mínimo 20 dias e no máximo 40 dias. (Ministério da Saúde, 2006). Segundo Romero & Boelaert (2010), esse protocolo é baseado em evidências científicas fracas, pois não foram realizados nas Américas estudos clínicos controlados e randomizados de fase 3. Apesar da resistência aos antomoniatos ser menos relevante nas Américas se comparado à Índia, combinações de drogas são desejáveis e devem ser melhor estudadas, devido à potencial diminuição da duração dos esquemas terapêuticos e também da toxicidade (Romero & Boelaert, 2010).

Considerando que as regiões endêmicas para LV têm se expandido, e que houve um aumento considerável no número de casos registrados nos últimos anos (<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>), deduz-se que as medidas de controle da doença não têm se mostrado eficientes. Os principais fatores relacionados ao insucesso dessas medidas seriam: a falta de padronização dos métodos de diagnóstico da infecção humana e canina (Gontijo & Melo, 2004) e a baixa eficiência desses métodos (Grimaldi et al., 2012; Faria & Andrade, 2012); a discordância entre estudos que avaliam o impacto da eliminação de cães soropositivos na prevalência da infecção humana (Palatnik-de-Sousa et al., 2001; Nunes et al. 2008; Nunes et al.

2010;) e a escassez de estudos sobre o impacto das ações de controle dirigidas contra os vetores (Romero & Boelaert, 2010).

1.3 - Diagnóstico da leishmaniose visceral canina

O diagnóstico 100% eficaz da LVC ainda é um desafio, apesar dos progressos observados no desenvolvimento de vários métodos (Maia & Campino, 2008). Atualmente, realizam-se testes parasitológicos, testes sorológicos e testes moleculares, cada um apresentando os seus pontos positivos, mas também os negativos.

O diagnóstico clínico da LVC é bastante complexo. Apesar da ausência de sinais clínicos patognomônicos, os mais observados são as alterações cutâneas, linfadenomegalia, perda de peso, hepatoesplenomegalia, onicogribose e apatia (Maia & Campino, 2008). Esse diagnóstico é relativamente simples de ser realizado em cães sintomáticos, grupo que não representa a totalidade de cães soropositivos (Brandonisio et al., 1992; Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006). Além disso, a maioria dos sinais observados são comuns a outras patologias caninas, como erlichiose e babesiose (Gomes et al., 2008) e a imunossupressão causada pela infecção pode gerar infecções oportunistas, dificultando ainda mais o diagnóstico clínico (Silva FS, 2007). Dessa forma, o diagnóstico definitivo requer uma associação entre os parâmetros clínicos, epidemiológicos, parasitológicos e sorológicos (Palatnik-de-Souza et al., 2001).

Métodos diagnósticos que envolvem a punção de órgãos são bastante invasivos, entretanto, fornecem a certeza da infecção por possibilitarem a visualização do parasito (De Almeida et al., 2011). Através desses exames parasitológicos, formas amastigotas podem ser observadas em aspirados diversos, como de linfonodos, medula óssea ou biópsia hepática, corados com Giemsa, Wright e corante Panótico (Ministério da Saúde, 2006), sendo que os aspirados de medula e linfonodos são os mais usados pelos clínicos veterinários para diagnosticar a LVC (Silva SM, 2007). A especificidade destes métodos chega a 100%, mas a sensibilidade é muito variável, pois a distribuição dos parasitas não é homogênea no mesmo tecido. Sensibilidades mais altas (98%) são alcançadas em aspirados de baço (Sundar & Rai, 2002). Esses métodos, entretanto, podem gerar resultados falso-negativos devido ao baixo número de parasitos contidos na amostra, especialmente em cães assintomáticos (Gomes et al., 2008). A colonoscopia em cães é também uma ferramenta auxiliar no diagnóstico pois permite o exame

macroscópico e a coleta de material para visualização de amastigotas por imuno-histoquímica (Pinto et al., 2013)

Outros métodos parasitológicos consistem na cultura *in vitro* de fragmentos de tecidos ou aspirados, e também na inoculação em animais de laboratório, principalmente *hamsters*. Em um estudo conduzido por Madeira et al. (2009), a cultura de fragmentos de pele resultou em 78% de positividade em cães sorologicamente positivos. Entretanto, juntamente com a análise histopatológica de tecidos infectados, esses métodos carecem de sensibilidade e aplicabilidade em campo, além de serem bastante invasivos (Herwaldt, 1999).

Tendo em vista que a eliminação de cães infectados é método preconizado pelo Ministério da Saúde como medida de controle da LV, um diagnóstico de baixo custo e alta confiabilidade se faz necessário para a triagem desses reservatórios. Objetivando evitar o uso de métodos invasivos, o diagnóstico passou a ser focado em métodos sorológicos (Gomes et al., 2008). Além disso, a resposta humoral na LVC é geralmente muito intensa com altos níveis de imunoglobulinas específicas (Alvar et al., 2004). Por esse motivo, diversos métodos sorológicos foram desenvolvidos e são bastante utilizados para diagnóstico canino.

Dentre esses métodos, destaca-se a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Este teste, que utiliza o parasito íntegro como antígeno, é bastante útil em estudos epidemiológicos (Alvar et al., 2004). Entretanto, sua aplicação requer alto nível de habilidade, experiência e também equipamento especializado e de alto custo. Além disso, as diluições seriadas do soro tornam o teste laborioso para triagem com grande número de amostras (Gradoni, 2002). Este teste demonstra sensibilidade que varia de 83 a 100% e especificidade aproximada de 80% para amostras de soro (Harith et al., 1987; Almeida et al., 2005; Lira, 2005). Todavia, o método pode apresentar reações cruzadas principalmente com leishmaniose tegumentar e tripanossomíase americana (Sundar & Rai, 2002; Luciano et al., 2009).

O ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) é bastante utilizado como teste de triagem para LVC. Essa técnica pode ser aplicada para um grande número de amostras em curto espaço de tempo, podendo ser adaptada para o uso com diversos antígenos, como antígenos brutos, sintéticos ou recombinantes (Maia & Campino, 2008). Esse teste comporta inesgotáveis possibilidades de variação. Com a sua introdução, testes de maior complexidade técnica, como a reação de fixação do complemento, caíram em desuso para o diagnóstico da LVC (Grimaldi & Tesh, 1993).

Recentemente, vários antígenos recombinantes de *Leishmania* têm sido testados como ferramentas para melhorar o diagnóstico da LVC. A proteína k39, membro da família das cinesinas, que é bastante conservada entre as espécies viscerotrópicas de *Leishmania* (Burns et al., 2003), tem sido amplamente avaliada sob a forma recombinante (rK39) como antígeno em ELISA. Badaró et al. (1996) demonstraram a utilidade do antígeno rK39 no diagnóstico sorológico da LVC através de ELISA, detectando cães com doença ativa. Scalone et al. (2002), trabalhando com cães provenientes de uma área endêmica ao sul da Itália, obtiveram 97.1% de sensibilidade e 98.8% de especificidade. Santarém et al. (2010) obtiveram 75% de sensibilidade. Entretanto, ao avaliar um grupo de cães assintomáticos, esse percentual caiu para 56.1%.

Segundo Maia & Campino (2008), o uso de antígenos recombinantes de um modo geral aumenta a especificidade de testes diagnósticos se comparado ao uso de antígenos brutos. Antígenos brutos forneceriam especificidade de 87%, enquanto os antígenos recombinantes rK26 e A2 forneceriam especificidades de 90 e 96% respectivamente em testes de ELISA realizados em cães (Porrozzi et al., 2007). Entretanto, dados publicados por Rosário et al. (2005) apresentam resultados bastante similares para ELISA com antígeno bruto (especificidade de 100%) e os recombinantes rK26 (especificidade de 96%) e rK39 (especificidade de 100%) em testes com cães provenientes de Janaúba, Minas Gerais. A limitação do uso de antígenos brutos consiste na ocorrência de reações cruzadas com outras doenças que frequentemente ocorrem em áreas endêmicas para LVC, o que levou à sugestão de que a associação desses antígenos com outros recombinantes é uma estratégia interessante a ser utilizada em programas de controle da doença para melhorar o desempenho global do ensaio (Rosário et al., 2005).

Desse modo, o desempenho do teste de ELISA no diagnóstico da LVC está relacionado não só com o tipo de antígeno utilizado, mas também com o estado clínico do cão em teste. Carvalho et al. (2002) relataram bons resultados utilizando o antígeno recombinante A2 com soros de cães sintomáticos, e também registraram que a ocorrência de reação cruzada com outras patologias (erlichiose e tripanossomíase americana) foi insignificante. Mettler et al. (2005) demonstraram 58% de sensibilidade em cães assintomáticos e 96,7% em sintomáticos, utilizando o antígeno rK39, enquanto com o antígeno solúvel de promastigotas não houve diferença entre sintomáticos e assintomáticos (sensibilidades de 100% em ambos os grupos), assim como no teste em que foi utilizado o antígeno solúvel de amastigotas.

A imunocromatografia como teste diagnóstico possui vários pontos positivos, como a rapidez com que o resultado é indicado, a facilidade de uso e a aplicabilidade em campo (Gradoni, 2002). Para o diagnóstico da LVC, o antígeno rK39 imobilizado em tiras imunocromatográficas foi avaliado por Da Costa et al. (2003), em Minas Gerais, fornecendo sensibilidade entre 94 e 96% e especificidade de 100%, em teste realizado em 50 amostras de soro. Foram observados bons resultados também em ensaios realizados com 104 amostras de soro, que foram testadas com o mesmo antígeno rK39, em outro estudo. Foram obtidos valores de 91,5% de sensibilidade e 94,7% de especificidade (De Lima et al., 2010). O teste DPP®, produzido pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Biomanguinhos, é um bom exemplo de teste imunocromatográfico. Ele reúne dois antígenos recombinantes (rK39 e rK26) imobilizados em uma plataforma cromatográfica. Esse teste apresentou elevada sensibilidade apenas para cães sintomáticos (98%), pois em assintomáticos ela foi de 47% (Grimaldi et al., 2012). Alves et al. (2012) obtiveram valores de sensibilidade de 97,5% em um grupo de cães sem status clínico definido, mas com infecção comprovada através de isolamento em cultura.

Existem também outros métodos utilizados no diagnóstico da LVC. Destaca-se o DAT (*Direct agglutination test*), que consiste no uso de promastigotas íntegras em suspensão como antígeno. Por se tratar de um método barato e simples de ser executado, é bastante aplicável em campo. Mohebbi et al. (2004) obtiveram sensibilidade e especificidade de 70,9 e 84,9%, respectivamente, em testes realizados em cães no Irã. Entretanto, o período de incubação de 18 horas e a necessidade de se fazer diluições seriadas tornam o método laborioso. O método FAST (*fast agglutination screening test*) é bastante parecido com o DAT, diferindo apenas pela maior concentração de parasitas e um menor volume de reação. Por esse motivo, após uma única diluição do soro, o resultado pode ser acessado após 3 horas (Maia & Campino, 2008). Utilizando esse método, Schallig et al. (2002) obtiveram sensibilidade e especificidade de 93,6 e 89% respectivamente, em soros caninos obtidos de diferentes países, dentre eles, Brasil e Turquia.

O diagnóstico molecular, realizado sobretudo pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), baseia-se na amplificação de uma sequência conhecida de oligonucleotídeos específicos do patógeno. Este teste apresenta como vantagem a possibilidade de ser realizado em grande variedade de materiais clínicos, como sangue, aspirados de medula ou linfonodos, biópsias de pele, urina, swab de mucosas, dentre outros (Alvar et al., 2004; Ferreira et al., 2013). Estudos avaliando PCR de diferentes tecidos de cães infectados mostraram resultados variáveis e

conflitantes com relação à sensibilidade (Baneth & Aroch, 2008). Isso pode ser explicado em parte devido à distribuição heterogênea dos parasitos em cada tecido, devido ao tropismo da cepa de *Leishmania* e também devido à resposta imune local (Maia & Campino, 2008). Além disso, a eficácia de um teste de PCR depende de diferentes fatores, tais como os *primers* utilizados, o número de parasitos existentes na amostra, o método de extração do DNA e o protocolo de PCR seguido (Alvar et al., 2004; Baneth & Aroch, 2008).

O método de PCR em tempo real também pode ser utilizado para diagnóstico da LVC. A vantagem apresentada por esse método consiste no monitoramento contínuo da amplificação do DNA do parasito, o que permite a quantificação parasitária em diferentes amostras (Maia & Campino, 2008). Essa técnica permite a quantificação do parasito desde um número mínimo de 0,03 parasitos por reação, o que corresponde a aproximadamente 2fg de DNA (Galletti et al., 2011). Quaresma et al. (2009), em um estudo realizado com 217 cães com sorologia positiva, observaram que a carga parasitária não apresentava diferença significativa entre animais sintomáticos e assintomáticos. Além disso, foi determinado que a carga parasitária obtida de amostras de medula óssea foi mais elevada que aquela obtida de amostras de sangue periférico.

Apesar da grande variedade de métodos diagnósticos disponíveis, os testes sorológicos DPP® e ELISA são os recomendados pelo Ministério da Saúde para a avaliação da soroprevalência em inquéritos caninos. O teste de DPP® é recomendado para a triagem de cães e o ELISA, para a confirmação dos cães reagentes (Secretaria de Estado da Saúde, 2012).

De acordo com a prática realizada no Brasil, em que resultados positivos em testes sorológicos são suficientes para justificar a eutanásia de cães, falhas nesses resultados podem causar a eliminação de um número desconhecido de animais não infectados, e por outro lado, não detectar casos positivos (Moreno & Alvar, 2002; Pinheiro et al., 2009). Assim, apesar da grande variedade de métodos disponíveis para diagnóstico canino, ainda não se dispõe de um método ideal, que seja simultaneamente bastante sensível, específico e de fácil execução.

1.4 - Novos antígenos para diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina

Nos últimos anos, um número crescente de antígenos de *Leishmania* tem sido caracterizado, com o objetivo de constituírem novos candidatos para diagnóstico da LVC. Cândido et al. (2008) investigaram o antígeno purificado FML, uma proteína de 36 kDa presente em todas as formas do ciclo de vida da *Leishmania* e verificaram alta sensibilidade (90%) ao

detectar cães oligossintomáticos, além de especificidade também elevada (93,3%). Pinheiro et al. (2009) investigaram o desempenho da cisteína proteinase recombinante, indicando o uso potencial desse antígeno para o diagnóstico da LVC. Estudos de Coelho et al. (2009) sobre LRPs (*Leishmania species ribosomal proteins*) demonstraram elevada sensibilidade desses antígenos em cães oligossintomáticos e assintomáticos. Santarém et al. (2010), utilizando a proteína recombinante triparedoxina peroxidase citosólica em ELISA, obteve um teste de elevada sensibilidade para soros de cães assintomáticos. Enquanto o ELISA utilizando o antígeno rK39 apresentou 56,1% de sensibilidade, o ELISA com a triparedoxina apresentou 77,2%.

Observa-se então que uma das alternativas que vem sendo utilizada por diferentes pesquisadores como metodologia de produção de antígenos a serem testados em imunodiagnóstico é a produção de proteínas recombinantes, inclusive proteínas quiméricas. Essas quimeras consistem na junção de diferentes fragmentos peptídicos, originando uma proteína artificialmente construída. Dessa maneira, proteínas quiméricas são capazes de expressar diferentes determinantes antigênicos, o que já foi proposto ser responsável por aumentar a sensibilidade de testes diagnósticos (Aguirre et al., 2006; Boarino et al., 2005). Essa abordagem vem sendo utilizada para produção de antígenos a serem empregados no diagnóstico de diferentes patologias, como malária (Garcia et al., 2013), toxoplasmose (Dai et al., 2012), tuberculose (Cheng et al., 2011), doença de Chagas (Camussone et al., 2009), dengue (Tripathi et al., 2007), doença de Lyme (Gomes-Solecki et al., 2000), dentre outras.

Considerando as variadas aplicações descritas de proteínas quiméricas em diagnóstico, observa-se que elas constituem excelentes antígenos a serem utilizados em uma diversidade de ensaios, dentre eles, o ELISA. Para diagnóstico das leishmanioses, existem poucos registros da investigação sobre proteínas quiméricas. Soto et al. (1998) construíram uma quimera composta pelas proteínas ribossomais LP2a, LP2b, LiP0 e pela histona H2A. A sensibilidade variou entre 79% e 93% e a especificidade entre 96% e 100%, em ELISA. Boarino et al. (2005) reuniram epitopos das proteínas imunogênicas K39, K9 e K26 numa única proteína quimérica. A sensibilidade obtida foi de 96%, enquanto a especificidade foi de 99%.

Para a seleção de antígenos para imunodiagnóstico, a abordagem mais tradicional é o uso de *western blotting* (Sevinc et al., 2013; Wawegama et al., 2013; Coelho et al., 2009); no entanto, o desenvolvimento da bioinformática tem contribuído com ferramentas que são utilizadas para mapeamento de epitopos em bancos de dados de genoma e de proteoma, permitindo a seleção de

antígenos *in silico*. Após a seleção, é necessária a validação da antigenicidade dos epitopos que pode ser feita com metodologias *high-throughput*, ou seja, centenas de antígenos são testados simultaneamente em curto espaço de tempo. A associação de bioinformática com tecnologias de DNA recombinante são ferramentas importantes para seleção e teste de novas moléculas que podem contribuir para o avanço no imunodiagnóstico de várias doenças, como a leishmaniose.

1.5–Resposta imune anti-*Leishmania infantum*

Devido ao difícil controle da LVC, vários grupos de pesquisa têm conduzido trabalhos visando o desenvolvimento de antígenos capazes de induzir imunidade protetora contra a doença. Não obstante, o desenvolvimento de vacinas contra a leishmaniose é uma das metas da Organização Mundial de Saúde (<http://www.who.int/tdr/diseases/default.html>).

Para um melhor entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na infecção por *Leishmania*, têm sido utilizados modelos de infecções experimentais com diferentes linhagens de camundongos. Quando esses animais da linhagem C57BL/6 são infectados com *L. major*, eles são capazes de controlar a infecção, sendo esse perfil de resistência associado ao desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1 (Louis et al., 1998). Nessa resposta, a produção da citocina IFN- γ desempenha importante papel, induzindo a síntese de óxido nítrico e, dessa maneira, eliminando o parasito dos macrófagos (Trinchieri et al., 1993). Entretanto, camundongos susceptíveis da linhagem BALB/c, quando infectados por *L. major*, apresentam doença progressiva e visceralizante, sendo essa susceptibilidade associada ao perfil de citocinas do tipo Th2 (Scott & Scharon, 1994; Louis et al., 1998). Nessa situação, as citocinas IL-4 e IL-10 têm ação moduladora, inibindo os efeitos protetores de citocinas da resposta do tipo 1 como IFN- γ (Miralles et al., 1994). Esses são trabalhos clássicos que iniciaram a paradigma Th1/Th2 na resposta à leishmaniose, mas sabemos que ele não pode ser estendido às diferentes espécies de *Leishmania* nos diferentes modelos de infecção.

O modelo murino vem sendo amplamente utilizado em estudos sobre a resposta imune anti-*Leishmania* devido ao fácil manejo, baixo custo, curto tempo de experimentação e grande disponibilidade de reagentes (Garg & Dube, 2006). Neste contexto, este modelo é bastante útil na triagem de candidatos vacinais, já que a utilização do cão como modelo apresenta dificuldades

devido ao elevado custo de manutenção, a pouca disponibilidade de reagentes e ao longo período de experimentação (Reis et al., 2010).

Sobre a resposta imune humoral em LV no modelo murino, diferentes estudos mostram que a presença de linfócitos B e de anticorpos contribuem para a morbidade da doença, através da produção de IL-10 e de imunoglobulinas das classes IgG e IgM (Deak et al., 2010; Ronet et al., 2010). Alguns autores associam a presença de determinado subtipos de IgG aos perfis de resposta do tipo 1 ou 2, visando determinar marcadores sorológicos de proteção ou progressão da doença. Assim, Alexander & Brombacher (2012) sugerem que a resposta do tipo 1 está correlacionada com a produção de IgG2a e IgG2b e que a presença de IgE e IgG1 está ligada a uma resposta tipo 2.

Em comparação ao modelo murino, o conhecimento dos mecanismos envolvidos na resposta imune em cães ainda é limitado. Entretanto, sabe-se que a divisão de respostas Th1 e Th2 não é tão clara, com a presença simultânea de IFN- γ e IL-10 (Chamizo et al., 2005; Lage et al., 2007). Além disso, a citocina IL-4 parece estar relacionada à susceptibilidade na LVC. Corroborando essa hipótese, Quinnell et al. (2001) avaliaram o perfil de citocinas em aspirado de medula óssea de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* e observaram que cães sintomáticos apresentavam maiores níveis de IL-4.

Segundo Gradoni (2001), um candidato em potencial para uma vacina contra leishmaniose visceral canina deve favorecer o desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th1, pois a resistência do hospedeiro está associada com esse padrão de diferenciação, com secreção de um padrão de citocinas específicas, entre elas, IFN- γ .

Atualmente, várias abordagens tem sido utilizadas para o desenvolvimento de vacinas anti-*L. infantum*. Utilizando antígenos brutos, a vacina denominada LBSap, que é composta por *L. braziliensis* associada a saponina, tem sido bastante estudada. Após o desafio experimental por *L. chagasi*, os cães vacinados apresentaram um perfil de ativação linfocitária relacionada ao fenótipo de resistência, com aumento da expressão de IFN- γ e redução de 54% no parasitismo esplênico (Roatt et al., 2012). Utilizando a abordagem das proteínas recombinantes, Martins et al. (2013) obtiveram bons resultados com uma proteína hipotética de *L. infantum* que, ao ser utilizada como imunógeno, induziu o desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1 em camundongos. Utilizando uma vacina viva com a espécie não patogênica *L. tarentolae* como vetor de antígenos de *Leishmania*, Saljoughian et al. (2013) obtiveram bons resultados em camundongos após

desafio com *L. infantum*. Foram observados elevados níveis de IFN- γ e baixos níveis de IL-10. Sob a abordagem das vacinas de DNA, Aguilar-Be et al. (2005) induziram uma resposta protetora em camundongos BALB/c ao imunizá-los com vacina de DNA que codifica uma hidrolase de 36 kDa. Houve alta produção de IFN- γ após desafio com *L. infantum*, além da redução da carga parasitária em 79%.

Sobre a abordagem vacinal utilizando proteínas quiméricas, pouco se encontra na literatura. Molano et al. (2003) obtiveram bons resultados ao testar uma proteína quimérica resultante dos fragmentos de 4 proteínas de *Leishmania*, associada ao BCG. Testada em cães, essa vacina conferiu proteção de 90% contra infecção experimental com *L. infantum*. Poot et al. (2009) testaram a mesma proteína quimérica citada anteriormente, mas com outros 4 adjuvantes substituindo o BCG. A proteção contra infecção não foi obtida em nenhum esquema vacinal, levando a crer que o BCG, que é uma adjuvante não recomendado para uso canino, tenha sido responsável pela proteção observada por Molano et al. (2003). Entretanto, Carcelén et al. (2009) estabeleceram o efeito protetor da vacinação com a proteína quimérica em questão, na ausência de adjuvantes, em dose única.

Dessa forma, observa-se que os antígenos mais promissores para testes de vacinação na infecção por *L. infantum* demonstram ser aqueles que induzem mais fortemente uma resposta Th1, que apesar de não ser exclusiva, é muito importante na resistência à infecção em diferentes modelos experimentais. O teste de ativação da resposta celular e o padrão de citocinas estimuladas é um importante ponto de início para avaliação de antígenos potenciais candidatos a testes de vacinação.

2– JUSTIFICATIVA

Os avanços na área de química de proteínas revolucionaram o campo de desenvolvimento de testes diagnósticos e de vacinas. O uso das novas tecnologias de construção de genes sintéticos e de produção de proteínas recombinantes quiméricas facilita a produção e a caracterização protéica e ainda permite a produção de grandes quantidades de antígenos em laboratório.

Durante os últimos anos, nosso grupo vem desenvolvendo um estudo proteômico de *L. infantum* (cepa MCAN/BR/2000/BH400) para a identificação de novos antígenos com uso potencial em diagnóstico e vacina para LVC. Inicialmente, foi realizado *western blotting* utilizando extrato protéico de promastigotas fracionadas por eletroforese bidimensional, além de soros de cães infectados e não infectados por *L. infantum*. Após a análise, excluindo as proteínas reconhecidas de forma inespecífica por soro de cães não infectados, aquelas reconhecidas somente por cães infectados foram retiradas do gel, analisadas por espectrometria de massa e identificadas (Costa et al., 2011). Isso gerou uma lista com mais de 40 proteínas, que foram analisadas *in silico* para predição de epitopos para células B. Desse modo, 360 peptídeos foram identificados e avaliados em imun ensaios com membranas de celulose. Os dez melhores epitopos foram sintetizados e testados em ELISA para diagnóstico canino. Esses peptídeos, provenientes de 9 diferentes proteínas de *L. infantum*, foram descritos pelo nosso grupo como promissores antígenos no diagnóstico da LVC (Faria et al., 2011). A mistura dos peptídeos em uma única solução também forneceu bons resultados, conforme publicado no mesmo trabalho. Isso nos encorajou a desenvolver uma proteína recombinante quimérica, reunindo todos esses dez peptídeos em um mesmo gene.

Paralelamente, houve o interesse de produzir uma segunda proteína recombinante quimérica a partir de outros peptídeos também descritos pelo nosso grupo. Esses peptídeos apresentavam duas características investigadas em análises *in silico* (computacionais) em programas para predição de epitopos para células T: a) alta probabilidade de serem apresentados para MHC classe I e b) possibilidade de serem apresentados simultaneamente a diversos haplótipos de MHC (Costa et al., 2011). Os vinte peptídeos que se encaixavam nessas prerrogativas com maior *score* foram reunidos em um único gene no presente trabalho. O gene resultante da união dos 20 peptídeos investigados por Costa et al. (2011), aqui denominado PQ20, foi também submetido à predição *in silico* de epitopos para células B. Interessantemente, a PQ20

demonstrou possuir também diversos epitopos potencialmente antigênicos: 52% da estrutura é composta por epitopos de células B com *score* acima de 0,8 [dados não publicados]. Isso nos encorajou a realizar a validação da predição *in silico* no presente trabalho, testando ambas as proteínas em imunodiagnóstico da LVC e também caracterizando esses antígenos quanto à indução de resposta humoral e celular.

Tendo em vista todas as informações referentes à escassez de testes diagnósticos 100% eficientes para LVC e também a necessidade de vacinas comprovadamente eficazes e que não induzam a virada sorológica, torna-se necessária a busca por novos alvos diagnósticos e vacinais. Além disso, a detecção de cães assintomáticos e também daqueles que se encontram na fase inicial da infecção representam um importante elo da cadeia epidemiológica da LV (Costa et al., 2013b). Desse modo, a utilização de técnicas que permitem a produção de quimeras recombinantes mostra-se um caminho viável a ser explorado para obter antígenos com esses intuitos. É de extrema relevância o desenvolvimento de testes utilizando antígenos alternativos com elevadas especificidade e sensibilidade, capazes de fornecer um diagnóstico mais confiável, que possibilite identificar corretamente cães infectados. Além disso, em adição ao potencial diagnóstico desses antígenos, pode haver associação de resposta protetora, o que os torna potenciais candidatos vacinais (Coelho et al., 2012). Dessa forma, o desenvolvimento de novos antígenos objetiva contribuir para o controle da leishmaniose visceral.

3 – OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Produzir e avaliar duas proteínas quiméricas quanto à imunogenicidade e uso em imunodiagnóstico para leishmaniose visceral canina.

3.2 - Objetivos específicos

- Produzir duas proteínas quiméricas através da técnica do DNA recombinante;
- Padronizar e validar o ELISA com as proteínas quiméricas para o diagnóstico da LVC;
- Avaliar a capacidade das proteínas quiméricas em detectar o início da infecção por *L. infantum* em cães;
- Avaliar o estímulo da resposta imune humoral e identificar quais os peptídeos, que compõem as proteínas, contribuem para a produção de anticorpos;
- Avaliar o estímulo da resposta imune celular em cães naturalmente infectados e em camundongos BALB/c imunizados.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS

A partir de duas publicações do nosso grupo de pesquisa, Costa et al. (2011) e Faria et al. (2011), foram idealizadas duas proteínas quiméricas reunindo os diferentes peptídeos descritos pelos trabalhos supracitados. Essas proteínas foram construídas pelo intermédio de genes sintéticos.

4.1.1) DESENHO DOS GENES SINTÉTICOS

A união da sequência dos dez peptídeos publicados por Faria et al. (2011) e também a união dos vinte peptídeos publicados por Costa et al. (2011) resultou na construção de dois genes quiméricos, denominados PQ10 e PQ20. Essa nomenclatura foi derivada do número de peptídeos que compõe as proteínas quiméricas, aqui abreviadas como PQ. Em ambas as estruturas foram inseridos os aminoácidos glicina e serina, alternadamente, para atuarem como ligantes entre os peptídeos. Essa ligação confere flexibilidade às estruturas, conforme descrito por Dipti et al. (2006). Foram também inseridos na sequência artificial, códons de início e de parada, e também uma cauda de histidina, com 6 resíduos desse aminoácido. Sítio de restrição para as enzimas *NdeI* e *NotI* foram incluídos, para facilitar a posterior clivagem desse gene.

Após a montagem *in silico* da estrutura artificial desses genes, foi realizada a otimização de códons através do site <http://gcu.schoedl.de>. Esse processo, também realizado *in silico*, visou adequar as trincas de nucleotídeos para as sequências preferencialmente empregadas na tradução de *Escherichia coli*, organismo em que os genes foram inseridos.

4.1.2) CLONAGEM

Os genes quiméricos foram produzidos industrialmente (GenScript™), no plasmídeo pUC57 (Anexo 9.1) cujo gene de resistência é referente a ampicilina. Esse plasmídeo foi inserido em *Escherichia coli*, cepa DH5 α termocompetente. Após a clonagem e a semeadura em meio LB [Tryptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%] com ampicilina (Gibco™), foi feita a

extração do plasmídeo com o kit Qiagen Plasmid Mini. Devido aos sítios de restrição que foram inseridos nas extremidades do gene sintético, referentes às enzimas *NdeI* e *NotI*, foi possível realizar a digestão do plasmídeo extraído, a 37° C por 16-18h. Após a verificação, sob luz UV, das bandas específicas dos genes quiméricos em gel de agarose a 1% [120 g de agarose, 120 mL de TBE (10,8 g/L Tris base, 5,5 g/L ácido bórico, 4,0 mL/L EDTA 0,5 M pH8,0 e água qsp 1L) e 6 µL de brometo de etídio a 10 mg/mL], foi realizada a excisão das bandas e a sua purificação pelo kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), seguindo instruções do fabricante.

Foi realizada, posteriormente, a inserção dos genes quiméricos purificados em outro plasmídeo (pET9a24a – Anexo 9.1) através da reação com a enzima ligase, realizada a 4° C por 16-18h. Esse plasmídeo possui gene de resistência à kanamicina e é adequado para expressão protéica. Após a ligação do gene quimérico ao plasmídeo, o produto foi inserido em *E. coli* DH5α termocompetente, através de nova transformação.

Após plaqueamento em meio LB com kanamicina (Sigma-Aldrich®), a identificação dos clones que continham o gene quimérico foi realizada através de reação de PCR de colônia. Utilizando *primers* específicos para sequências contíguas ao sítio de clonagem do plasmídeo pET9a24a (5'- GTGGCGCCGGTGATGCCGGC - 3' e 5'- GCGGTGGCAGCAGCCAACTC - 3'), foi realizada a amplificação, que confirmou quais colônias incorporaram adequadamente o vetor.

As colônias positivas foram então isoladas e tiveram os plasmídeos extraídos pelo kit Qiagen Plasmid Mini. Após o sequenciamento das amostras, foi realizada a transformação dos plasmídeos em *E. coli* termocompetente, pertencente à cepa C41, que é adequada à expressão.

4.1.3) EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO

Inicialmente, foi necessário verificar se as proteínas expressas iriam se localizar na fase solúvel ou insolúvel da cultura bacteriana. As colônias foram colocadas para crescer em 25 mL de meio LB com kanamicina (Sigma-Aldrich®), a 37° C, sob agitação. Após o alcance da densidade óptica ideal (entre 0,6 e 1,0), foi realizada a indução com IPTG (concentração final de 0,4 mM). Após 4 horas de indução a 37° C, sob agitação, a expressão das proteínas codificadas pelos genes sintéticos foi interrompida, retirando-se as culturas do agitador aquecido.

As frações solúveis e insolúveis da cultura bacteriana foram separadas por centrifugação a 3000 rpm por 30 minutos a 4°C e foram posteriormente analisadas em gel de poliacrilamida a 12% [gel principal: Acrilamida-Bisacrilamida 30%, Tris 1,5M, SDS 10%, APS 10%, TEMED 0,1%; gel stack: Acrilamida-Bisacrilamida 30%, Tris 0,5M, SDS 10%, APS 10%, TEMED 0,1%]. Nesse gel, corado posteriormente por Coomassie segundo Neuhoff et al. (2005), foram avaliadas amostras das frações solúveis e insolúveis.

A expressão em larga escala foi realizada em 500mL de meio LB com kanamicina, a 37° C, sob agitação. Após o alcance da densidade óptica ideal (entre 0,6 e 1,0), foi acrescentado o IPTG (concentração final de 0,4 mM) e a indução foi realizada por 4h, a 37° C, sob agitação. A amostra foi centrifugada a 3000 rpm, por 30 minutos, a 4°C e o sedimento foi separado. Esse sedimento foi posteriormente ressuspensionado em tampão de lise [50mMTris-HCl, 1mM EDTA, 50mM NaCl] para ser lisado mecanicamente no homogeneizador EmulsiFlex™ C3, utilizando picos de pressão entre 15000 e 20000 psi. Após 5 ciclos de lise, a amostra foi coletada do homogeneizador. Posteriormente, ela foi centrifugada a 14000 rpm, por 20 min, a 4° C e o sedimento foi lavado em tampão de lavagem [100mM fosfato de sódio, 0,5M NaCl, 1mM β-mercaptoetanol, 0,5% Triton X-100] e centrifugado nas mesmas condições. O novo sedimento foi solubilizado em tampão de solubilização [20mM fosfato de sódio, 0,5M NaCl, 10 mM imidazol, 8M uréia, 1mM β-mercaptoetanol], incubado a temperatura ambiente por 10 horas, e centrifugado a 12000 rpm, por 30 min, a 4° C. O sobrenadante foi coletado para posterior purificação.

A purificação das proteínas quiméricas (PQ10 e PQ20) foi realizada utilizando a cromatografia líquida de alta performance, através de coluna de troca iônica, o que só foi possível devido à cauda de histidina inserida no gene sintético. Foi utilizada a coluna de

spharose-níquel HisTrap™ acoplada ao cromatógrafo AKTA™ Prime Plus (GE Healthcare). Para a eluição da amostra, foram utilizados os tampões de ligação [20mM fosfato de sódio; 0,5M de NaCl; 8M de uréia; e 1mM de β- mercaptoetanol] e de eluição [20mM fosfato de sódio; 0,5M de NaCl; 0,5M de imidazol; 8M de uréia; 1mM de β- mercaptoetanol].

Todas as etapas descritas para a obtenção das proteínas purificadas, desde a clonagem, foram representadas no fluxograma da Figura 1.

Alíquotas das proteínas purificadas (10 µg) foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 12% [composição igual à já descrita nesse mesmo item], que foi transferido para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Hybond™, poro 0,2µm – GE healthcare) a 30V, por 50 min, em tampão de transferência [Tris 0,3%, Glicina 1,4%, metanol 20%]. Foi realizado *western blotting* utilizando o kit Western Breeze™ Chromogenic Western Blot Immunodetection (Life™), seguindo instruções do fabricante, para confirmação da expressão das proteínas. Brevemente, a membrana foi bloqueada por 1h com a solução de bloqueio fornecida. Após duas lavagens com a solução de lavagem fornecida, a membrana foi incubada por 1 h com o anticorpo de camundongo anti-cauda de histidina, diluído em solução de bloqueio a 1:2000. Após 3 lavagens, foi realizada a incubação com o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina, pronto para uso, fornecido pelo kit. Após 3 lavagens, a revelação foi realizada com o substrato cromogênico fornecido (solução de NBT/BCIP pronta para uso). Após 20 minutos, a membrana foi lavada com água.

As proteínas purificadas pelo cromatógrafo foram coletadas em tampão de eluição (0,5M de NaCl, 0,5M de imidazol, 8M de uréia e 1mM de β- mercaptoetanol), cujos sais deveriam ser eliminados da amostra. A amostra foi, portanto, colocada dentro de membrana de diálise com poro de 12400 Da (Sigma-Aldrich®). No primeiro dia, as membranas foram colocadas em água Milli-Q, efetuando a troca dessa água após 4 horas. No final do dia, a água foi trocada por PBS 0,15M [KH₂PO₄ 0,2g; Na₂HPO₄ 5,0g; NaCl 4,2g; H₂O qsp 500 mL], que foi deixado de 16-18h em contato com a membrana. No segundo dia, o PBS foi trocado e deixado em contato com a membrana por 8 h. As amostras foram, então, liofilizadas em aparelho Liotop, modelo K105, por 24h.

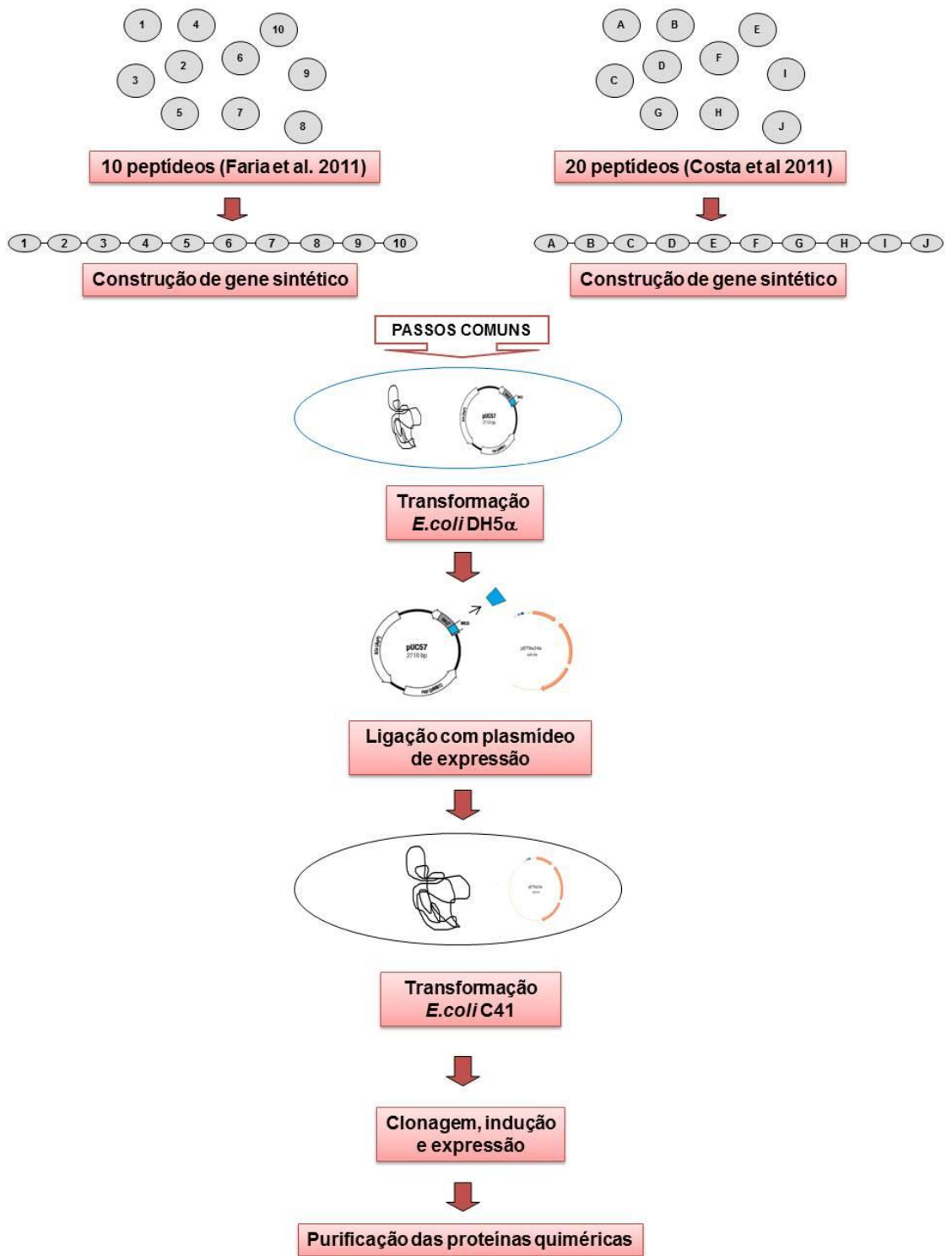


Figura 1: Fluxograma da produção das proteínas quiméricas

4.2 – ELISA

4.2.1) PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA

Inicialmente, foram testadas as melhores condições do antígeno (dialisado ou não dialisado) bem como o melhor diluente utilizado para a sensibilização das placas. Para isso, placas das marcas BD Falcon® e Eppendorf® foram sensibilizadas com as proteínas quiméricas diluídas em PBS pH 7,4 [NaCl 8g; KCl 0,2g; Na₂HPO₄ 1,4g; KH₂PO₄ 0,2g; H₂O qsp 1L] e também diluídas em tampão bicarbonato pH 9,6 [Na₂CO₃ 1,5g; NaHCO₃ 2,9g; H₂O qsp 1L] na concentração de 2,0 µg/mL. A sensibilização das placas ocorreu por 16-18 horas, a 37° C (quando era usado PBS) e a 4° C (quando era usado tampão bicarbonato).

Posteriormente, foram otimizadas as melhores concentrações do antígeno e também de soros e conjugados para a realização do imunoenensaio. Foram feitas sensibilizações das placas com as concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 µg/mL. Essas placas foram incubadas com *pools* de soros de cães infectados por *L. infantum* e não infectados, em diferentes diluições (1/40, 1/100, 1/200, 1/400). A ligação dos anticorpos foi detectada usando anti-IgG canino marcado com peroxidase (Sigma-Aldrich®) em diferentes diluições (1/500, 1/1000, 1/2000, 1/2500, 1/5000).

Em todos os ensaios, foi realizado o bloqueio com solução de PBS com 5% de leite em pó desnatado e 0,5% de Tween 20, por 1 hora a 37° C. Soros e conjugados foram diluídos em PBS pH 7,4 acrescido de 0,5% de leite em pó desnatado e 0,5% de Tween 20, com incubação por 1 hora, a 37° C. As lavagens, após cada etapa de incubação, foram realizadas 3 vezes com solução de lavagem (PBS pH 7,4 e 0,05% de Tween 20) e as placas secas por inversão em papel absorvente. Posteriormente à adição de solução cromógena, obtida pela solubilização de tabletes contendo OPD e peróxido de hidrogênio (SIGMAFAST® OPD TABLETS, Sigma-Aldrich®), foi realizada a incubação das placas por 30 minutos, no escuro, fazendo-se a interrupção da reação com o acréscimo de solução de ácido sulfúrico a 4N. Em seguida, foi feita a leitura em espectrofotômetro em 492nm (MultiskanGo™ ThermoScientific).

4.2.2) TESTES INICIAIS

Os ensaios subsequentes foram realizados com as melhores condições obtidas na padronização.

Um pequeno painel de amostras foi testado inicialmente. Esse painel foi composto por 9 amostras de soro de cães não infectados por *Leishmania infantum*, provenientes de Belo Horizonte, com resultados negativos para ELISA com antígeno bruto, RIFI e PCR. Também foram testadas 98 amostras com resultados positivos para ELISA com antígeno bruto e RIFI, também provenientes de Belo Horizonte.

Além disso, foram realizados testes em paralelo com as proteínas quiméricas, DPP® e ELISA Biomanguinhos para comparação dos resultados. Nesse ensaio, foram utilizados 9 amostras de soro de cães não infectados por *Leishmania infantum*, com resultados negativos para ELISA com antígeno bruto, RIFI e PCR. Também foram testadas 10 amostras provenientes de cães naturalmente infectados (positivos em RIFI e PCR) e assintomáticos, além de 33 amostras de cães naturalmente infectados (positivos em RIFI e PCR), mas sem *status* clínico definido.

4.2.3)VALIDAÇÃO DOS ANTÍGENOS

O cálculo do número mínimo de amostras foi realizado com o auxílio do programa OpenEpi, versão 3.01 (www.openepi.com), considerando os resultados obtidos nos ensaios preliminares com os antígenos propostos. Consideramos a sensibilidade de 91,8% e a especificidade de 88,8% dos antígenos. Assim, foram usados os seguintes parâmetros para determinar a quantidade de soros positivos e negativos para validação:

(i) Sensibilidade esperada de 91.8%

Erro α = 5%

Precisão na estimativa= 5%

Amostra: 122 cães positivos

(ii) Especificidade = 88,8%

Erro α = 5%

Precisão na estimativa= 5%

Amostra: 131 cães negativos

O ELISA foi validado em ensaio multicêntrico utilizando um amplo painel de amostras caninas. Todos os soros testados possuíam dupla sorologia concordante (RIFI e ELISA com antígeno bruto) para comprovar o diagnóstico do cão. Entretanto, além da dupla sorologia, alguns subgrupos possuíam outro teste confirmatório concordante, conforme descrito abaixo:

Soros caninos negativos (n=131)

Subgrupo N1: Possuíam a dupla sorologia negativa e eram provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte – MG (n=69),

Subgrupo N2: Além da dupla sorologia negativa, esses soros eram provenientes de cães nascidos e criados em canil telado, em Ouro Preto –MG (n=40), gentilmente cedidos pelo Prof. Alexandre Barbosa Reis (NUPEB/UFOP)

Subgrupo N3: Além da dupla sorologia negativa, esses soros possuíam resultado negativo por PCR e eram provenientes de cães de Belo Horizonte – MG (n=22) gentilmente cedidos pela Prof. Maria Norma Melo (Departamento de Parasitologia/ICB/UFMG).

Soros caninos positivos (n=253)

Subgrupo P1: Possuíam dupla sorologia positiva e eram provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte – MG (n=122).

Subgrupo P2: Além da dupla sorologia positiva, esses soros possuíam resultado positivo por DPP e eram provenientes de cães de Teresina – PI (n=87).

Subgrupo P3: Além da dupla sorologia positiva, esses soros possuíam resultado positivo por PCR e eram provenientes de cães de Belo Horizonte – MG (n=22), gentilmente cedidos pela Prof. Maria Norma Melo (Departamento de Parasitologia/ICB/UFMG).

Após os ensaios de validação com as proteínas quiméricas, muitas amostras positivas foram classificadas como negativas pelas proteínas. Para uma melhor investigação, essas amostras foram testadas por outras duas técnicas: pelo teste imunocromatográfico Kalazar Detect®, e também pela RIFI, com titulação total desses soros.

O teste Kalazar Detect® foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, foram adicionados 20 µl de soro canino na tira imunocromatográfica. Em seguida, foram adicionadas 3 gotas do tampão fornecido pelo teste. Após aguardar 10 minutos, o

resultado foi interpretado visualmente, de acordo com as bandas avermelhadas que se tornam visíveis na tira. Um teste positivo possui 2 bandas visíveis, enquanto um teste negativo possui apenas uma banda visível.

A RIFI foi realizada com o antígeno bruto de *L.infantum* preparado no Laboratório de Leishmanioses/UFMG. Os soros foram diluídos em PBS [fórmula já descrita] a 1:40, 1:80, 1:160, e assim sucessivamente, fazendo diluições seriadas, com fator 2. As lâminas contendo as formas promastigotas fixadas foram incubadas com os soros caninos diluídos, por 30 min, a 37° C, em câmara úmida. Após lavagem da lâmina com PBS, as mesmas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG canino conjugado com isotiocianato de fluoresceína (Sigma-Aldrich®) em azul de Evans a 1:10000, por 30 min, a 37° C, em câmara úmida. Após 3 lavagens com PBS, foi acrescentada sobre a lâmina glicerina tamponada em pH 8,5 e foi colocada lamínula. As lâminas foram interpretadas com o auxílio de microscópio imunofluorescência, usando objetiva de 40 X. Em reações positivas, os parasitas apresentaram fluorescência esverdeada distribuída por toda a sua superfície. Foi verificado até qual diluição dos soros caninos poderia ser observada essa fluorescência, obtendo então o título de positividade. As reações negativas caracterizaram-se pela visualização dos parasitos levemente esverdeados ou mesmo avermelhados. Soros sabidamente positivos e negativos da soroteca do laboratório foram utilizados como controles positivos e negativos da reação.

Todos os testes foram realizados no Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG.

4.2.4) AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE DETECÇÃO DA LVC EM FASE INICIAL

Para avaliar a capacidade das proteínas quiméricas detectarem a LVC ainda no início da infecção, foram testadas inicialmente 9 amostras de soro de cães da raça Beagle, que foram infectados experimentalmente com 5×10^7 promastigotas de *L. infantum*. Esses cães tiveram amostras de sangue coletadas entre 3 e 18 meses após a infecção e foram gentilmente cedidas pelo Prof. Ricardo Fujiwara (Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG). Com essas mesmas amostras, foram realizados também os ensaios RIFI e ELISA Biomanguinhos.

Em seguida, foram realizados ensaios complementares, com um amplo painel de amostras. Oitenta amostras de uma coorte, que foi avaliada e acompanhada por 18 meses por Coura-Vital et

al. (2013), foram testadas com as proteínas quiméricas. Esses cães tiveram seus soros coletados no início da coorte (tempo 0), após 12 meses e após 18 meses, totalizando 3 coletas diferentes, e foram testados por PCR RFLP e ELISA Biomanguinhos. Coura-Vital et al., (2013) consideraram a PCR como padrão-ouro para detecção da infecção e, assim, foi possível dividir as amostras em dois grupos: no primeiro, os cães possuíam resultado da PCR negativo na primeira coleta, mas se tornavam positivos ao longo da análise (n=42); já no segundo grupo, os cães já possuíam resultado positivo de PCR na primeira coleta (n=38), que poderia perdurar após 18 meses, ou esses cães poderiam apresentar cura espontânea. Ao realizar em paralelo os testes de PCR, ELISA Biomanguinhos, e ELISA-PQs, nosso objetivo foi determinar se a infecção poderia ser detectada pelas PQs tão precocemente quanto pela PCR, ou seja, se essas proteínas poderiam detectar a LVC no início da infecção, antes da positividade pelo ELISA Biomanguinhos.

4.2.5) AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE REAÇÕES CRUZADAS

Para avaliar a ocorrência de reações cruzadas nos ensaios com as PQs, foram utilizados soros de cães infectados com as patologias que comumente ocasionam falso-positivos. Dezesesseis amostras de cães experimentalmente infectados com *L. braziliensis* foram incluídas na análise, além de 8 amostras de cães naturalmente infectados por *Babesia canis*. Para verificar a chance de haver coinfeção com *Leishmania*, foi realizada RIFI com promastigotas *L. infantum* [protocolo descrito no item 4.2.3], apresentando resultado negativo.

4.2.6) AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO

O ponto de corte para todos os ensaios foi definido através da construção da *receiver operating characteristic curve* - curva ROC utilizando-se o programa estatístico GraphPadPrism versão 5.0. A curva ROC consiste na representação gráfica da sensibilidade (verdadeiro-positivo) no eixo vertical, e o complemento da especificidade (taxa de falso-positivo) no eixo horizontal, para diferentes pontos de corte do teste diagnóstico avaliado (Greiner et al., 2000). Cada ponto no gráfico representa os valores dos referidos índices, em diferentes pontos de corte, determinando assim a área sob a curva - AUC. A AUC é o indicador de acurácia global do teste. Quanto maior a AUC, o que significa ser mais próximo de 1, melhor é o desempenho do método avaliado.

Conforme sugere Swets (1988), em função do valor da AUC podemos classificar o teste de diagnóstico como: sem valor ($AUC=0,5$), de baixa acurácia ($0,5 < AUC \leq 0,7$), de moderada acurácia ($0,7 < AUC \leq 0,9$), de elevada acurácia ($0,9 < AUC < 1,0$) e como teste perfeito ($AUC=1$). A curva ROC, além de indicar a acurácia do teste, permitiu identificar com precisão o ponto de corte associado ao menor número de resultados errôneos do teste.

Para avaliar o desempenho dos antígenos, foram utilizados os índices de acurácia global do teste e também de sensibilidade e especificidade (para um ponto de corte determinado). Além disso, foi realizado o teste *t* pareado, para verificar a diferença estatisticamente significativa entre dois grupos testados, considerando a significância de $p < 0,05$.

Foi avaliada a reprodutibilidade dos testes imunoenzimáticos com as PQs. Para tanto, aproximadamente 10% do total de amostras utilizadas na validação (11,2%) foram testadas novamente com as proteínas, em um ensaio isolado, após 15 meses. Foram avaliados os índices de concordância de ambos os ensaios.

A concordância entre os testes sorológicos e a reprodutibilidade foi determinada pelo índice de kappa ponderado e interpretada de acordo com Landis & Kock (1977): $k < 0,2$, insignificante; $k=0,21$ a $0,40$, fraca; $k=0,41$ a $0,60$, moderada; $k=0,61$ a $0,80$, boa; e $k=0,81$ a $1,00$, excelente.

4.3 – VERIFICAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS

4.3.1) RESPOSTA IMUNE HUMORAL

4.3.1.1) RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM COELHOS

4.3.1.1.a) IMUNIZAÇÃO

Para cada proteína, foi utilizado um coelho adulto, macho, da raça Nova Zelândia, adquiridos da Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa, em Igarapé, Minas Gerais. Antes da primeira inoculação, foi retirada uma amostra de sangue como controle pré-imune (T0), por punção venosa na orelha dos animais. Os procedimentos foram realizados em conformidade com

o Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo obtido aprovação sob o número de protocolo 161 / 2013.

O soro policlonal de coelhos foi obtido pela inoculação da solução de 200 µg de proteína liofilizada em PBS 0.15M [protocolo descrito no item 4.1.3], adicionado ao adjuvante completo de Freund, por via subcutânea, na primeira imunização. A aplicação foi dividida em 3 pontos no dorso dos animais. Quinze dias após a primeira imunização, foi coletada amostra de sangue (T1) e foi realizada a segunda imunização nos moldes da primeira, com a diferença de que o adjuvante utilizado foi o Incompleto de Freund. Isso foi aplicável a todas as imunizações subsequentes. Quinze dias após a segunda imunização, foi coletada outra amostra de sangue (T2) e foi realizada a terceira imunização. Dessa maneira, sempre com intervalos de 15 dias, foram realizadas no total 5 imunizações com as proteínas quiméricas, em animais diferentes. Uma semana após a última imunização, foi realizada a sangria dos animais por punção cardíaca na qual foram coletados 60 mL de sangue, o que foi denominado de T6 (Rezende et al., 2011).

Todas as amostras foram centrifugadas logo após a coleta para obtenção do soro, que foi titulado em ELISA para avaliar e monitorar a eficiência da imunização. Placas foram sensibilizadas com as PQs a 5µg/mL diluídas em tampão bicarbonato [protocolo descrito no item 4.2.1] por 16-18h, a 4° C. Após bloqueio com solução de PBS com 5% de leite desnatado, por 1h a 37° C, algumas diluições (a partir de 1:200, diluídos em fator 2 até 1:12800) de todas as amostras coletadas de soros dos coelhos (T0 até T6) foram acrescentadas à placa, e incubadas por 1h, a 37° C. Após 3 lavagem com PBS/T, foi realizada a incubação por 1h, a 37° C, com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (Life Technologies™) diluído a 1:60000. Após 3 lavagens com PBS/T, as placas foram reveladas com OPD (SIGMAFAST® OPD TABLETS, Sigma-Aldrich®) e lidas em espectrofotômetro em 492nm (MultiskanGo™ ThermoScientific). Desse modo, foi verificado até qual diluição do soro foi detectada densidade óptica acima do ponto de corte, obtido através da média somada a três desvios-padrão da absorbância do soro não imune (T0).

4.3.1.1.b) WESTERN BLOTTING

O soropoliclonal de coelho foi testado em *western blotting* para verificação da imunogenicidade das proteínas. Foram feitos géis de poli(acrilamida) a 12% [protocolo descrito no

item 4.1.3], no qual foram aplicados 1µg das proteínas por canaleta. Esses géis foram, posteriormente, transferidos para membranas de nitrocelulose (Amersham Hybond™, poro 0,2 µm – GE healthcare) sob as condições descritas no item 4.1.3.

As membranas foram incubadas com tampão de bloqueio (PBS1X, Tween 0,1% e leite desnatado 5%) a 4° C por 16-18 horas. As diluições ideais do soro dos coelhos (T0 e T6), bem como do conjugado anti-IgG de coelho marcado com peroxidase foram padronizadas [dados não mostrados]. As melhores diluições (soro a 1:400 e conjugado a 1:30000) foram empregadas nos ensaios subsequentes. Soros e conjugados foram diluídos em tampão de bloqueio e foram incubados com as membranas por 1 hora em temperatura ambiente. Após 3 lavagens com PBS/Tween 0,5%, as membranas foram reveladas colorimetricamente, com H₂O₂ (Synth), diaminobenzidina (Sigma-Aldrich®) e cloronaftol (Sigma-Aldrich®).

4.3.1.1.c) ELISA (PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS)

Para investigar quais peptídeos tiveram maior influência sobre a imunogenicidade das proteínas quiméricas para produção de anticorpos em coelhos, foi realizado um ensaio imunoenzimático, no qual placas foram sensibilizadas com os 10 peptídeos que compõem a PQ10 e também os 20 peptídeos que compõem a PQ20, a 20ug/mL em PBS, overnight a 37° C (Faria et al., 2011). Cada um dos peptídeos foi incubado com o soro de coelho denominado T0 e também o soro denominado T6, para verificação da diferença das absorbâncias. Os ensaios foram realizados nas mesmas condições descritas pelo item 4.2.1, exceto pela diluição do soro do coelho, que foi de 1:200 e também do anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, que foi de 1:8000.

4.3.1.2) RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM CAMUNDONGOS

4.3.1.2.a) ELISA IgG

Esse trabalho foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG) sob o protocolo 161/2013, obtendo a aprovação desse órgão. Trinta e seis camundongos BALB/c fêmeas, com idade entre 6 e 8 semanas, foram inoculados utilizando-se de 3 doses em intervalos de 15 dias entre elas, segundo o esquema descrito na Figura 2. Apenas na primeira dose, foi

utilizado o Adjuvante Completo de Freund e a inoculação ocorreu na base da cauda, de modo subcutâneo, enquanto nas doses subsequentes foi utilizado o Adjuvante Incompleto de Freund inoculado de modo intraperitoneal.

Foram utilizados 6 grupos de animais: no primeiro grupo, os 6 camundongos foram inoculados apenas com PBS; já no segundo, a imunização foi realizada apenas com a PQ10; no terceiro grupo, a imunização ocorreu com a PQ10 associada ao adjuvante de Freund; no quarto grupo, a PQ20 foi aplicada; no quinto grupo, a PQ20 foi aplicada associada ao adjuvante de Freund; e por último, na sexto grupo, apenas esse adjuvante foi aplicado (Tabela 1). As proteínas quiméricas eram sempre inoculadas na dose de 20 ug por animal, diluídas em PBS estéril.

Quatro semanas após a última imunização, os camundongos foram eutanasiados para os ensaios de avaliação da resposta imune humoral e celular.

Tabela1: Grupos de camundongos imunizados

Grupo de camundongos	Substância inoculada
Grupo1	PBS (200ul)
Grupo 2	PQ10 (20ug/animal)
Grupo 3	PQ10 + adjuvante (20ug/animal)
Grupo 4	PQ20 (20ug/animal)
Grupo 5	PQ20 + adjuvante (20ug/animal)
Grupo 6	Adjuvante de Freund (200uL)

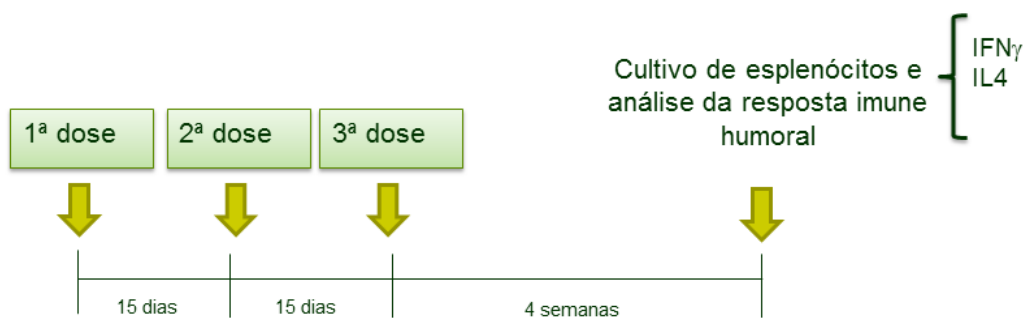


Figura 2: Representação esquemática da imunização realizada em camundongos

4.3.2) RESPOSTA IMUNE CELULAR

4.3.2.1) PRODUÇÃO DE IFN- γ E IL-4 POR ESPLÊNOCITOS DE CAMUNDONGOS

A análise de resposta imune celular foi realizada pela avaliação da produção de citocinas pelas células esplênicas após as imunizações. Os animais foram eutanasiados através de deslocamento cervical e os baços foram coletados assepticamente. Os órgãos foram macerados em meio de cultura DMEM (Cultilab®) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 0,1% de estreptomicina/penicilina, 2mM L-glutamina (Sigma-Aldrich®). Após a maceração, procedeu-se a lavagem das células com DMEM [descrito acima] e, em seguida, a lise de hemácias com tampão de lise [NH₄Cl 8,2g; KHCO₃ 1,0g; EDTA 37,2mg; H₂O qsp 1L), por 10 min. As células foram então recuperadas por centrifugação (800 G, 3 min, 4° C) e ressuspensas em 3 mL de DMEM. A seguir, as células foram quantificadas em câmara de Neubauer e ajustadas para uma concentração final de 1.10⁵ células por orifício, sendo então diluídas em DMEM e plaqueadas em placas de 96 poços, num volume final de 100 μ L.

Os esplênocitos de cada grupo foram submetidos a dois estímulos diferentes. O estímulo com PBS foi utilizado com controle negativo e, além disso, cada grupo também recebeu como estímulo a proteína quimérica com a qual foram realizadas as imunizações anteriores nos camundongos. A concentração de antígeno utilizada foi de 1 μ g/orifício. Após o acréscimo dos antígenos, as placas foram incubadas em estufa a 5% de CO₂ por 48 h a 37 °C. Em seguida, os sobrenadantes foram coletados, armazenados a -80° C e utilizados nos experimentos de ELISA.

Foram avaliadas as citocinas IFN- γ e IL-4. As dosagens foram realizadas por ELISA de captura, utilizando os kits BD OptEIA™ de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, as placas foram sensibilizadas a 4° C, com anticorpos de captura diluídos a 1:250, em diluente de amostra [soro fetal bovino 10% em PBS], por 16-18h. Após lavagens com PBS/T, as placas foram bloqueadas com o diluente de amostra por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, os sobrenadantes foram acrescentados e incubados por 2h, em temperatura ambiente. Após lavagens, foi acrescentado o anticorpo de detecção biotilado e também a streptavidina associada à peroxidase, por 1h, em temperatura ambiente. A revelação foi realizada após as lavagens, com TMB e H₂O₂ e a leitura foi realizada a 450nm em espectrofotômetro (MultiskanGo™ ThermoScientific).

4.3.2.2) PRODUÇÃO DE IFN- γ E IL-10 POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DE CÃES

O estímulo de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de cães foi utilizado para avaliar a produção de citocinas coletadas no sobrenadante dessas células. Para tanto, foram coletadas amostras de sangue periférico, em EDTA, de 10 cães do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, sendo 5 com dupla sorologia positiva e 5 com dupla sorologia negativa para LVC. Em seguida, frações de 4 mL de sangue foram aplicadas lentamente sobre 6 mL de Ficoll-Hypaque (Hystopaque® – Sigma-Aldrich®) em tubos, que foram centrifugados a 1800 rpm, por 45 min, a 18°C. Em seguida, foi removido o anel contendo as células mononucleares do sangue periférico, que foram lavadas com meio RPMI (Cultilab®) e centrifugadas a 1200 rpm, por 10 min, a 4° C. Após descartar o sobrenadante, o sedimento foi ressuspenso em 1 mL de meio RPMI e as células foram contadas em câmara de Neubauer. O volume foi ajustado para 1.10^6 células/mL e foi utilizado o volume de 200 μ l por orifício da placa.

O ensaio foi realizado para cada cão utilizando culturas em triplicata, em placas de 96 orifícios, na presença de antígeno bruto de *L. chagasi*, do mitógeno fitohemaglutinina A (PHA), das proteínas quiméricas e na ausência de qualquer estímulo (branco). As células foram cultivadas por 72h em estufa a 5% de CO₂, a 37 °C. Após esse período, o sobrenadante foi coletado e testado quanto à presença de citocinas.

A quantificação das citocinas IFN- γ e IL-10 foi realizada com os kits DuoSets (R&D Systems) através de ELISA de captura, de acordo com instruções do fabricante. Brevemente, as placas foram sensibilizadas por 16-18h, em temperatura ambiente, com o anticorpo de captura a 2 μ g/mL. Após lavagens, foi realizado o bloqueio por 1h, com 1% de BSA em PBS. O sobrenadante coletado foi acrescentado às placas (100 μ l) e reagiu por 2h em temperatura ambiente. Após lavagens, foi acrescentado o anticorpo de detecção biotilado, a 0,2 μ g/mL, e incubado por 2 h, em temperatura ambiente. Após lavagens, foi acrescentada a solução de estreptavidina conjugada à peroxidase, que reagiu por 20 min em temperatura ambiente. A revelação foi realizada pela solução de TMB e H₂O₂ (R&D Systems) e foi feita a leitura a 450nm em espectrofotômetro (MultiskanGo™ ThermoScientific).

5 – RESULTADOS

5.1 - PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS

A representação esquemática da construção das proteínas quiméricas está descrita na Figura 3, onde é possível verificar a sequência de nucleotídeos que codificam as duas proteínas. Os genes quiméricos foram construídos e otimizados *in silico*, gerando uma sequência de 578 pares de bases para a PQ10 e de 891 pares de bases para a PQ20. Esses genes foram produzidos e adquiridos comercialmente (GenScript™) já inseridos no plasmídeo de clonagem pUC57 (Anexo 9.1). Após a digestão com as enzimas *NdeI* e *NotI* e a posterior excisão das bandas referente aos genes quiméricos do gel de agarose, eles foram ligados ao plasmídeo de expressão, o pET9a24a (Anexo 9.1).

A expressão das proteínas codificadas pelos genes quiméricos pôde ser verificada por gel de poliacrilamida a 12%, no qual foram aplicadas as frações solúveis e insolúveis, coletadas após a indução com IPTG. Foi verificado que a fração insolúvel possuía uma banda de 21.4 kDa, referente à PQ10 e que também na fração insolúvel, mas em outro inóculo bacteriano, a banda de 33 kDa referente à PQ20 pôde ser observada (Figura 4), após coloração com Coomassie.

PQ10

CATATGCAACGGGAGCTGAAAATGGTCGTGGCGCAGAGC**GGTAGCGGCAGTGGT**TCGCAGCAGCTGCTGGGGCAGCGGCTGTACG
GACTGTGGAAA**GGCTCTGGTAGTGGC**TTCCGTGCGATCAGCACGCCACGCACTGGCACCATGCC**GGTAGCGGCAGTGGT**AACGGC
GACCGCTACGACGGCGAGTGAAAAGATGATAAACGT**GGCTCAGGTAGCGGC**TCGAAACGCTACGCCAAGGCCATGGCCAAAATGGG
CCTGAAA**GGTTCAGGCTCTGGT**AACAACATCAAATCCTCCATCTGCGATATCCCGCCGAAAGGC**GGTAGCGGCAGTGGT**TGGAACAA
CAACATCTTCTACGATGGCCCGTCCGGTGCCTT**GGTTCAGGCTCTGGT**TTACGAATCGTCGCTGCGACTCGAACGCGACGAATGCG
CGG**GGCTCTGGTAGTGGC**CGAAAAACATCGTGA AAAAATGCCTGGAAATGTTGACGAG**GGTAGCGGCAGTGGT**AAAGACGTGAC
GAAAGAGGAGTACGCGGCTTCTACAAAGCC**CATCATCATCATCATTAAGCGGCCGC**

PQ20

CATATGTGGTCGTCTCAGTCGCCGAAATCCTTC**GGTAGCGGTAGCGGT**TTTCATGCGGACCCGGTGCGCATTCTG**GGTAGCGGTAGCG**
GTTGGTCACGGAACTGGGTGTTTTCTTC**GGTAGCGGTAGCGGT**CGCATGATGGGCGTTCTGTTGACTAC**GGTAGCGGTAGCGGT**
TCACGCTGGACGGCGTCAAATACTAC**GGTAGCGGTAGCGGT**TTTGTGCAGAAAGTCATGATGCCGCTG**GGTAGCGGTAGCGGT**GGCA
CGGAGCCGAAAATCAAAT**GGTAGCGGTAGCGGT**AGCGGTATCACGAACCCGCACTGACGTTCTAT**GGTAGCGGTAGCGGT**GGCCTGT
ACGACGGCCGCTACGTGTT**GGTAGCGGTAGCGGT**CTGACCTACGTCAACGGCGAGCGCTAC**GGTAGCGGTAGCGGT**AAAACCAAA
AGCATCGCTCGTGCCTAC**GGTAGCGGTAGCGGT**CTGACGTGCTGCTGCTGAGCTAC**GGTAGCGGTAGCGGT**TGGCTGCAACAG
GCCGTGCGTACTTC**GGTAGCGGTAGCGGT**CAGAGCGGCAGTTCGCGCTGGGCTAC**GGTAGCGGTAGCGGT**ATGCGCCGCTTCGC
CTCCCGTGTCTG**GGTAGCGGTAGCGGT**TTACGCTGACGATGACGTGAACTAC**GGTAGCGGTAGCGGT**TGGGTGATGCCAGCCTAT
GCCTACCTG**GGTAGCGGTAGCGGT**TGGCTGCAACAGGCCGTGCGTACTTC**GGTAGCGGTAGCGGT**GTGCTGATCGAGACCCTGAAA
GCCCTG**GGTAGCGGTAGCGGT**AAAACGGGCAAACCTGCTGGGCTCCTAC**GGTAGCGGTAGCGGT**ATCAGCGGTATGGGCGGCGCCAT
CTAC**CATCACCATCACCATCACTAAAGCGGCCGC**

CATATG → Sítio de restrição *NdeI* e códon de início

CAACGG... → Peptídeos

GGTAGC... → Ligantes flexíveis

CATCAT... → Cauda de histidina

TAA → Códon de parada

GCGGCCGC → Sítio de restrição *NotI*

Figura 3: Sequência de nucleotídeos das proteínas quiméricas

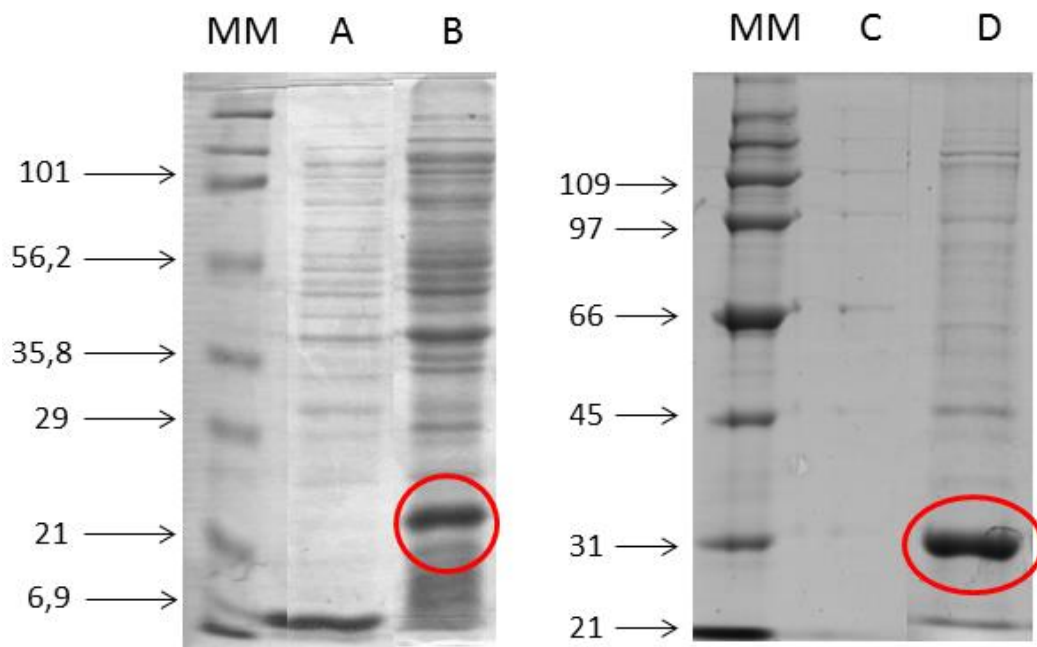


Figura 4: Gel de poliacrilamida a 12%, corado por Coomassie, das frações solúveis (A e C) e insolúveis (B e D) da cultura de indução bacteriana, indicando bandas correspondentes às proteínas PQ10 (21,4 kDa) e PQ20 (33 kDa). MM: massa molecular em kDa.

Tendo observado que as proteínas quiméricas permanecem na porção insolúvel da cultura bacteriana, foi realizado um novo ensaio de expressão, mas dessa vez em maiores quantidades de meio de cultura (500 mL). Com isso, foi possível obter volume suficiente de fração insolúvel para proceder com a purificação protéica por cromatografia.

A Figura 5 é representativa para as duas PQs e mostra como o processo de purificação tornou o perfil protéico mais limpo e livre de contaminantes bacterianos (Figura 5, I). Além disso, através do *western blotting* utilizando anticorpo anti-histidina, foi possível confirmar que as bandas observadas no gel de poliacrilamida de fato referiam-se às proteínas quiméricas (Figura 5, II).

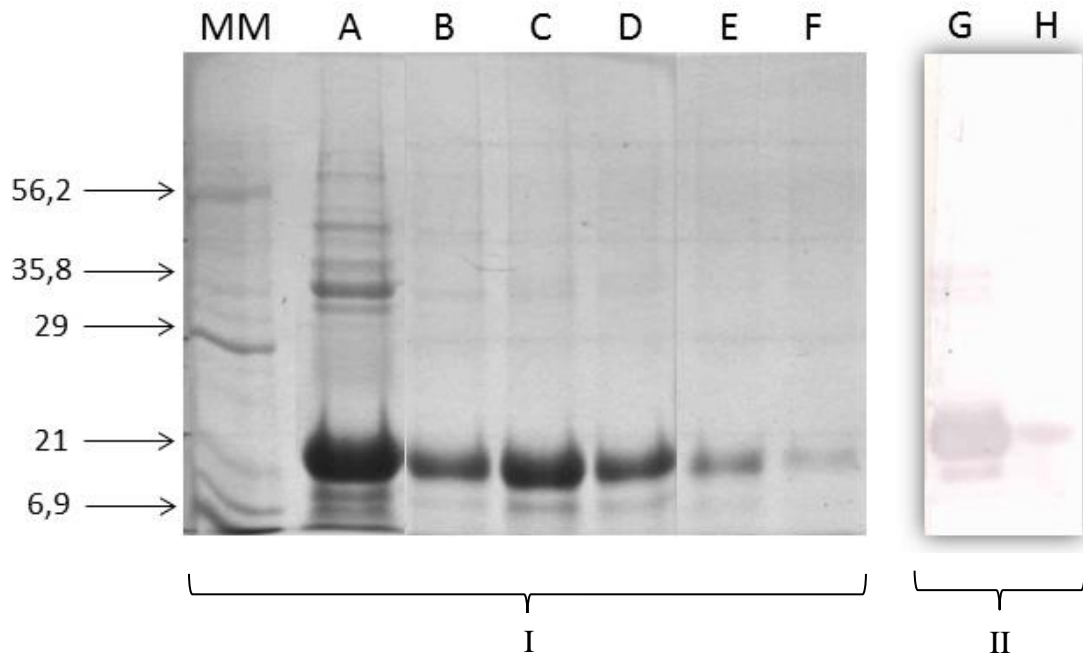


Figura 5: I- Gel de poliacrilamida a 12% corado por Coomassie. Canaleta A: PQ10 pré-purificação por coluna de afinidade; B-F: Frações da purificação. II- Membrana de nitrocelulose após *western blotting* anti-histidina. Canaleta G: PQ10 pré-purificação; H: Fração da purificação. MM: Massa molecular em kDa.

5.2 – ELISA

5.2.1) PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA

O primeiro ensaio de padronização foi realizado para determinar em qual tampão (Bicarbonato pH 9,6 ou PBS pH 7,4) as PQs apresentariam melhor resultado e também se deveríamos utilizar solução de proteína dialisada ou não dialisada.

Foi possível concluir que os melhores resultados ocorreram com a utilização do tampão bicarbonato pH9,6 (Figura 6) e da solução protéica não dialisada (dados não mostrados). Nessas condições, as absorvâncias obtidas para o pool de soros positivos e negativos foram mais elevadas. Além disso, foi observado que as placas BD Falcon® apresentaram melhores resultados para a PQ10 e as placas Eppendorf apresentaram melhores resultados para a PQ20. Desse modo, essas condições passaram a ser empregadas nos ensaios subsequentes.

O segundo ensaio de padronização realizado determinou a melhor concentração das PQs, e também as melhores diluições dos anticorpos primário e secundário. Foi possível observar que os melhores resultados foram obtidos ao se realizar a sensibilização das placas com as proteínas a 0,5µg/mL, com os soros caninos diluídos a 1/200 e o conjugado diluído a 1/2500. Dessa maneira, a diferença entre as absorbâncias obtidas para o pool de soros positivos e negativos foi maior, evidenciando a diferenciação entre cães não infectados e infectados (Figura 7).

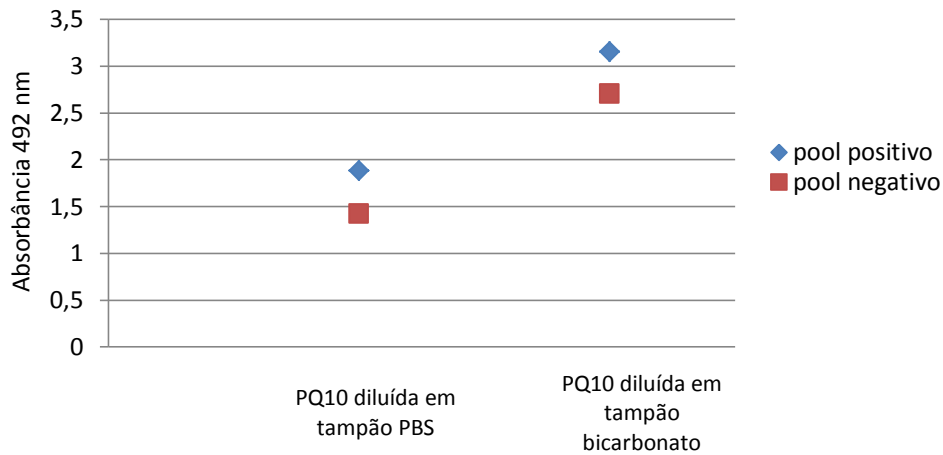


Figura 6: Padronização das condições de sensibilização de placas BD Falcon® utilizando a PQ10 a 0,5 µg/mL

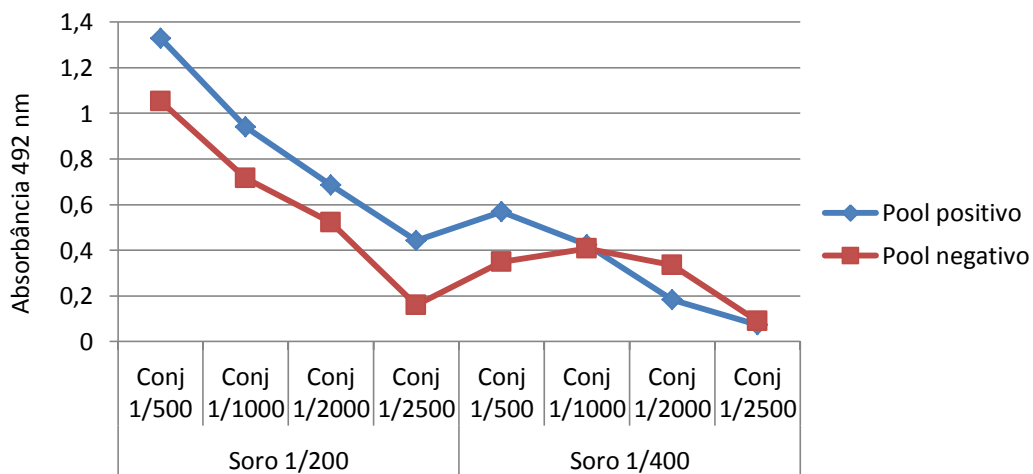


Figura 7: Padronização das diluições de soros e conjugados em placas BD Falcon® utilizando a PQ10 a 0,5 µg/mL

5.2.2) TESTES INICIAIS

Ao testar as amostras individuais de soros caninos em ELISA, foram empregadas as melhores condições obtidas na padronização.

A Figura 8 mostra a dispersão das absorvâncias obtidas para soros de cães não infectados e infectados obtidos com a PQ10. A linha horizontal representa o melhor ponto de corte (*cut off*) obtido através da curva ROC. É possível observar que grande parte dos soros de cães infectados permanece acima do ponto de corte.

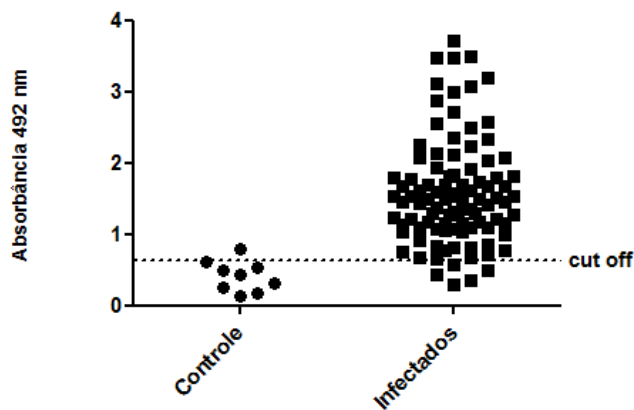


Figura 8: ELISA com a PQ10 comparando soros de cães não infectados (n=9) e naturalmente infectados por *L. infantum* (n=98).

De acordo com esse ensaio, foi possível determinar a acurácia do teste, que foi de 0,968. Isso classifica o teste como de elevada acurácia, segundo critérios estabelecidos por Swets et al. (1988). De acordo com o ponto de corte escolhido, foram obtidos valores de sensibilidade de 94,9% e de especificidade de 88,89%.

Nos ensaios realizados em paralelo entre as proteínas quiméricas, o DPP® e o ELISA Biomanguinhos, as PQs apresentaram resultados bastante promissores. Enquanto o valor de sensibilidade do ELISA Biomanguinhos foi de 64,5%, o valor obtido para o DPP® foi de 72,9% e das PQs foi de 88,8%. No entanto, a especificidade das PQs (80%) não foi tão elevada quanto a observada para o ELISA Biomanguinhos (100%) e para o DPP® (90%). Entretanto, um resultado bastante interessante foi a capacidade de detecção dos cães assintomáticos. Enquanto o ELISA Biomanguinhos não foi capaz de detectar nenhum desses cães, o DPP detectou apenas 10% deles.

Diferentemente, as PQs detectaram 80% desses cães assintomáticos, o que torna esses antígenos muito importantes no contexto do controle da LVC (Tabela 2).

Tabela 2: Comparação do desempenho dos ensaios ELISA PQ10, DPP® e ELISA Biomanguinhos

	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Deteção de cães assintomáticos (%)
PQ10	88,8	80,0	80
DPP®	72,9	90	10
ELISA Biomanguinhos	64,5	100	0

5.2.3) VALIDAÇÃO DOS ANTÍGENOS

Um amplo painel de soros caninos foi testado frente às proteínas quiméricas para verificar seu potencial no diagnóstico da LVC.

As proteínas quiméricas apresentaram um bom desempenho quanto à diferenciação de cães infectados e não infectados. Como pode ser observado nas Figuras 9 e 10, o desempenho de ambas as proteínas foi bastante similar. Nos grupos N1 e P1, que apresentam apenas dupla sorologia concordante, pode-se observar que várias amostras apresentaram falsos resultados; por exemplo, praticamente a metade das amostras do grupo N1 apresentou resultado positivo para a PQ10. Quando apenas esses grupos são considerados, o teste passa a apresentar uma acurácia de 0,75 para a PQ10 e de 0,86 para a PQ20. Isso não aconteceu para os grupos N3 e P3, que possuíam PCR concordante, além da dupla sorologia. Quando se considera apenas esses grupos, a acurácia do teste atinge os maiores valores: 0,93 para a PQ10 e 0,89 para a PQ20 (Tabelas 3 e 4). Esse resultado nos leva a crer que apenas a dupla sorologia concordante pode ter classificado erroneamente alguns cães, tanto no grupo N1, quanto no P1. Por conseguinte, observamos que quando se acrescenta uma terceira metodologia para garantir o diagnóstico do cão, como por exemplo, o fato do cão ser criado em canil telado, ou possuir um terceiro método concordante, a

taxa de falsos diagnósticos pelas PQs diminui. Além disso, pode-se observar que o desempenho do teste comparando amostras provenientes de Belo Horizonte - MG (P1) e amostras provenientes de Teresina – PI (P2) foi bastante similar. Isso nos indica que os antígenos apresentam desempenho igualmente satisfatório em diferentes regiões endêmicas para LV, considerando que ambos os grupos possuem resultados positivos apenas em testes sorológicos.

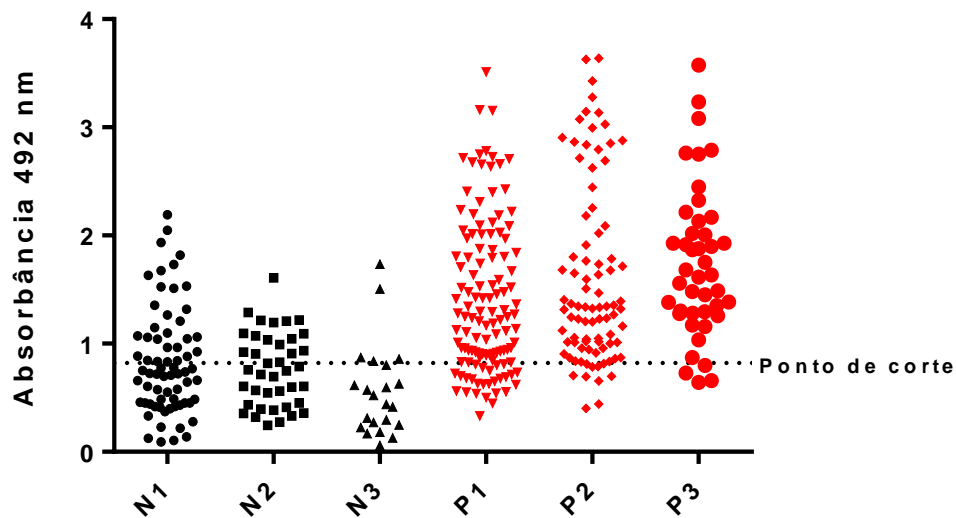


Figura 9: ELISA-PQ10 comparando diferentes grupos de cães. N1: dupla sorologia -; N2: dupla sorologia – e cães provenientes de canil telado; N3: dupla sorologia e PCR -; P1: dupla sorologia +; P2: dupla sorologia e DPP+; P3: dupla sorologia e PCR+.

Tabela 3: Comparação do desempenho do ELISA-PQ10 considerando diferentes grupos de cães

Grupos considerados	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	AUC
N1 e P1	74,5	65,2	0,75
N2 e P2	80,4	65,0	0,84
N3 e P3	90,7	90,9	0,93

N1: dupla sorologia -; N2: dupla sorologia – e cães provenientes de canil telado; N3: dupla sorologia e PCR -; P1: dupla sorologia +; P2: dupla sorologia e DPP+; P3: dupla sorologia e PCR+.

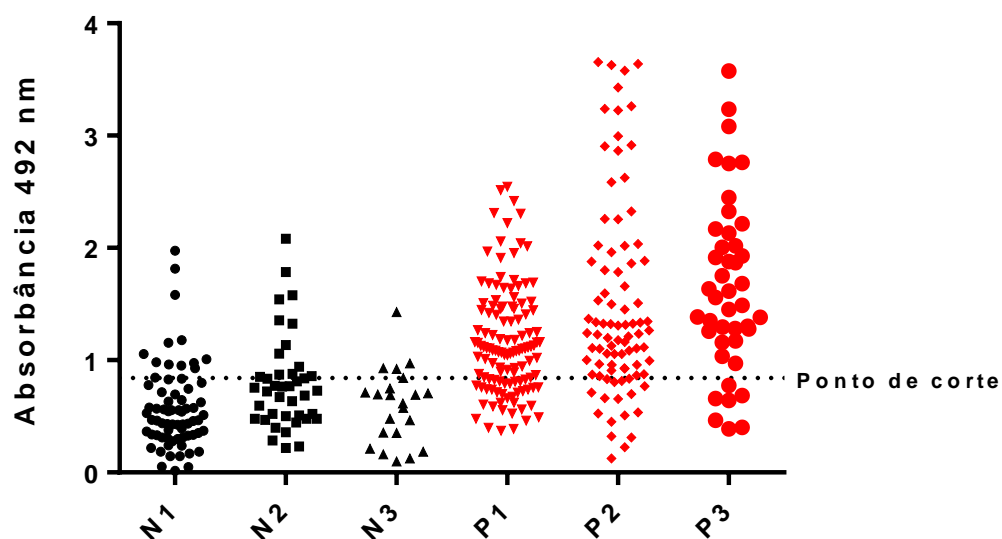


Figura 10: ELISA-PQ20 comparando diferentes grupos de cães. N1: dupla sorologia -; N2: dupla sorologia - e cães provenientes de canil telado; N3: dupla sorologia e PCR -; P1: dupla sorologia +; P2: dupla sorologia e DPP+; P3: dupla sorologia e PCR+.

Tabela 4: Comparação do desempenho do ELISA com a PQ20 considerando diferentes grupos de cães

Grupos considerados	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	AUC
N1 e P1	88,5	71,0	0,86
N2 e P2	80,4	72,5	0,78
N3 e P3	86,0	72,7	0,89

N1: dupla sorologia -; N2: dupla sorologia - e cães provenientes de canil telado; N3: dupla sorologia e PCR -; P1: dupla sorologia +; P2: dupla sorologia e DPP+; P3: dupla sorologia e PCR+.

De acordo com a Tabela 5, que considera o desempenho global do teste, considerando todos os grupos testados (N1 a N3 e P1 a P3) pode-se observar que as proteínas quiméricas geraram testes de moderada acurácia, de acordo com Swets (1988). O valor de p significativo nos indica que a diferenciação entre o grupo de cães infectados e não infectados ocorre

adequadamente. Além disso, os valores elevados de sensibilidade obtidos para as duas proteínas são um indicativo de que elas possuem o potencial de serem empregadas em testes de triagem. Um resultado positivo por essas proteínas deveria ser seguido por outro teste com elevada especificidade, para fornecer um diagnóstico de certeza.

Tabela 5: Desempenho global das proteínas químéricas no diagnóstico canino

Antígeno	Sensibilidade	Especificidade	AUC	Valor de <i>p</i>
PQ10	80,16%	65,65%	0,8212	<0.0001
PQ20	84,92%	65,65%	0,8419	<0.0001

Na intenção de se investigar a ocorrência de resultados falso-negativos dentre os grupos P1, P2 e P3, foi realizado o teste imunocromatográfico Kalazar-Detect® nessas 63 amostras classificadas pelas PQs de maneira discordante com relação aos outros métodos, seguindo o fluxograma da Figura 11. Foi encontrada uma positividade de apenas 56% através dessa metodologia. Entretanto, como esse método é sabidamente pouco sensível em amostras com baixos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* (Mohebbali et al., 2004), optamos por titular esses soros por RIFI. De acordo com o esperado, a maioria dos soros (n=57) possuía título de anticorpos abaixo de 1:160. Somente 5 soros apresentavam título de 1:320 e apenas um, título de 1:640. Desse modo, pode-se observar que o ELISA com as PQs, assim como o Kalazar-Detect®, também possui maior sensibilidade quando são testadas amostras com título elevados de anticorpos.

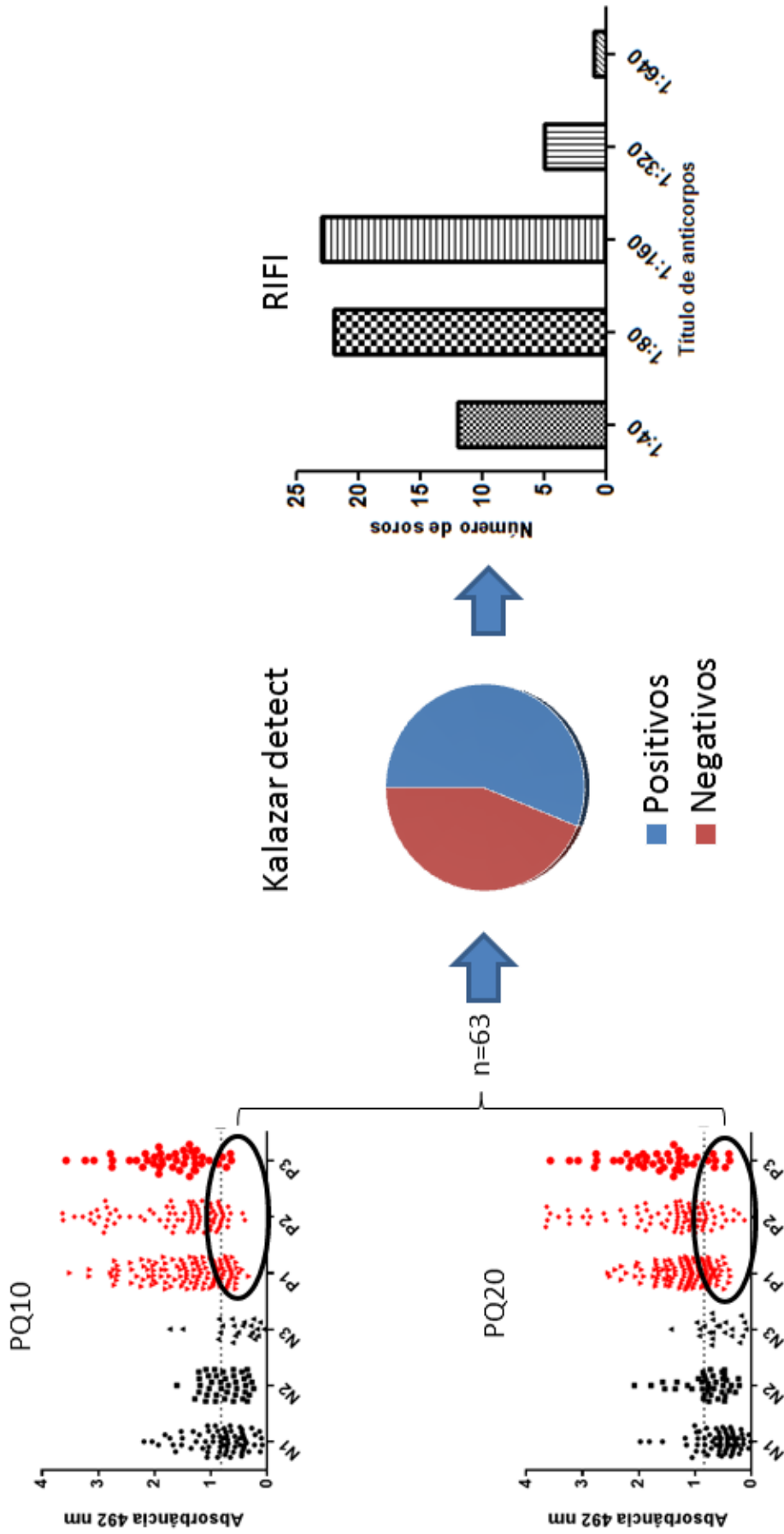


Figura 11: Fluxograma dos ensaios realizados com as amostras classificadas como falso-negativas pelas PQs

Para avaliar a reprodutibilidade dos ensaios com as proteínas quiméricas, 11,2% das amostras foram testadas em ensaios independentes e isolados. Obtivemos a concordância de 0,479, o que indica uma concordância moderada entre os testes.

5.2.4) AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE DETECÇÃO DA LVC EM FASE INICIAL

Inicialmente, foram testadas com as PQs nove amostras de soro de cães em fase inicial da infecção experimental por *L. infantum*. Observou-se que 8 amostras (88,8%) eram detectadas pelas proteínas quiméricas. O mesmo não aconteceu quando essas foram testadas por ELISA Biomanguinhos, que detectou apenas uma amostra (11,1%). Paralelamente, essas amostras quando testadas por RIFI, foram todas classificadas como negativas. Esses resultados promissores nos encorajaram a testar um painel mais amplo de amostras, para comprovar a capacidade das PQs em detectar o início da infecção na LVC.

Um painel de 80 amostras caninas, avaliadas por uma coorte, foi testado com as proteínas quiméricas. Os resultados obtidos para o grupo de amostras que iniciaram a coorte com resultado PCR negativo encontram-se na Figura 12 e na Tabela 6. De acordo com essa figura, pode-se observar que os cães passaram a apresentar resultados positivos para PCR com o passar dos meses, atingindo níveis elevados (86% de positividade) na última coleta, que aconteceu 18 meses após a primeira. Essa positividade não foi acompanhada pela ELISA Biomanguinhos, que desde a segunda coleta foi capaz de detectar apenas 4,6% dos casos. A PQ10, no entanto, foi capaz de identificar a positividade de 51,1% das amostras desde a primeira coleta, atingindo níveis mais elevados na segunda coleta, 60,4%, decrescendo em seguida. De modo similar, a PQ20 detecta 65,1% das amostras ainda no tempo 0, quando a PCR ainda é negativa, mas em seguida a positividade decresce, caindo para 53,4% na segunda coleta e para 27,9% na última. Esse achado sugere que os níveis de anticorpos detectados pelas PQs atingem seu pico máximo pouco tempo após a infecção, decrescendo em seguida. Todavia, a positividade das PQs antes mesmo da positividade da PCR é um dado intrigante, que merece ser melhor elucidado.

Pode-se observar na Figura 13 e também na Tabela 7 que apenas alguns soros que iniciaram a investigação com resultado positivo para PCR passaram a ser detectados tardiamente pela ELISA Biomanguinhos, apenas na terceira coleta (10,5%). Paralelamente, a PQ10 e a PQ20, já na primeira coleta, identificavam 42,1% e 57,8% respectivamente. A positividade detectada

pelas PQs também decresceu com o passar dos meses nesse grupo que iniciou a investigação com resultado positivo para PCR, exceto para a detecção pela PQ10 que foi mais elevada na segunda coleta, se comparada à primeira.

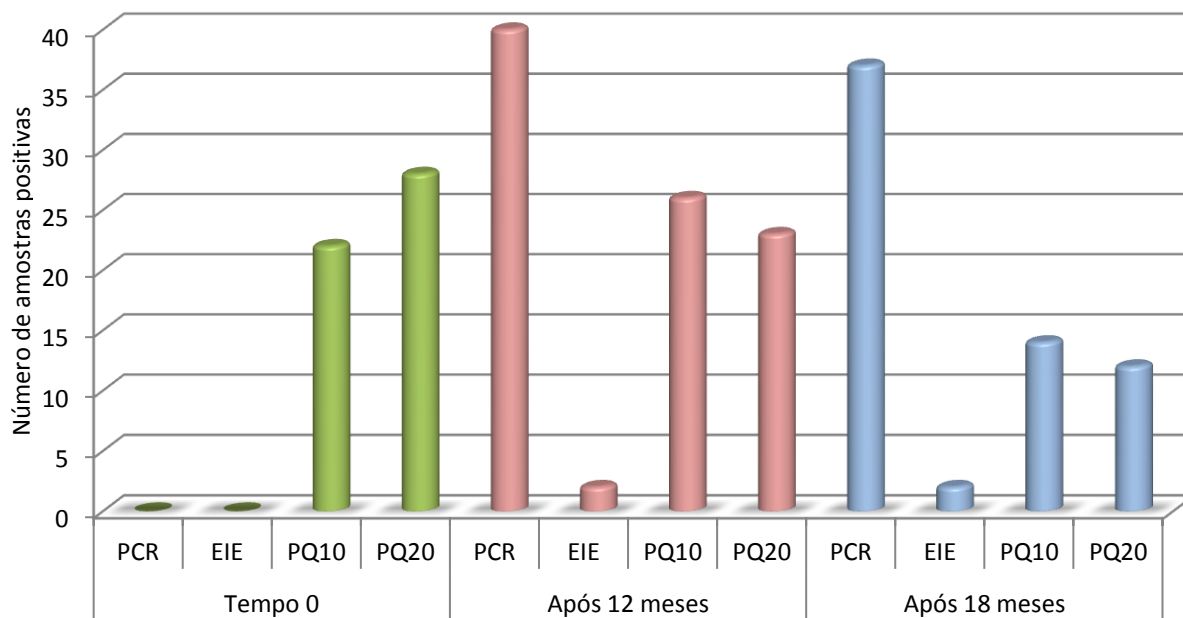


Figura 12: Diagnóstico de 42 cães (inicialmente PCR -) por PCR, EIE-Biomanguinhos, PQ10 e PQ20 em diferentes coletas

Tabela 6: Resultado comparativo da positividade (em porcentagem) de amostras que apresentavam inicialmente resultado PCR -

Teste	Resultado (%)		
	Tempo 0	Após 12 meses	Após 18 meses
PCR	0	93,0	86,0
EIE- Biomanguinhos	0	4,6	4,6
PQ10	51,1	60,4	32,5
PQ20	65,1	53,4	27,9

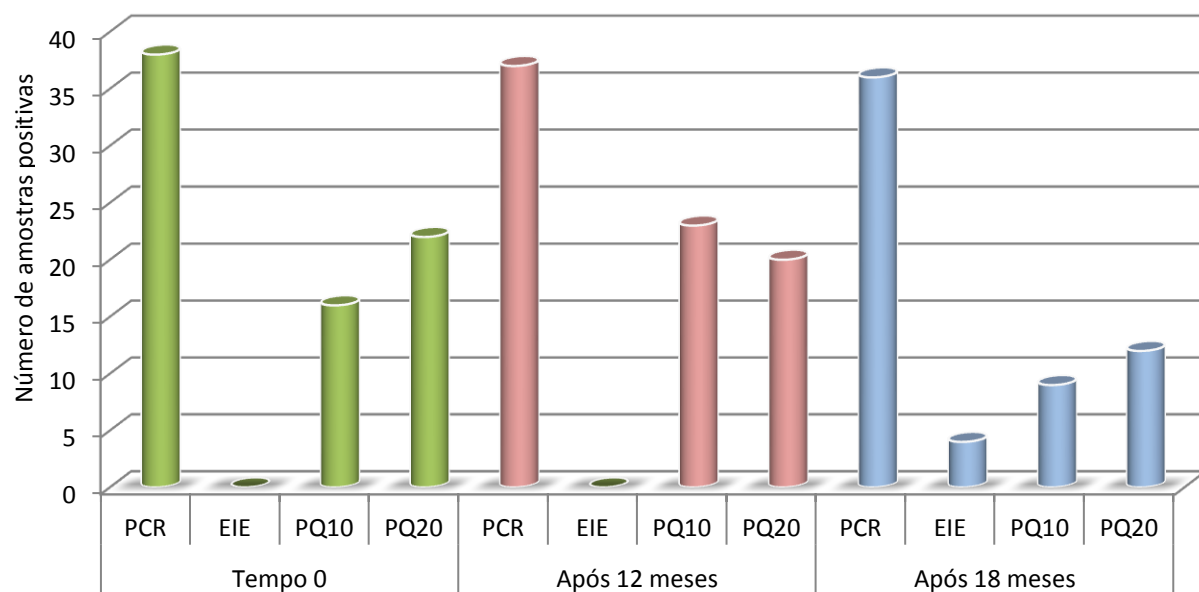


Figura 13: Diagnóstico de 38 cães (inicialmente PCR +) por PCR, EIE-BioManguinhos, PQ10 e PQ20 em diferentes coletas

Tabela 7: Resultado comparativo da positividade (em porcentagem) de amostras que apresentavam inicialmente resultado PCR +

Teste	Resultado (%)		
	Tempo 0	Após 12 meses	Após 18 meses
PCR	100	97,3	94,7
EIE- Biomanguinhos	0	0	10,5
PQ10	42,1	60,5	23,6
PQ20	57,8	52,6	31,5

A Tabela com todos os resultados obtidos para cada um dos cães incluídos na coorte e nas coletas subsequentes encontra-se no anexo 9.2.

A concordância entre os diferentes métodos utilizados nessas análises pode ser encontrada na Tabela 8. Verifica-se que os valores de Kappa foram todos menores que 0,4, indicando concordância insignificante segundo critérios de Landis & Kock (1977).

Tabela 8: Índice Kappa entre resultados pareados de PCR, ELISA Biomanguinhos, PQ10 e PQ20

Testes	Tempo 0			Após 12 meses			Após 18 meses		
	PCR	EIE	PQ10	PCR	EIE	PQ10	PCR	EIE	PQ10
PQ20	0	0	0,26	0	0	0,24	0,04	0,1	0,19
PQ10	0	0	NA	0	0	NA	0,07	0,17	NA
EIE	0	NA	NA	0,01	NA	NA	0,01	NA	NA

EIE: ELISA Biomanguinhos; NA: não aplicável

5.2.5) AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE REAÇÕES CRUZADAS

As proteínas quiméricas foram testadas frente a soros de cães infectados por protozoários que comumente causam reações falso-positivas com *L. infantum*. Como pode ser observado na Figura 14, a ocorrência de reações cruzadas foi menor no ensaio com a PQ20. No grupo *L. braziliensis*, houve falso positivo em 62,5% das amostras testadas com a PQ20, enquanto aquelas testadas com a PQ10 apresentaram 93,7% de falso-positivos. Já no grupo *Babesia canis*, todas as amostras testadas com a PQ10 apresentaram reação cruzada, fato que ocorreu em 75% das amostras testadas com a PQ20.

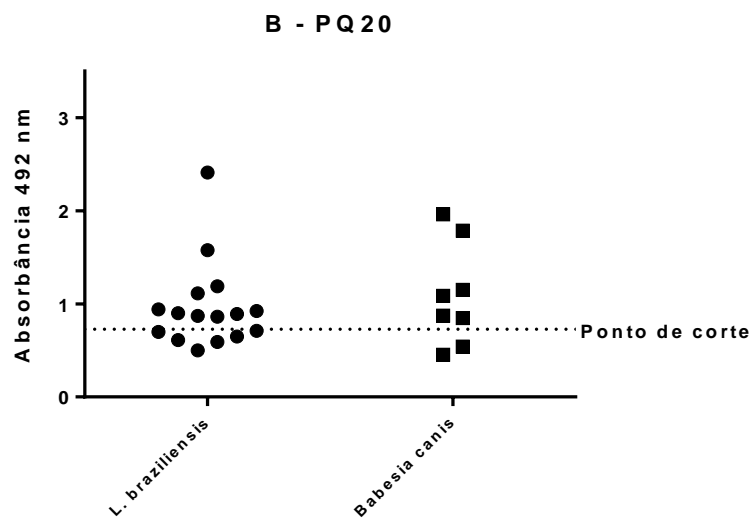
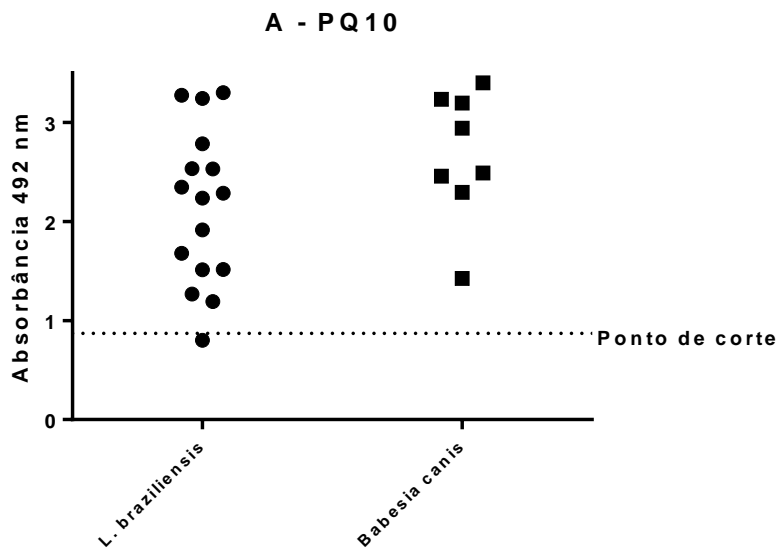


Figura 14: Ocorrência de reações cruzadas com a PQ10 (A) e PQ20 (B)

5.3 – VERIFICAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS

5.3.1) RESPOSTA IMUNE HUMORAL

5.3.1.1) RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM COELHOS

5.3.1.1.a) WESTERN BLOTTING

Após padronização das melhores diluições de soros e conjugados, foi estabelecido que o soro de coelho diluído a 1:400 e o conjugado anti-IgG de coelho diluído a 1:30000 fornecem os melhores resultados em *western blotting* [dados não mostrados]. Na Figura 15, é possível verificar que os coelhos, antes de serem imunizados com as proteínas, apresentavam anticorpos inespecíficos que reconhecem as bandas referentes às PQs (canaletas T0). Entretanto, após 5 imunizações, a produção de anticorpos policlonais foi estimulada, mas não fortemente, o que pode ser verificado pelas bandas mais intensas nas canaletas T6, referente a ambas as proteínas.

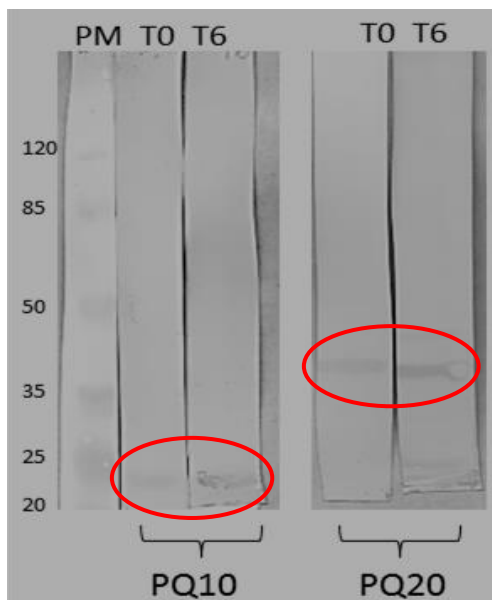


Figura 15: Membranas de *western blotting* com as PQs incubadas com soro de coelho antes (T0) e após (T6) imunização, indicando bandas referentes às proteínas

5.3.1.1.b) ELISA (PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS)

Inicialmente, foram realizados ELISAs utilizando as PQs como antígenos. Após titulação, foi verificado que os coelhos produziram uma resposta imune humoral significativa. O título de anticorpos verificado no coelho imunizado com a PQ10 foi de 1:3200 e no coelho imunizado com a PQ20 foi de 1:1600. Também foi observado que os valores de absorvâncias das duas proteínas eram diferentes, sendo que a PQ10 apresentou valores mais elevados do que a PQ20 (Figura 16)

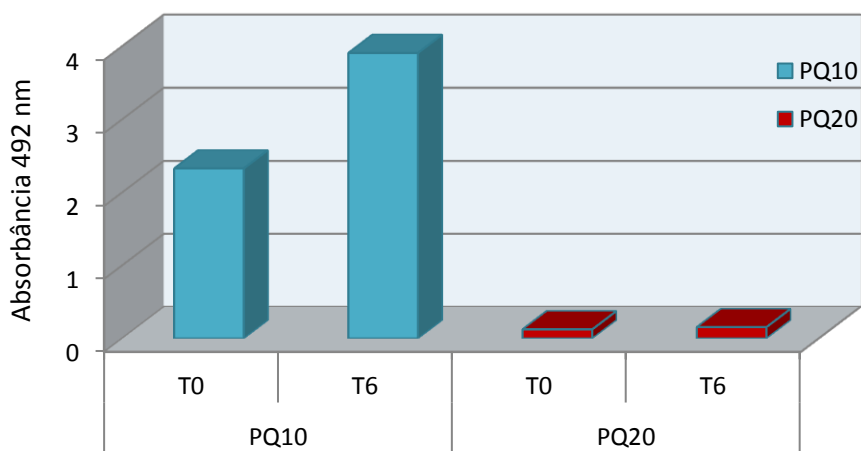


Figura 16: Absorvâncias dos soros antes e após imunização dos coelhos com as PQs

Após confirmação da imunogenicidade das PQs por *western blotting* e também por ELISA, iniciou-se a investigação de qual porção das proteínas confere maior reatividade a elas. Através de imunoenaios enzimáticos, foi possível observar que alguns peptídeos apresentam maior diferença entre as absorvâncias observadas para os soros antes (T0) e após (T6) a imunização. Na Figura 17, é possível observar que os peptídeos PSLc4, 6 e 9 foram os maiores responsáveis pela reatividade da PQ10, enquanto peptídeos como PSLc3 e 8, por exemplo, praticamente não tiveram influência na resposta gerada pela estimulação policlonal.

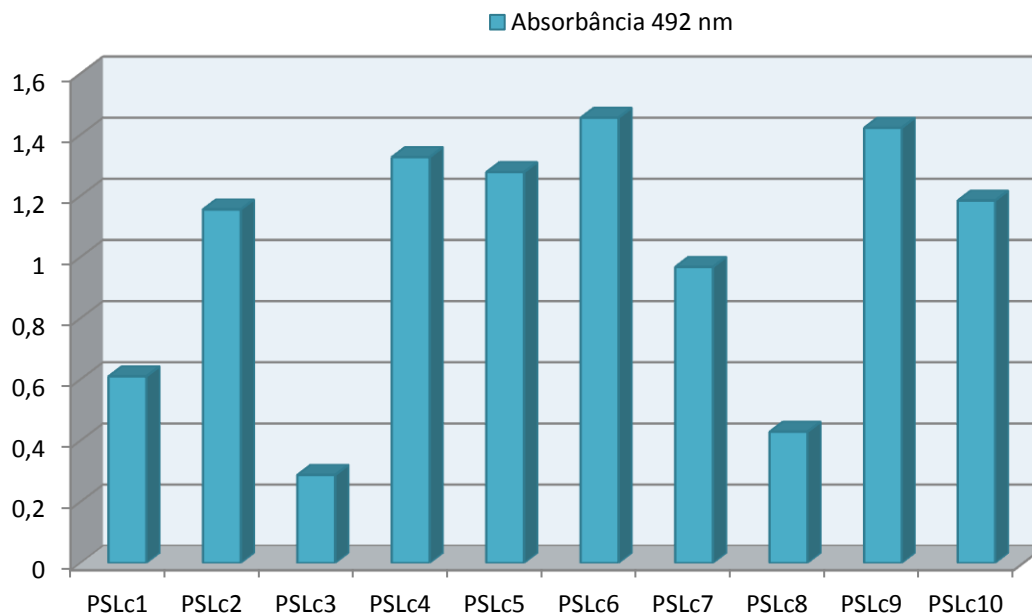


Figura 17: Diferença entre absorvâncias dos soros antes e após imunização dos coelhos para cada um dos peptídeos que compõem a PQ10

Na Figura 18, pode-se observar que os peptídeos que compõem a PQ20 apresentaram, de um modo geral, diferenças de absorvâncias mais baixas se comparado àquelas observadas para a PQ10. Entretanto, ainda assim alguns peptídeos se destacam, como o 5, 13 e o 17, que apresentaram as maiores diferenças entre as absorvâncias antes e após imunização.

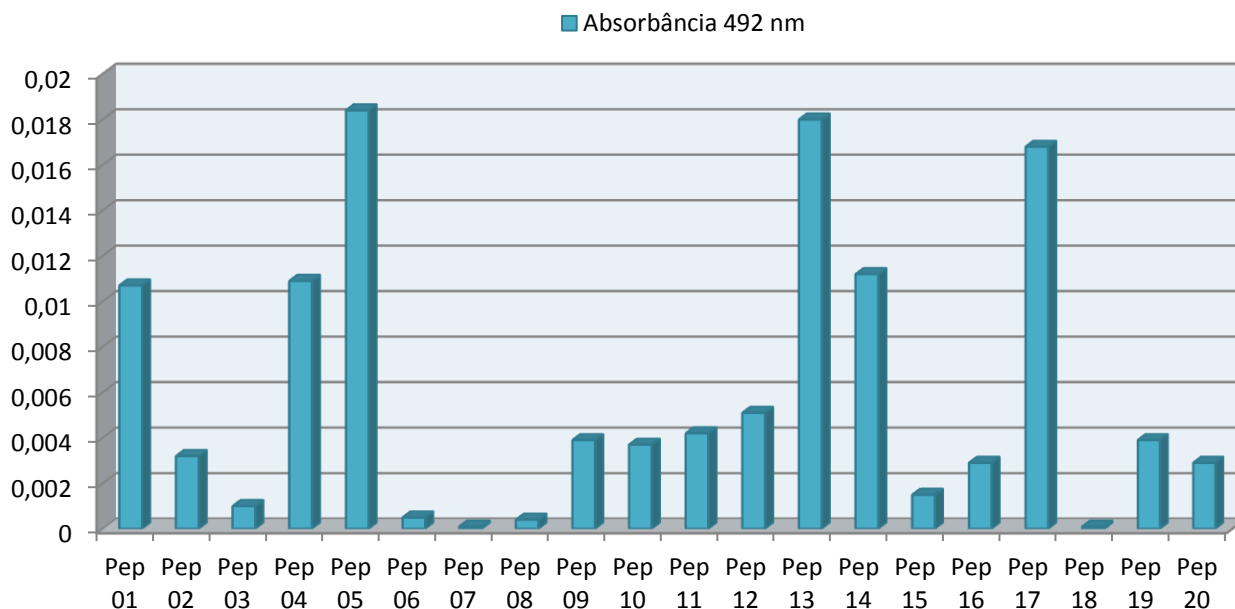


Figura 18: Diferença entre absorvâncias dos soros antes e após imunização dos coelhos para cada um dos peptídeos que compõem a PQ20

Essas absorvâncias mais baixas apresentadas pelos peptídeos da PQ20 são corroboradas pela Figura 16, na qual já tínhamos descrito que as absorvâncias obtidas pela PQ20 foram no mínimo 2 vezes menores que aquelas observadas para a PQ10. Isso nos indica que a proteína composta por 10 peptídeos apresentou uma maior eficiência na indução da produção de anticorpos policlonais.

5.3.1.2) RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM CAMUNDONGOS

5.3.1.2.a) ELISA - IgG

Os camundongos imunizados com as PQs tiveram sua resposta imune humoral investigada por ELISA. De acordo com a Figura 19, é possível observar que apenas a PQ20 estimulou uma resposta humoral significativa (B), o que não pôde ser observado para a PQ10 (A).

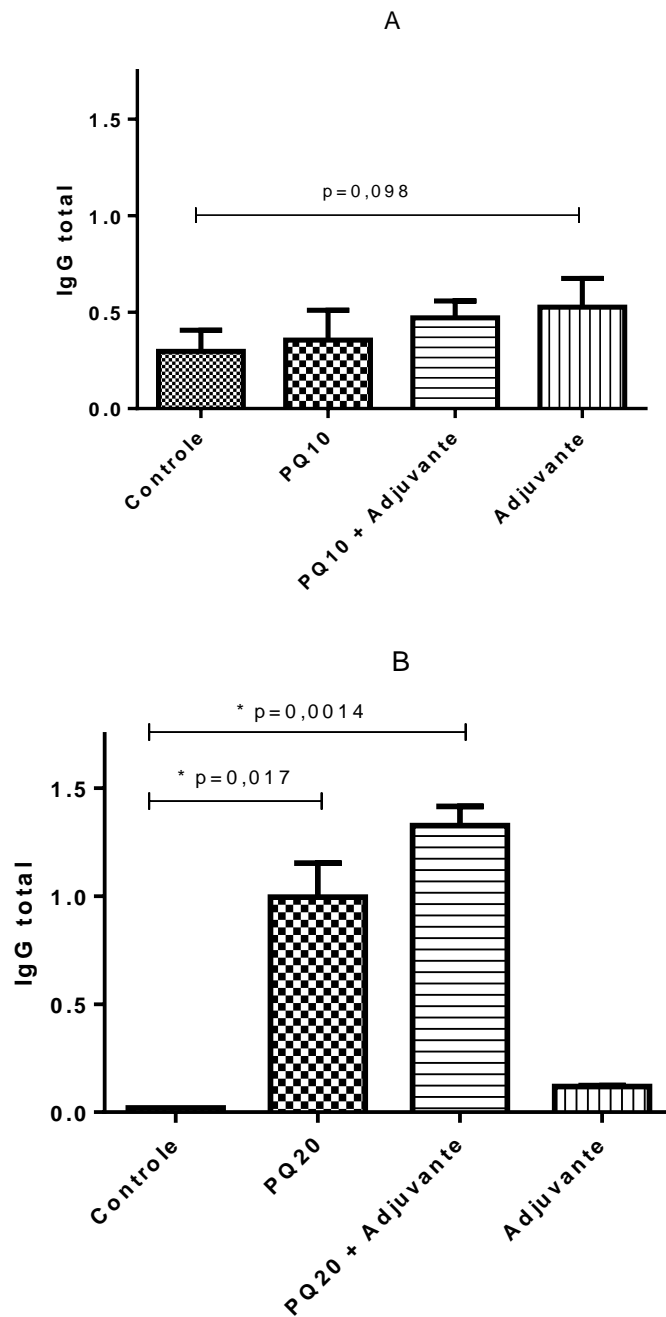


Figura 19: Níveis séricos de IgG total dos camundongos imunizados com PQ10 (A) e PQ20 (B)

5.3.2) RESPOSTA IMUNE CELULAR

5.3.2.1) PRODUÇÃO DE IFN- γ E IL-4 POR ESLENÓCITOS DE CAMUNDONGOS

Foi avaliada a produção das citocinas IFN- γ e IL-4 por esplenócitos de camundongos imunizados com as PQs. De acordo com a Figura 20, é possível observar que a produção de IFN- γ ocorreu em níveis muito baixos, mesmo para as células estimuladas pela PQ20 (B). Não houve diferença significativa entre os grupos de camundongos imunizados, seja com PBS, seja com as PQs ou com adjuvante.

A produção de IL-4 foi maior pelos esplenócitos imunizados com a PQ20, como pode ser observado pela Figura 21 (B). Houve diferença significativa entre as células estimuladas e não estimuladas dentro do grupo imunizado com a PQ10 isoladamente (A) e também com a PQ20 isoladamente (B). Isso significa que existe uma tendência para a susceptibilidade à infecção por *Leishmania* nesses camundongos devido à baixa produção de IFN- γ e pela alta produção de IL-4, o que caracteriza uma resposta do tipo Th2.

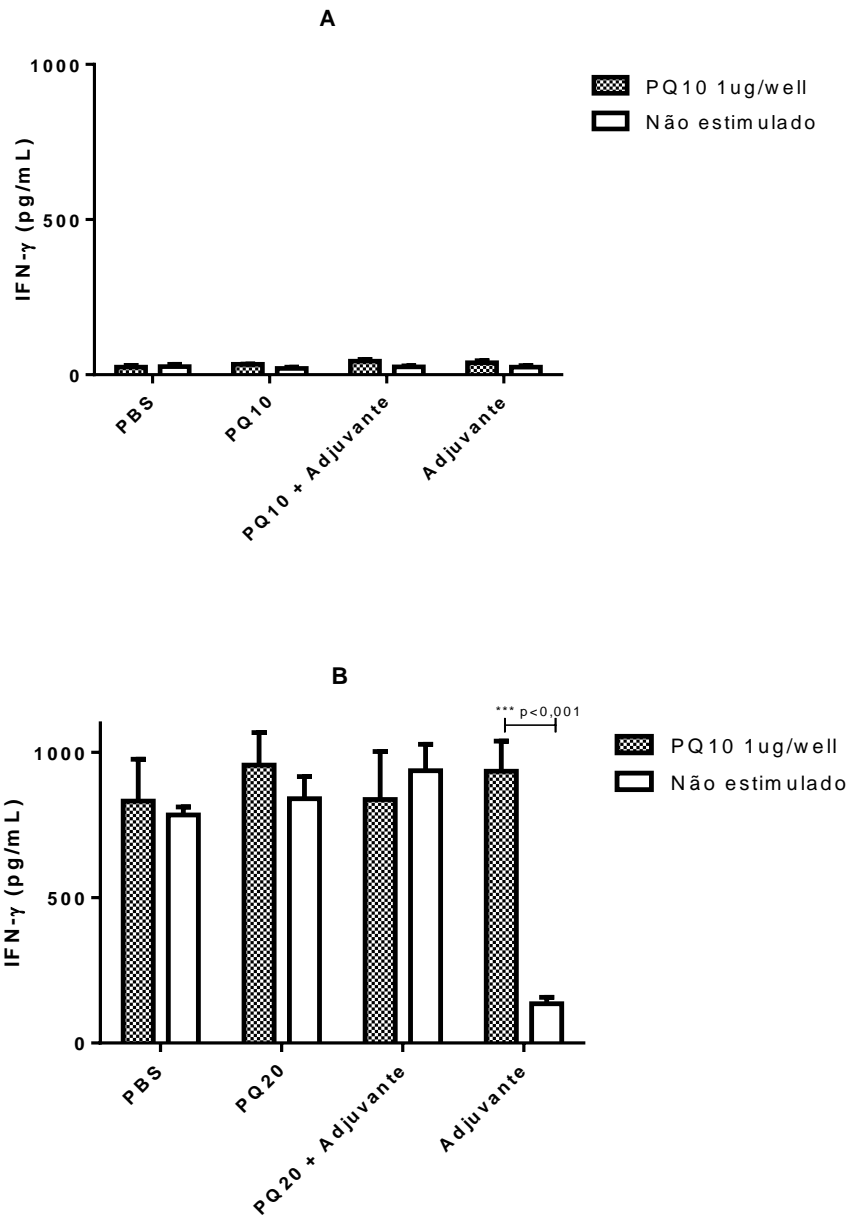


Figura 20: Níveis de IFN- γ produzidos por esplenócitos de camundongos imunizados com PQ10 (A) e PQ20 (B)

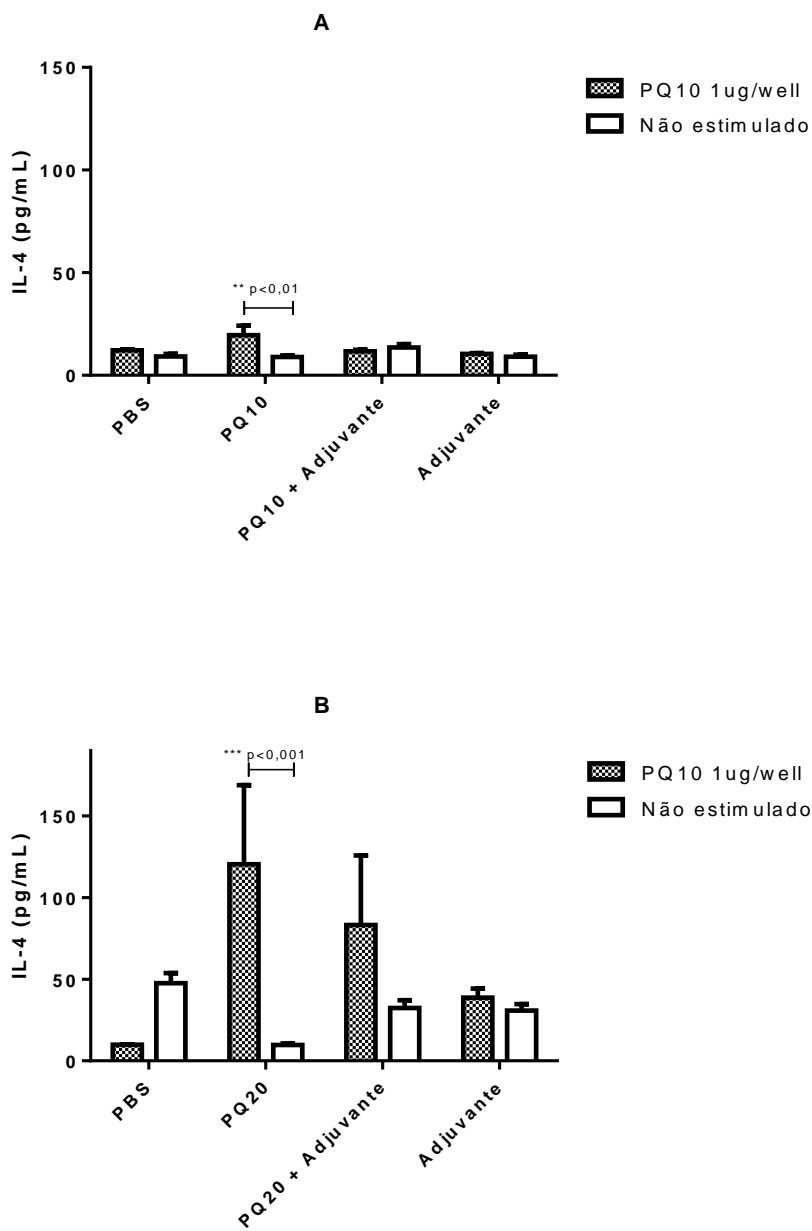


Figura 21: Níveis de IL-4 produzidos por esplenócitos de camundongos imunizados com PQ10 (A) e PQ20 (B)

5.3.2.2) PRODUÇÃO DE IFN- γ E IL-10 POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DE CÃES

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de cães foram investigadas quanto ao seu potencial produtor de citocinas frente ao estímulo com as PQs. Na Figura 22, é possível observar que houve produção de IFN- γ pelas células estimuladas pelas PQs, bem como pelo antígeno bruto de *Leishmania* e por PHA. Foi elaborada a hipótese de que a produção média de IFN- γ por células estimuladas por PHA em cães infectados (A) foi menor devido à imunossupressão causada pela infecção. Esse mesmo estímulo produziu uma resposta média mais elevada na produção de IFN- γ em cães não infectados (B).

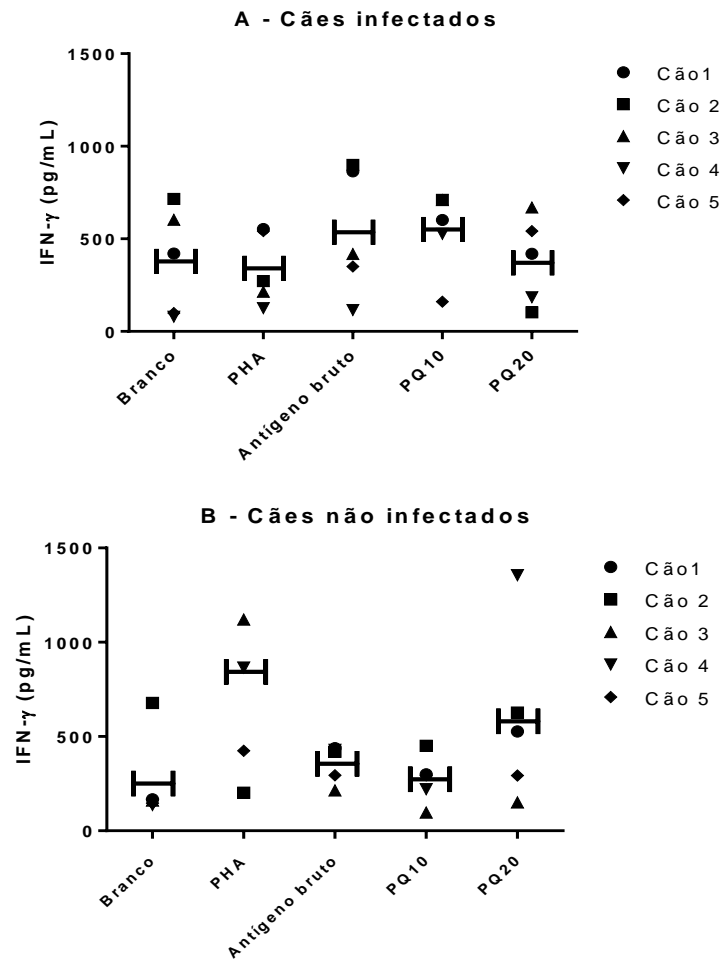


Figura 22: Níveis de IFN- γ produzido por PBMC de cães infectados (A) e não infectados (B) sob diferentes estímulos

A respeito da produção de IL-10 pelas células caninas, verificamos que cães não infectados produzem maior quantidade dessa citocina quando células do PBMC são estimuladas (Figura 23). Entretanto, assim como observado para IFN- γ , verificou-se que a resposta canina frente a diferentes estímulos foi bastante similar, o que explica, portanto, a inexistência de diferença significativa entre grupos.

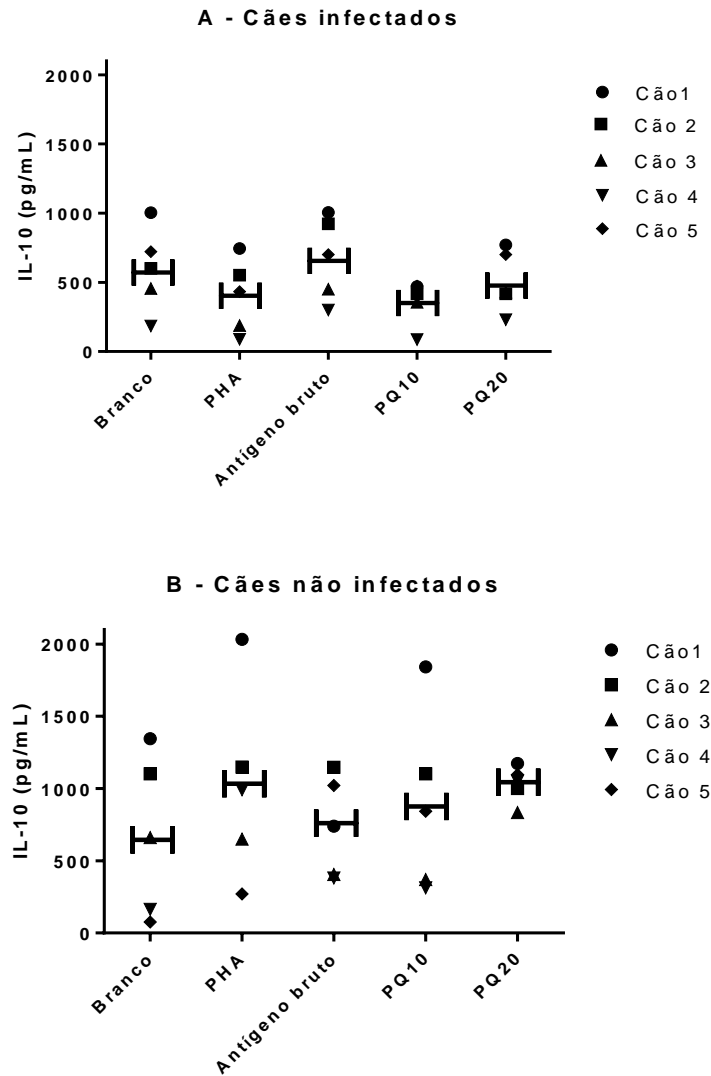


Figura 23: Níveis de IL-10 produzido por PBMC de cães infectados (A) e não infectados (B) sob diferentes estímulos

6 – DISCUSSÃO

Na leishmaniose visceral canina, o diagnóstico de certeza (com visualização do parasito) pode ser realizado por diversos métodos, como inóculo em animais, isolamento e cultivo dos parasitos, pesquisa em esfregaços ou em cortes histológicos. Embora o exame parasitológico seja o diagnóstico indubitável, não é o método de eleição, principalmente em campo, devido a sua invasibilidade e pouca praticidade (Genaro et al., 1988; Maia & Campino, 2008). Mais recentemente, têm sido utilizados métodos moleculares no diagnóstico confirmatório da LVC. Dentre eles, a PCR é o que apresenta melhores resultados. Apesar disso, os métodos moleculares ainda apresentam elevado custo, além de pouca aplicabilidade em campo, estando distante a sua aplicação na rotina (Cortes et al., 2004).

Nesse contexto, os métodos sorológicos se mostram como ferramentas poderosas para auxiliar no diagnóstico da LVC. Esses métodos não são invasivos, possibilitam trabalhar com um grande número de amostras ao mesmo tempo, além de apresentarem custo viável, dependendo da complexidade do método.

O DPP® e o ELISA Biomanguinhos são os testes atualmente preconizados pelo Ministério da Saúde para diagnóstico da LVC. Entretanto, essas técnicas apresentam como ponto negativo a baixa sensibilidade, principalmente em cães assintomáticos (Faria et al., 2011; Grimaldi et al., 2012). Desse modo, pesquisadores vêm desenvolvendo métodos sorológicos com a finalidade de serem empregados nos programas de controle da doença. Esses métodos podem fornecer melhores resultados quando são utilizadas frações antigênicas, comparado ao antígeno bruto. Essas frações quando empregados nos ensaios imunoenzimáticos, vêm proporcionando desde a década de 90 o desenvolvimento de metodologias que superam as demais (Ghandour et al., 1997).

Após a produção e a purificação de duas proteínas quiméricas, PQ10 e PQ20, esse trabalho inicialmente objetivou empregar esses antígenos em diagnóstico canino, devido aos resultados das análises *in silico* a que foram submetidas ambas as estruturas. De acordo com o esperado, as proteínas foram reconhecidas por imunoglobulinas, apresentando resultados semelhantes, e validando dessa maneira a predição de epitopos para células B. Nossos dados são similares os achados de Mendes et al. (2013), que obtiveram bons resultados ao validar a predição de epitopos de *Trypanosoma cruzi* para células B e demonstraram que um dos peptídeos

mapeados apresentou 95,8% de sensibilidade e 88,5% de especificidade na identificação de pacientes chagásicos.

A validação do uso das PQs em imunodiagnóstico canino possui grande importância em campo. Isso se justifica pois apesar dos avanços obtidos no diagnóstico da LVC e da intensa busca por novos antígenos na pesquisa acadêmica, muitos testes ainda não passaram pela validação em estudos multicêntricos com um amplo painel de amostras, como o presente trabalho. Destaca-se, dessa maneira, o achado de que as PQs possuem desempenho bastante similar quando são testadas amostras provenientes de áreas endêmicas distintas; nesse caso, Belo Horizonte (MG) e Teresina (PI).

De acordo com as características de desempenho observadas para as PQs, pode-se deduzir que a sua maior aplicação seja em triagem sorológica canina, uma vez que os valores de sensibilidade foram acima de 80%. A especificidade, no entanto, não passou de 66%, o que significa que há a necessidade de se associar outro teste confirmatório com maior especificidade. Conforme explicitado por Costa & Vieira (2001), o uso de apenas um antígeno para a triagem e a confirmação da LVC aumenta a proporção de falso-positivos.

As PQs apresentaram especificidades moderadas nos ensaios realizados com amostras caninas que possuíam dupla sorologia concordante. Esse critério de seleção de amostras é adotado por diversos autores (Nicolato et al., 2013; Reis et al., 2006; Barbosa-de-Deus et al., 2002) e também é preconizado pelo Ministério da Saúde para realização do Programa Nacional de Controle da Leishmaniose Visceral Canina. Entretanto, a dupla sorologia negativa pode ter incluído cães infectados possivelmente antes da soroconversão e que não seriam, portanto, identificados pela ELISA com antígeno bruto ou pela RIFI. Dessa maneira, animais incluídos nos grupos N1 e N2 poderiam estar infectados, o que limitou a especificidade das PQs. Essa hipótese foi reforçada pelos resultados encontrados quando avaliamos a capacidade desses antígenos reagirem com soros de animais de fase aguda que serão discutidos a seguir.

As amostras com dupla sorologia positiva que foram classificadas como negativas pelas PQs foram testadas por Kalazar Detect® e também foram tituladas por RIFI. Foi possível observar que o título de anticorpos das amostras era baixo, levando a crer que as PQs encontram dificuldade em detectar essas amostras com baixo índices de imunoglobulinas. Reis et al. (2006), ao testar ELISA com o antígeno k39, também obtiveram resultados falso-negativos (12,5%) devido à presença de cães com títulos abaixo de 1:320. Esse resultado também é similar ao

publicado por outros autores que avaliaram diferentes metodologias no diagnóstico da LVC. Akhoundi et al. (2013) ao testar um novo teste de aglutinação com látex associado ao antígeno recombinante A2, obteve 15% de falso-negativos devido aos baixos título de anticorpos nas amostras testadas. Além disso, Mohebbali et al. (2004) já haviam publicado que a sensibilidade do teste de aglutinação direta aumenta de 64,8% em amostras com título de 1:80 para 98% em amostras com título de 1:10240.

A detecção de cães assintomáticos pelas PQs foi bastante superior a àquela obtida pelo DPP® ou pelo ELISA Biomanguinhos, com a detecção de 80% dos soros testados. Esses últimos testes, comprovadamente, não possuem bom desempenho na detecção dos cães supracitados (Faria et al., 2012; Grimaldi et al., 2012). Similar aos nossos dados, Martins et al. (2013) também obtiveram bons resultados com a proteína hipotética recombinante LiHyp1, que detectou 94% dos soros testados de cães com LVC assintomática.

Costa et al. (2013b) verificaram que em áreas onde a taxa de transmissão de LV é alta, com prevalência superior a 3%, os cães assintomáticos devem ser incluídos nas medidas de controle para o sucesso do programa. Nesse contexto, as PQs mostram-se boas ferramentas para essa detecção.

As proteínas quiméricas foram capazes de detectar anticorpos presentes na fase inicial da LVC. A positividade detectada pelas PQs, bem como pela PCR, não foi acompanhada pela detecção por ELISA Biomanguinhos. Conforme já estabelecido, a PCR se torna positiva anteriormente aos testes sorológicos (Quinnell et al., 2001; Oliva et al., 2006). Entretanto, o ELISA realizado com as PQs aparentemente detecta outro tipo de imunoglobulina, que são rapidamente produzidas numa infecção por LVC e têm caráter transiente. Martinez-Subiela et al. (2011) demonstraram que os níveis de IgG total em cães começam a se elevar a partir do segundo mês após infecção experimental, obtendo o mesmo resultado também para IgM. Teoricamente, a partir desse momento, já é possível detectar sorologicamente a infecção, o que ocorreu quando testamos as PQs. Entretanto, poucos trabalhos são encontrados na literatura a respeito da investigação sorológica da infecção por *L. infantum* no seu início. Costa et al. (2013a) puderam detectar a infecção experimental através de ELISA com antígeno bruto em apenas 37% dos cães após 90 dias. De modo similar, Rodríguez-Cortés et al. (2007) detectaram, através do mesmo ensaio, 33,3% dos cães experimentalmente infectados no mesmo período pós-infecção.

A concordância entre os testes realizados com as amostras da coorte (PCR, ELISA Biomanguinhos, PQ10 e PQ20) foi fraca. Dados similares foram obtidos por Dos Santos Marques et al. (2012) ao realizar a concordância entre PCR em tempo real e testes sorológicos (ELISA com antígeno e bruto e ELISA-k39), obtendo valores de kappa $< 0,1$. A diferença entre as características dos métodos parasitológicos, que se baseiam na detecção do DNA do parasito (PCR) e dos métodos sorológicos, que se baseiam na detecção de anticorpos séricos (ELISA Biomanguinhos, PQ10 e PQ20) justificam a fraca concordância. Não era esperada uma boa concordância entre o ELISA Biomanguinhos e as PQs, devido à baixa sensibilidade apresentada pelo primeiro teste (Faria et al., 2012). Entretanto, era de se esperar que as PQs tivessem uma maior concordância entre si. O fato de isso não ter ocorrido pode ter sido devido a diferentes padrões de reconhecimento antigênico que podem existir entre esses antígenos.

Ocorreram reações cruzadas com as proteínas quiméricas, particularmente com a PQ10. Esse resultado é compatível com o desempenho de muitos antígenos recombinantes desenvolvidos nos últimos anos para diagnóstico da LVC e ocorrem devido ao compartilhamento de determinantes antigênicos entre parasitos, particularmente organismos do mesmo gênero. Oliveira et al. (2011) investigaram cinco diferentes proteínas recombinantes para o diagnóstico canino. As sensibilidades variaram entre 67,4% e 93,0%, enquanto as especificidades variaram entre 76,1% e 100%, com índices de reações cruzadas chegando a 23,9%. Pinheiro et al. (2009) relataram o desenvolvimento de uma cisteína proteinase recombinante, que em ELISA fornece sensibilidade de 98% e especificidade de 96%, mas que apresenta reações cruzadas com *B. canis*. Porrozzini et al. (2007), ao testar diferentes antígenos recombinantes, obtiveram sensibilidades de 66% com o k26, 66% com o k39 e 88% com o A2, em cães assintomáticos. As especificidades foram de 90, 85% e 96% respectivamente, também em ELISA. Com todos os antígenos, houve reação cruzada com *L. braziliensis*. Outros trabalhos sequer mostram dados referentes a reações cruzadas com esses patógenos (Cândido et al., 2008; De Souza et al., 2013).

As proteínas quiméricas apresentaram reprodutibilidade moderada em ensaios realizados com um intervalo de 15 meses. Esse resultado foi similar ao apresentado por Pagliari (2013) em que foi investigada a reprodutibilidade do ELISA com o antígeno recombinante ROP2 de *Toxoplasma gondii*. Pode-se atribuir essa reprodutibilidade moderada à degradação dos antígenos, ocorrida nesses 15 meses, uma vez que foram empregadas amostras de um mesmo

lote de expressão protéica. Além disso, o título de anticorpos presentes nos soros pode ter diminuído, também devido ao tempo de armazenamento.

Foi possível observar que as proteínas quiméricas foram imunogênicas quando inoculadas em coelhos. Através do *western blotting* que comparou o soro policlonal antes e após a imunização, verificou-se que os coelhos já possuíam um arsenal de anticorpos que reconhecia as PQs. Entretanto, houve uma exacerbação dessa resposta após as 5 doses das proteínas, o que demonstrou o potencial imunogênico para a resposta humoral das PQs. A reatividade do soro pré-imune em *western blotting* é corroborada pelos dados do ELISA realizado com as PQs e os soros policlonais. Nesses ensaios, também verificou-se reatividade com o soro pré-imune (T0). Esse dado foi discordante em relação ao encontrado na literatura sobre soro policlonal gerado em coelhos imunizados com proteínas recombinantes. Kothari et al. (2006) imunizaram coelhos com uma proteína recombinante derivada de um gene de resistência a drogas de *L. donovani*. Em *western blotting*, houve reatividade com o soro pós-imune, o que não foi observado para o soro pré-imune. De modo semelhante, Diaz-Soto et al. (2012) efetuaram a imunização de coelhos com um peptídeo que compõe a proteína KMP-11 de *T. cruzi*. O soro policlonal pré-imune não reconheceu a banda referente ao peptídeo em *western blotting*, enquanto o soro pós-imune reconheceu fortemente. Talvez a reatividade cruzada que observamos com soro do coelho pré-imune e as PQs seja devido a diversidade de epitopos que compõem essas proteínas. A PQ10, por exemplo, possui epitopos pertencentes a 9 proteínas diferentes.

Foi possível mapear através de ELISA quais peptídeos foram os maiores responsáveis pela reatividade das PQs. Para isso, utilizamos uma metodologia frequentemente empregada por diferentes autores para a identificação dos fragmentos mais imunogênicos de proteínas (Meens et al., 2009; Zander et al., 2007; Larreta et al., 2002). Para a PQ10, foram observados valores mais elevados de absorbâncias para os soros T0 e T6, indicando uma maior antigenicidade dessa proteína em comparação à PQ20. Os seus peptídeos PSLc4, PSLc6 e PSLc9 podem compor, no futuro, uma nova proteína quimérica que poderá ser usada para imunização.

Enquanto a PQ10 pareceu estimular mais intensamente a resposta humoral em coelhos, a PQ20 apresentou o mesmo comportamento, mas em modelo murino. Foi observado que apenas os camundongos imunizados com a PQ20 apresentaram aumento significativo nos níveis de IgG total anti-*Leishmania*. Entretanto, apenas um coelho foi utilizado para produção de anticorpos policlonais anti-PQs. Essa amostra é muito pequena para concluir sobre a variação de resposta

nos diferentes animais. No entanto, esse não seria um achado difícil de explicar baseado na diversidade genotípica e imunológica entre os modelos.

O estímulo da resposta imune celular provocado pelas PQs foi investigado também em dois modelos. A análise *in vitro* do estímulo de PBMC canino demonstrou que houve produção de IFN- γ e IL-10 por essas células quando elas foram estimuladas pelas PQs. Além disso, o resultado obtido em células estimuladas pelo antígeno bruto de *Leshmania* é compatível com o observado na literatura, de que há produção concomitante de IFN- γ e IL-10 (Travi et al., 2009). Entretanto, a análise entre grupos não demonstrou diferença significativa. Isso pode ser explicado pelo número de amostras utilizadas: 5 cães infectadas e 5 não infectados. Todavia, mesmo assim já foi possível observar que as PQs possuem um perfil não protetor para LVC, pois a produção de IFN- γ não supera a produção de IL-10. De acordo com Lage et al. (2007), os níveis de IL-10 apresentam correlação positiva com a progressão da doença na LVC. Além disso, dados obtidos no modelo canino de LV são coerentes com o que ocorre no modelo murino, onde a expressão de IFN- γ é associada ao controle da infecção (Heinzl et al., 1989; Squires et al., 1989).

A imunização com as PQs em modelo murino estimulou a produção de IL-4 por esplenócitos, e houve diferença significativa entre o grupo controle, validando esse resultado. A produção de IFN- γ , no entanto, não foi significativa. Desse modo, podemos afirmar que a imunização com as PQs em modelo murino induziu uma resposta do tipo Th2, sendo favorável à progressão da LV. As PQs estimulam a resposta imune celular, todavia, não é a resposta desejada para proteção da infecção na LV.

De um modo geral, foi possível observar que as PQs parecem não possuir potencial vacinal contra *L. infantum*. Esse resultado era esperado para a PQ10, que foi concebida inicialmente para uso em imunodiagnóstico. Entretanto, a PQ20 foi construída com epitopos para células T, identificados *in silico*, e era esperado um resultado satisfatório quanto à sua imunogenicidade. Isso traz à tona a ineficiência dos softwares de predição, algo já proposto por alguns autores. Gowthaman & Agrewala (2008) verificaram que os programas de predição para células T apresentam diversas inconsistências, e dentre elas, a ineficiência em prever promiscuidade de epitopos. Em camundongos, assim como em humanos, já foi estabelecida a existência de polimorfismos no MHC, estrutura indispensável para a apresentação de antígenos (Roy et al., 1989). Por essa razão, elaboramos a hipótese de que a predição de epitopos para células T incluindo a seleção de sequências mais promíscuas (o que teoricamente poderia burlar o

polimorfismo de MHC), foi inconsistente com a realidade. Portanto, isso poderia justificar os resultados insatisfatórios com relação à imunogenicidade para resposta celular da PQ20.

Devido à inserção de ligantes flexíveis entre os peptídeos que compõe as PQs, nós hipotetizamos que essas proteínas adquiriram uma nova conformação espacial, deixando de ter epitopos lineares (conforme identificados *in silico*) passando a apresentar epitopos descontínuos. Segundo Barlow et al. (1986), mais de 90% dos epitopos para células B são descontínuos. Dessa forma, Sun et al. (2013) reafirmaram essa limitação da predição para epitopos lineares, visto que os *softwares* de predição conformacional não possuem boa performance (Blythe & Flower, 2005; Ponomarenko & Bourne, 2007). Baseado nisso, algumas sequências com elevado *score* de predição *in silico* podem permanecer ocultas na estrutura tridimensional. Isso pode justificar porque a PQ10 e a PQ20 não demonstraram uma performance ideal em imunodiagnóstico, uma vez eram compostas unicamente por bons epitopos para células B. Além disso, a conformação tridimensional também justifica o fato de a PQ20 não ter apresentado bom desempenho em imunogenicidade celular, em adição à justificativa já citada (ineficiência da predição).

7- CONCLUSÕES

Foi possível verificar que a construção das proteínas quiméricas gerou antígenos bastante antigênicos em imunodiagnóstico canino, o que validou a predição de epitopos para células B. Em ELISA, as nossas PQs apresentaram ótimo desempenho, com sensibilidades maiores que 80% e acurácias superiores a 0,82, sendo portanto, bastante aplicáveis em testes de triagem para LVC. Além disso, a detecção de cães assintomáticos e também de cães em fase inicial da infecção, quando apenas a PCR consegue detectar o parasito, é também uma característica promissora e inovadora das PQs aqui desenvolvidas. Quando utilizadas em imunização de animais, as proteínas estimularam a produção de anticorpos, tendo sido a PQ10 mais imunogênica em coelhos e a PQ20 mais imunogênica no modelo murino. Em coelhos, foi possível demonstrar quais os peptídeos são responsáveis pela maior produção de anticorpos em cada proteína. Quanto ao estímulo da resposta imune celular, ele ocorreu de maneira fraca e não direcionada para Th1. Isso fez com que as PQs não fossem caracterizadas como bons alvos vacinais. Desse modo, verificou-se que a predição de epitopos para células T não obteve o desempenho desejado.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abranches P, Campino L, Santos-Gomes GM. 1998. Canine leishmaniasis. New concepts of epidemiology and immunopathology: their impact in the control of human visceral leishmaniasis. *Acta Med Port.* 1(10):871-5.
- Aguilar-Be I, Zardo RS, Paraguai de Souza E, Borja-Cabrera GP, Rosado-Vallado M, Mut-Martin M et al. 2005. Cross-protective efficacy of a prophylactic *Leishmania donovani* DNA vaccine against visceral and cutaneous murine leishmaniasis. *Infect Immun.* 73(2):812–819.
- Aguirre S, Silber AM, Brito ME, Ribone ME, Lagier CM et al. 2006. Design, construction, and evaluation of a specific chimeric antigen to diagnose chagasic infection. *J Clin Microbiol.* 44(10):3768-74.
- Akhoundi B, Mohebbali M, Shojaee S, Jalali M, Kazemi B, Bandehpour M et al. 2013. Rapid detection of human and canine visceral leishmaniasis: assessment of a latex agglutination test based on the A2 antigen from amastigote forms of *Leishmania infantum*. *Exp Parasitol.* 133(3):307-13.
- Alexander J, Brombacher F. 2012. T helper1/T helper 2 cells and resistance/susceptibility to *Leishmania* infection: is this paradigm still relevant? *Front Immunol.* 3(80):1-13.
- Almeida MA, Jesus EE, Sousa-Atta ML. 2005. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasitol.* 127, 227–232.
- Alvar J, Molina R, San Andres M, Tesouro M, Nieto J, Vitutia M et al. 1994. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Ann Trop Med Parasitol.* 88: 371–378.
- Alvar J, Gutierrez-Solar I, Pachon E, Calbacho M, Ramirez R, Valles J et al. 1996. AIDS and *Leishmania infantum*: new approaches for a new epidemiological problem. *Clin Dermatol.* 14:241–246.
- Alvar J, Canavate C, Gutierrez-Solar B, Jimenez M, Laguna F et al. 1997. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev.* 10:298–319.
- Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. 2004. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol.* 57:1-88.
- Alvar J, ID Velez, C Bern, Herrero M, Desjeux P, Cano J et al. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS One.* 7 (5): e3567.
- Alves AS, Mouta-Confort E, Figueiredo FB, Oliveira RV, Schubach AO et al. 2012. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. *Vet Sci.* 93(3):1329-33.
- Alves WA, Bevilacqua PD. 2004. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cad Sal Publ.* 20(1):259-265.
- Badaró R, Benson D, Eulalio MC, Freire MC, Cunha S, Netto EM et al. 1996. rk39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 173, 758–761.
- Baneth G, Aroch I. 2008. Canine leishmaniasis: A diagnostic and clinical challenge. *Vet J.* 175: 14–15.

- Barbosa-de-Deus R, Mares-Guia M, Nunes A, Costa K, Junqueira R, Mayrink W et al. 2002. *Leishmania* major-Like Antigen for Specific and Sensitive Serodiagnosis of Human and Canine Visceral Leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9(6): 1361–1366.
- Barlow DJ, Edwards MS, Thornton JM. 1986. Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. *Nature.*322(6081):747–748.
- Bevilacqua PD. 1999. *Leishmaniose visceral: interesses públicos e interesses privados na construção social de uma epidemia em Belo Horizonte*. Tese (Doutorado) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 343p.
- Blythe MJ, Flower DR. 2005. Benchmarking B cell epitope prediction: underperformance of existing methods. *Protein Science.* 14(1):246–248.
- Boarino A, Scalone A, Gradoni L, Ferroglio E, Vitale F, Zanatta R et al. 2005. Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diag Lab Immun.* 12(5):647–653.
- Borja-Cabrera GP, Correia Pontes NN, da Silva VO, Paraguai-de-Souza E, Santos WR, Gomes EM et al. 2002. Long lasting protection against canine Kala-azar using the FML–QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto RN). *Vaccine.* 20, 3277–3284.
- Borja-Cabrera GP, Cruz Mendes A, Paraguai de Souza E, Hashimoto Okada LY, de A Trivellato FA, Kawasaki JK et al. 2004. Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. *Vaccine.* 22 (17-18): 2234-4.
- Brandonisio O, Carelli G, Ceci L, Consenti B, Fasanella A, Puccini V. 1992. Canine leishmaniasis in the Gargano promontory. *Eur J Epidemiol.* 8(2):273-6.
- Burns JM, Shreffler W, Benson D, Ghalibt H, Badaro R, Reed SG. 1993. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sc.* 90:775-779.
- Camargo-Neves V, Katz G. 1999. Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop.* 32(3): 63-4.
- Camussone C, Gonzalez V, Belluzo MS, Pujato N, Ribone ME et al. 2009. Comparison of Recombinant *Trypanosoma cruzi* Peptide Mixtures versus Multiepitope Chimeric Proteins as Sensitizing Antigens for Immunodiagnosis. *Clin Vaccine Immunol.*16(6):899–905.
- Cândido TC, Perri SHV, Gerzoschkwitz T, Luvizotto MC, de Lima VM. 2008. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on crude and purified antigen in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in symptomatic and oligosymptomatic dogs. *Vet Parasitol.* 157: 175–181.
- Carcelén J, Iniesta V, Fernández-Cotrino J, Serrano F, Parejo JC, Corraliza I et al. 2009. The chimerical multi-component Q protein from *Leishmania* in the absence of adjuvant protects dogs against an experimental *Leishmania infantum* infection. *Vaccine.* 9(43):5964-73.
- Carvalho FAA, Chareste H, Tavares CAP, Matlashewskif G, Valente EP, Rabello A et al. 2002. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 3: 289–295.
- Chamizo C, Moreno J, Alvar J. 2005. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.*103(1-2):67-75.

- Cheng Z, Zhao JW, Sun ZQ, Song YZ, Sun QW, Zhang XY et al. 2011. Evaluation of a novel fusion protein antigen for rapid serodiagnosis of tuberculosis. *J Clin Lab Anal.* 25(5):344-349.
- Coelho EA, Ramírez L, Costa MA, Coelho VT, Martins VT, Chávez-Fumagalli MA et al. 2009. Specific serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis using *Leishmania* species ribosomal protein extracts. *Clin Vaccine Immunol.* 16 (12): 1774-80.
- Coelho VT, Oliveira JS, Valadares DG, Chávez-Fumagalli MA, Duarte MC, Lage OS et al. 2012. Identification of proteins in promastigote and amastigote-like *Leishmania* using an immunoproteomic approach. *PLoS Negl Trop Dis.* 6(1):e1430.
- Cortes S, Rolão N, Ramada J, Campino L. 2004. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* specific kinetoplastid primers. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg.* 98: 12-17.
- Costa CHN, Vieira JBF. 2001. Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 34: 223-228.
- Costa CH. 2008. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saúde Pública.* 24(12):2959-63.
- Costa DJ, Carvalho RM, Abbehusen M, Teixeira C, Pitombo M, Trigo J et al. 2013a. Experimental infection of dogs with *Leishmania* and saliva as a model to study Canine Visceral Leishmaniasis. *PLoS One.* 8(4):e60535.
- Costa DN, Codeço CT, Silva MA, Werneck GL. 2013b. Culling dogs in scenarios of imperfect control: realistic impact on the prevalence of canine visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 7(8):e2355.
- Costa MM, Andrade HM, Bartholomeu DC, Freitas L, Pires SF, Chapeaurouge AD et al. 2011. Analysis of *Leishmania chagasi* by 2-D difference Gel electrophoresis (2-D DIGE) and immunoproteomic: identification of novel candidate antigens for diagnostic tests and vaccine. *J Proteome Res.* 10 (5):2172-84.
- Coura-Vital W, Reis AB, Fausto MA, Leal GG, Marques MJ, Veloso VM, Carneiro M. 2013. Risk factors for seroconversion by *Leishmania infantum* in a cohort of dogs from an endemic area of Brazil. *PLoS One.* 8(8):e71833.
- Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H. 1994. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg.* 50 (3): 296-311.
- Dai J, Jiang M, Wang Y, Qu L, Gong R, Si J. 2012. Evaluation of a recombinant multiepitope peptide for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Vaccine Immunol.* 19(3):338-42.
- Da Costa RT, França JC, Mayrink W, Nascimento E, Genaro O, Campos-Neto A. 2003. Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens K39 and K26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg.* 97: 678-682.
- Da Costa SM, Cechinel M, Bandeira V, Zannuncio JC, Lainson R, Rangel EF. 2007. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil – Mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 102(2):149-153.
- Da Silva VO, Borja-Cabrera GP, Correia Pontes NN, de Souza EP, Luz KG, Palatnik M et al. 2001. A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine Kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto-RN). *Vaccine.* 19 (9-10): 1082–1092.

- Dantas-Torres F, Brandão-Filho SV. 2006. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 48(3):151-156.
- Deak E, Jayakumar A, Cho KW, Goldsmith-Pestana K, Dondji B, Lambris JD et al. 2010. Murine Visceral Leishmaniasis: IgM and Polyclonal B-Cell Activation Lead to Disease Exacerbation. *Eur J Immunol*. 40(5):1355-1368.
- De Almeida A, Sousa VR, Sorte Eda C, Figueredo FB, de Paula DA et al. 2011. Use of parasitological culture to detect *Leishmania (Leishmania chagasi)* in naturally infected dogs. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 11(12):1555-60.
- De Amorim IF, Freitas E, Alves CF, Tafuri WL, Melo MN et al. 2010. Humoral immunological profile and parasitological statuses of Leishmune vaccinated and visceral leishmaniasis infected dogs from an endemic area. *Vet Parasitol*. 11;173(1-2):55-63.
- Deane LM, Deane MP. 1955. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa *Lycalopex vetulus* como reservatórios da *L. donovani* em área endêmica da calazar no Ceará. *Hospital*. 48: 61-70.
- De Lima VM, Fattori KR, Michelin A, da Silveira Neto L, Vasconcelos R. 2010. Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 173(3-4):330-3.
- Desjeux P. 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 95: 239–43.
- Desjeux P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol & Infec Dis*. 27: 305–318.
- De Souza RF, Dos Santos YL, de Souza Vasconcellos R, Borges-Pereira L, Caldas IS, de Almeida MR et al. 2013. Recombinant *Leishmania (Leishmania) infantum* Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase NTPDase-2 as a new antigen in canine visceral leishmaniasis diagnosis. *Acta Trop*. 125(1):60-66.
- De Souza VMM, Julião FS, Neves RCS, Magalhães PB, Bisinotto TV et al. 2008. Community assay for assessment of effectiveness of strategies for prevention and control of human visceral leishmaniasis in the municipality of Feira de Santana, State of Bahia, Brazil. *Epidemiol Serv Saude*. 17: 97–106.
- Diaz-Soto JC, Lasso P, Guzmán F, Forero-Shelton M, Thomas Mdel C, López MC et al. 2012. Rabbit serum against K1 peptide, an immunogenic epitope of the *Trypanosoma cruzi* KMP-11, decreases parasite invasion to cells. *Acta Trop*. 123(3):224-9.
- Dietze R, Barros GB, Teixeira L, Harris J, Michelson K, Falqueto A, Corey R. 1997. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin Infect Dis*. 25, 1240-1242.
- Dipti CA, Jain SK, Navin K. 2006. A novel recombinant multiepitope protein as a hepatitis C diagnostic intermediate of high sensitivity and specificity. *Protein Expr Purif*. 47(1):319-28.
- Dos Santos Marques LH, Gomes LI, da Rocha ICM, da Silva TAM, Oliveira E et al. 2012. Low Parasite Load Estimated by qPCR in a Cohort of Children Living in Urban Area Endemic for Visceral Leishmaniasis in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 6(12): e1955.
- Dye C. 1996. The logic of visceral leishmaniasis control. *Am J Trop Med Hyg*. 55:125–130.

- Evans TG, Vasconcelos IA, Lima JW, Teixeira JM, McAullife IT, Lopes UG et al. 1990. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assessment of serodiagnostic methods. *Am J Trop Med Hyg.* 42:118–123.
- Ezra N, Ochoa MT, Craft N. 2010. Human immunodeficiency virus and leishmaniasis. *J Glob Infect Dis* 2: 248–257.
- Faria AR, Costa MM, Giusta MS, Grimaldi G Jr, Penido ML, Gazzinelli RT et al. High-throughput analysis of synthetic peptides for the immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(9):e1310.
- Faria AR, Andrade HM. 2012. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. *Rev Pan-Amaz Saude.* 3(2):47-57.
- Fernandes AP, Costa MM, Coelho EAF, Michalick M, Freitas E, Melo MN, Tafuri WL et al. 2008. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine.* 26 (46):5888–5895.
- Ferreira SA, Almeida GG, Silva SdO, Vogas GP, Fujiwara RT et al. 2013. Nasal, Oral and Ear Swabs for Canine Visceral Leishmaniasis Diagnosis: New Practical Approaches for Detection of *Leishmania infantum* DNA. *PLoS Negl Trop Dis* 7(4): e2150.
- Galletti E, Bonilauri P, Bardasi L, Fontana MC, Ramini M, Renzi M et al. 2011. Development of a minor groove binding probe based real-time PCR for the diagnosis and quantification of *Leishmania infantum* in dog specimens. *Res Vet Sci.* 91:243-245.
- Garcia VS, Gonzalez VD, Caudana PC, Vega JR, Marcipar IS, Gugliotta LM. 2013. Synthesis of latex-antigen complexes from single and multiepitope recombinant proteins. Application in immunoagglutination assays for the diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 1;101:384-91.
- Garg R, Dube A. 2006. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *Indian J Med Res.* 123(3):439-454.
- Genaro O, Mayrink W, Michalick M, Dias M, Costa CA. 1988. Naturally occurring visceral leishmaniasis in dogs: clinical aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 83:43.
- Genaro O, Pinto JA, Costa CA, França-Silva JC, Silva JC, Sanguinetti LSR et al. 1996. Phase III randomized double blind clinical trial of the efficacy of a vaccine against canine visceral leishmaniasis in urban area of Montes Claros, MG, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 91 (Suppl) 166.
- Ghandour AM, Tricker K, Doenhoff MJ, Al-Robai AA, Banaja AA. 1997. An enzyme-linked immunosorbent assay using *Schistosoma mansoni* purified egg antigen for the diagnosis of schistosomiasis in Saudi Arabia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 91(3):287-9.
- Gomes AC, Coutinho S, Paim G, Oliveira S, Galati E, Nunes M et al. 1990. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 8-Avaliação da atividade enzoótica da *Leishmania (Viannia) braziliensis* em ambiente florestal e peridomiciliar, região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 32 (2):105-115.
- Gomes YM, Cavalcanti MP, Lira RA, Abath FG, Alves LC. 2008. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. *Vet J.* 175: 45–52.
- Gomes-Solecki M, Dunn J, Luft B, Castillo J, Dykhuizen D et al. 2000. Recombinant Chimeric *Borrelia* Proteins for Diagnosis of Lyme Disease. *J Clin Microbiol.* 38(7):2530–2535.
- Gontijo CMF, Melo MN. 2004. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol.* 7 (3): 338-349

- Gradoni L. 2001. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. *Vet Parasitol.* 100(1–2):87-103.
- Gradoni L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: Canine leishmaniasis: moving towards a solution, 2002. *Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum.* Sevilha: [s.n.], 2002, p. 7-14.
- Greiner M, Pfeiffer D, Smith RD. 2000. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev Vet Med.* 45: 23-41.
- Grimaldi JG, Tesh RB. 1993. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Rev Clin Microbiol.* 6: 230-250.
- Grimaldi JG, Teva A, Ferreira A, Santos C, Pinto I, de-Azevedo C et al. 2012. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 106(1):54-9.
- Gowthaman U, Agrewala J. 2008. In Silico Tools for Predicting Peptides Binding to HLA-Class II Molecules: More Confusion than Conclusion. *J Prot Res.* 7:154–163.
- Harith AE, Kolk AH, Kager PA, Leeuwenburg J, Faber FJ, Muigai R et al. 1987. Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 81(4):603-6.
- Heinzl FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM. 1989. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med.* 169(1):59-72.
- Herwaldt BL. 1999. Leishmaniasis. *Lancet.* 354: 1191–99.
- <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>
- <http://portalpbh.pbh.gov.br/>
- <http://who.int/leishmaniasis/burden/en/>
- <http://www.who.int/tdr/diseases/default.html>
- Killick-Kendrick R. 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol.* 17(3): 279–289.
- Kothari H, Kumar P, Singh N. 2006. Prokaryotic expression, purification, and polyclonal antibody production against a novel drug resistance gene of *Leishmania donovani* clinical isolate. *Protein Expression and Purification.* 45:15–21.
- Lage RS, Oliveira GC, Busek SU, Guerra LL, Giunchetti RC, Corrêa-Oliveira R et al. 2007. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol.* 115(1-2):135-45.
- Lainson R, Shaw JJ. 1978. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. *Nature.* 22(273):595-600.
- Lainson R, Rangel EF. 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 100(8): 811-827.
- Landis JR, Koch GG. 1977. An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. *Biometrics.* 33(2):363–374.

- Larreta R, Guzman F, Patarroyo ME, Alonso C, Requena JM. 2002. Antigenic properties of the *Leishmania infantum* GRP94 and mapping of linear B-cell epitopes. *Immunol Lett.* 80: 199–205.
- Laufs H, Müller K, Fleischer J, Reiling N, Jahnke N et al. 2002. Intracellular Survival of *Leishmania major* in Neutrophil Granulocytes after Uptake in the Absence of Heat-Labile Serum Factors. *Infec Immun.* 70 (2): 826–835.
- Laurenti MD, Rossi CN, da Matta VL, Tomokane TY, Corbett CE, Secundino NF et al. 2013. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. *Vet Parasitol.* 196(3-4):296-300.
- Lira RA. 2005. *Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: Avaliação do Desempenho dos Kits EIE-Leishmaniose-Visceral- Canina-Bio-Manguinhos e IFI-Leishmaniose-Visceral- Canina-Bio-Manguinhos.* Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ. Recife, 87p.
- Louis JA, Conceição-Silva F, Himmelrich H, Tacchini-Cottier F, Launois P.1998. Anti-leishmania effector functions of CD4+ Th1 cells and early events instructing Th2 cell development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Adv Exp Med Biol.* 452:53-60.
- Luciano RM, Lucheis SB, Troncarelli MZ, Luciano DM, Langoni H. 2009. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). *Braz J Vet Res Anim Sci.* 46(3):181-187
- Madeira MF, Figueiredo FB, Pinto AG, Nascimento LD et al. 2009.Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? *Res Vet Sci.* 87(2):260–262.
- Maia-Elkhoury A, Alves W, Sousa-Gomes M, Sena J, Luna E. 2008. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saú Públ.* 24 (12): 2941-2947.
- Maia C, Campino L. 2008. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol.* 158, 274–287.
- Marcondes M, de Lima VM, de Araújo M, Hiramoto RM, Tolezano JE, Vieira RF, Biondo AW. 2013.Longitudinal analysis of serological tests officially adopted by the Brazilian Ministry of Health for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in dogs vaccinated with Leishmune®. *Vet Parasitol.*197(3-4):649-52.
- Marinkelle CJ. 1980. The control of leishmaniasis. *Bull World Health Organ.* 58(6):807-818.
- Margonari C, Freitas CR, Ribeiro RC, Moura ACM, Timbó M, Gripp AH et al. 2006. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 101(1): 31-38.
- Martinez-Subiela S, Strauss-Ayalib D, Ceróna JJ, Baneth G. 2011. Acute phase protein response in experimental canine leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 180:197–202.
- Martins VT, Chávez-Fumagalli MA, Costa LE, Martins AM, Lage PS, Lage DP et al. 2013. Antigenicity and Protective Efficacy of a *Leishmania* Amastigote-specific Protein, Member of the Superoxygenase Family, against Visceral Leishmaniasis. *PLOS Negl Trop Dis.* 7(3):e2148.
- Marzochi MCA, Marzochi KBF. 1997. Leishmanioses em áreas urbanas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 30 (1):162-165.

- Maurício IL, Stothard JR, Miles MA. 2000. The Strange Case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today*. 16 (5): 188-189.
- Mayrink W, Genaro O, França-Silva JC, da Costa RT, Tafuri WF, Toledo VP et al. 1996. Phase I and II open clinical trials of a vaccine against *Leishmania chagasi* infections in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 91, 695–697.
- Meens J, Bolotin V, Frank R, Bohmer J, Gerlach GF. 2009. Characterization of a highly immunogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* lipoprotein Mhp366 identified by peptide-spot array. *Vet Microbiol*. 142:293-302.
- Mendes TA, Reis Cunha JL, de Almeida Lourdes R, Rodrigues Luiz GF, Lemos LD, dos Santos AR et al. 2013. Identification of strain-specific B-cell epitopes in *Trypanosoma cruzi* using genome-scale epitope prediction and high-throughput immunoscreening with peptide arrays. *PLoS Negl Trop Dis*. 7(10):e2524.
- Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, 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. *J Clin Microbiol*. 43 (11): 5515–5519.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota técnica Vacina Anti-Leishmaniose Visceral Canina: Leishmune®. Brasília, Brasil; 2005.
- Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, Brasília, Brasil, 120 p., 2006.
- Miralles GD, Stoeckle MY, McDermott DF, Finkelman FD, Murray HW. 1994. Induction of Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun*. 62, 1058-1063.
- Mohebbali M, Taran M, Zarei Z. 2004. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rk39 test and direct agglutination. *Vet Parasitol*. 121(3-4): 239–245.
- Molano I, Alonso MG, Mirón C, Redondo E, Requena JM, Soto M et al. 2003. A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*. *Vet Immunol and Immunopathol*. 92(1–2):1-13.
- Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andrés M, González F, Castillo JA et al. 1994. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 88 (4): 491-3.
- Moncaz A, Faiman R, Kirstein O, Warburg A. 2012. Breeding Sites of *Phlebotomus sergenti*, the Sand Fly Vector of Cutaneous Leishmaniasis in the Judean Desert. *PLoS Negl Trop Dis* 6(7): e1725.
- Moreno J, Alvar J. 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol*. 18: 399–405.
- Moreno J, Vouldoukis I, Martin V, McGahie D, Cuisinier AM, Gueguen S. 2012. Use of a LiESP/QA-21 Vaccine (CaniLeish) Stimulates an Appropriate Th1-Dominated Cell-Mediated Immune Response in Dogs. *Plos Negl Trop Dis*. 6(6):e1683.
- Müller K, van Zandbergen G, Hansen B, Laufs H, Jahnke N, Solbach W et al. 2001. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. *Med Microbiol Immunol*. 190 (1-2):73-6.

- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. 2005. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*. 9(6): 255–262.
- Nicolato R, Abreu R, Roatt B, Aguiar-Soares R, Reis L, Carvalho M et al. 2013. Clinical Forms of Canine Visceral Leishmaniasis in Naturally *Leishmania infantum*-Infected Dogs and Related Myelogram and Hemogram Changes. *Plos One*. 8(12):e82947.
- Nunes CM, Lima VM, de Paula H, Perri SH, Andrade AM, Dias FE, Burattini MN. 2008. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol*.153, 19–23.
- Nunes CM, Pires MM, da Silva KM, Assis FD, Filho JG, Perri S. 2010. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. *Vet Parasitol*.28; 170:131-3.
- Oliva G, Scalone A, Foglia Manzillo V, Gramiccia M, Pagano A et al. 2006. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J Clin Microbiol*. 44: 1318–1322.
- Oliveira GG, Magalhães FB, Teixeira MC, Pereira AM, Pinheiro CG, Santos LR 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. *Am J Trop Med Hyg*. 85(6):1025-34.
- Pagliari S. 2013. *Avaliação do antígeno recombinante ROP2 do Toxoplasma gondii no ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos IgG e IgM em soro humano*. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 57 p.
- Palatnik CB, Borojevic R, Previato JO, Mendonça-Previato L. 1989. Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote internalization into murine macrophages by chemically defined parasite glycoconjugate ligands. *Infect Immun*. 57, 754–763.
- Palatnik-de-Souza CB, Santos WR, França-Silva JC, Costa RT, Reis AB, Palatnik M et al. 2001. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 65 (5): 510–517.
- Palatnik-de-Souza CB, Day MJ. 2011. One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasit Vectors*.4:197.
- Pavli A, Maltezou HC. 2010. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. *Int J Infect Dis*. 14(12): e1032-e1039.
- Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S et al. 2008. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*. 321(5891):970-4.
- Pinheiro PH, Pinheiro AN, Ferreira JHL, Costa FA, Katz S, Barbiéri CL. 2009. A recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* as an antigen for delayed-type hypersensitivity assays and serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*.162:32–39.
- Pinto AJ, Figueiredo MM, Amorim IF, Pozzebon BG, Ribeiro VM, Tafuri WL. 2013. Colonoscopia no diagnóstico de leishmaniose visceral canina – revisão de literatura. *Clínica Veterinária*. 102:102-112.

- Ponomarenko JV, Bourne PE. 2007. Antibody-protein interactions: benchmark datasets and prediction tools evaluation. *BMC Structural Biology*. 7:64.
- Poot J, Janssen LH, van Kasteren-Westerneng T, van der Heijden-Liefkens K, Schijnsa V, Heckeroth A. 2009. Vaccination of dogs with six different candidate leishmaniasis vaccines composed of a chimerical recombinant protein containing ribosomal and histone protein epitopes in combination with different adjuvants. *Vaccine*. 27(33):4439–4446.
- Porrozzi R, Costa MV, Teva A, Falqueto A, Ferreira A, Santos CD et al. 2007. Comparative Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clin Vacc Immunol*. 14 (5): 544–548.
- Quaresma P, Murta S, Ferreira E, de Rocha-Lima A, Xavier A, Gontijo C. 2009. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Trop*. 111(3):289–294.
- Queiroz NM, Assis J, Oliveira TM, Machado R, Nunes C, Starke-Buzetti W. 2010. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. *Rev Bras Parasitol Vet*. 19(1):32-38.
- Quinnell RJ, Courtenay O. 2009. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*. 136(14):1915–1934.
- Quinnell RJ, Courtenay O, Davidson S, Garcez L, Lambson B, Ramos P et al. 2001. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology*. 122(3):253–261.
- Rabello A, Orsini M, Disch J. 2003. *Leishmania*/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. *Ann Trop Med Parasitol*. 97(1):17-28.
- Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, França-Silva JC et al. 2006. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci*. 81: 68–75.
- Reis AB, Giunchetti RC, Carrillo E, Martins-Filho OA, Moreno J. 2010. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends Parasitol*. 26(7):341-9.
- Rezende CM, Silva MR, Santos IG, Silva GA, Gomes DA, Goes AM. 2011. Immunization with rP22 induces protective immunity against *Schistosoma mansoni*: effects on granuloma down-modulation and cytokine production. *Immunol Lett*. 141(1):123-33.
- Roatt BM, Aguiar-Soares RD, Vitoriano-Souza J, Coura-Vital W, Braga SL, Corrêa-Oliveira R et al. 2012. Performance of LBSap Vaccine after Intradermal Challenge with *L. infantum* and Saliva of *Lu. longipalpis*: Immunogenicity and Parasitological Evaluation. *Plos One*. 7(11): e49780.
- Rodríguez-Cortés A, Ojeda A, Lopez-Fuertes L, Timon M, Altet L, Solano-Gallego L et al. 2007. A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. *Int J Parasitol*. 37(6):683–693.
- Romero G, Boelaert M. 2010. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America—A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis*. 4(1) e584.

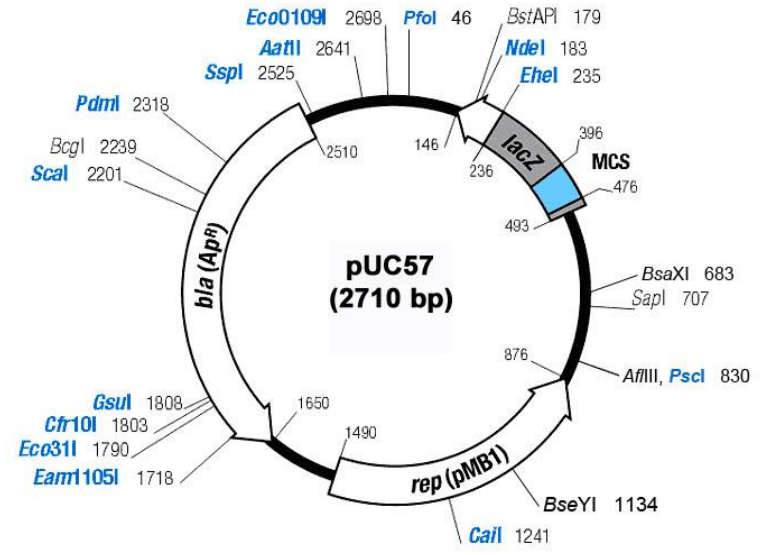
- Ronet C, Hauyon-LaTorre Y, Revaz-Breton M, Mastelic B, Tacchini Cottier F, Louis J et al. 2010. Regulatory B cells shape the development of Th2 immune responses in BALB/c mice infected with *Leishmania major* through IL-10 production. *J Immunol.* 184(2):886–894.
- Rosário EY, Genaro O, França-Silva JC, da Costa RT, Mayrink W, Reis AB. 2005. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 100(2): 197-203.
- Roy S, Scherer MT, Briner TJ, Smith JA, Geftner ML. 1989. Murine MHC polymorphism and T cell specificities. *Science.* 244(4904):572-5.
- Sacks D, Kamhawi S. 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol.* 55:453–83.
- Saljoughian N, Taheri T, Zahedifard F, Taslimi Y, Doustdari F, Bolhassani A et al. 2013. Development of Novel Prime-Boost Strategies Based on a Tri-Gene Fusion Recombinant *L. tarentolae* Vaccine against Experimental Murine Visceral Leishmaniasis. *PLOS Negl Trop Dis.* 7(4):e2174.
- Santarém N, Silvestre R, Cardoso L, Schallig H, Reed SG et al. 2010. Application of an improved enzyme-linked immunosorbent assay method for serological diagnosis of canine leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 48(5):1866-74.
- Scalone A, Luna R, Oliva G, Baldi L, Satta G, Vesco G et al. 2002. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Parasitol.* 104(4):275–285.
- Schallig H, Schoone G, Beijer E, Kroon C, Hommers M, Özbel Y et al. 2002. Development of a fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs. *Vet Parasitol.* 109,1–8.
- Scott P, Scharon T. 1994. Interaction between the innate and the acquired immune system following infection of different mouse strains with *Leishmania major*. *Ann N Y Acad Sci.* 730(15):84-92.
- Secretaria de Estado da Saúde. 2012. Estado de Santa Catarina. Guia De Orientação Para Vigilância De Leishmaniose Visceral Canina. *Gerência de Vigilância de Zoonoses e Entomologia.*
- Sevinc F, Guler L, Sevinc M, Ekici OD, Isik N. 2013. Determination of immunoreactive proteins of *Babesia ovis*. *Vet Parasitol.* 198(3-4):391-5.
- Silva AR, Taui PL, Cavalcante MN, Medeiros MN, Pires BN, Gonçalves E. 2008. Situação epidemiológica da leishmaniose visceral, na Ilha de São Luís, Estado do Maranhão. *Rev Soc Bras Med Trop.* 41(4):358-364.
- Silva MV 2005. *Avaliação de testes sorológicos para Leishmaniose visceral canina utilizando coleta de amostra sanguínea em papel de filtro*, Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 193 p.
- Silva FS. 2007. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. *Revista Tropica – Ciências Agrárias e Biológicas.* 1 (1): 20-31
- Silva SM. 2007. *Avaliação clínica e laboratorial de cães naturalmente infectados por Leishmania (Leishmania) chagasi (Cunha & Chagas, 1937), submetidos a um protocolo terapêutico em clínica veterinária de Belo Horizonte.* Dissertação (Mestrado em

Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 133 p.

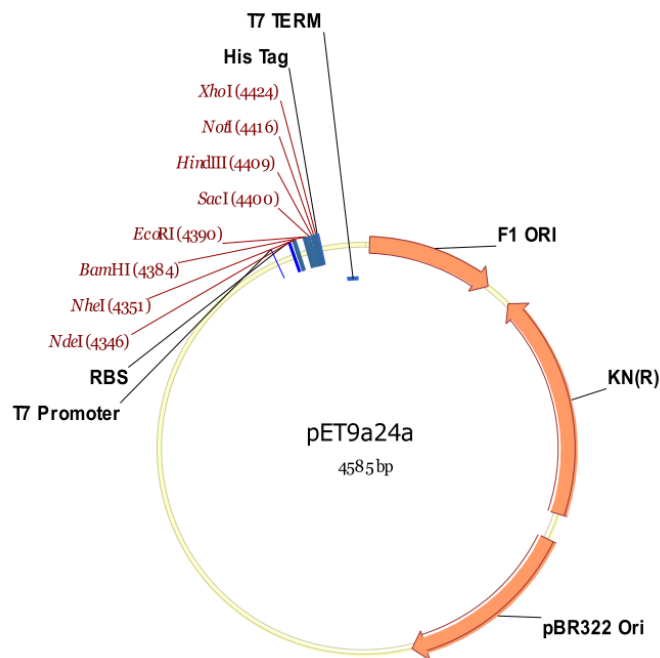
- Silveira FT, Lainson R, Corbett C. 2004. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 99(3): 239-251.
- Soto M, Requena JM, Quijada L, Alonso C. 1998. Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 36 (1): 58–63.
- Squires KE, Schreiber RD, McElrath MJ, Rubin BY, Anderson SL, Murray HW. 1989. Experimental visceral leishmaniasis: role of endogenous IFN-gamma in host defense and tissue granulomatous response. *J Immunol*. 143(12):4244-9.
- Sundar S, Rai M. 2002. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Clin Diag Lab Immunol*. 9 (5): 951–958.
- Sun P, Ju H, Liu Z, Ning Q, Zhang J, Zhao X et al. 2013 Bioinformatics resources and tools for conformational B-cell epitope prediction. *Comput Math Methods Med*. (2013):1-11.
- Swets JA. 1988. Measuring the Accuracy of Diagnostic Systems. *Science*. 240(4857): 1285 – 1293.
- Tolezano JE, Luvizotto MCR, Uliana SRB, Araújo MFL, Taniguchi HH, Barbosa JAR et al. 1999. Leishmaniose visceral americana (LVA) em Araçatuba, região Oeste do Estado de São Paulo. Investigações laboratoriais e diagnóstico de uma doença emergente em terras paulistas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 32 (Supl): 218.
- Travi BL, Osorio EY, Saldarriaga OA, Cadena H, Tabares CJ, Peniche A et al. 2009. Clinical, Parasitologic, and Immunologic Evolution in Dogs Experimentally Infected with Sand Fly-Derived *Leishmania chagasi* Promastigotes. *Am J Trop Med Hyg*. 6(81):994-1003.
- Trinchieri G, Rengaraju M, D'Andrea A, Valiante NM, Kubin M, Aste M et al. 1993. Producer cells of interleukin 12. *Immunol Today*. 14(5):237-8.
- Tripathi NK, Shrivastva A, Pattnaik P, Parida M, Dash PK et al. 2007. Production of IgM specific recombinant dengue multiepitope protein for early diagnosis of dengue infection. *Biotechnol Prog*. 23(2):488-93.
- Wawegama NK, Browning GF, Kanci A, Marena MS, Markham PF. 2013. Development of a recombinant protein based ELISA for diagnosis of *Mycoplasma bovis* infection in cattle. *Clin Vaccine Immunol*. 2013, Dec 11. [Epub ahead of print]
- World Health Organization. 2010. Control of the leishmaniasis. World Health Organ Tech Rep Ser. (949):xii–xiii, 1–186.
- Zander H, Reineke U, Schneider-Mergener J, Skerra A. 2007. Epitope mapping of the neuronal growth inhibitor Nogo-A for the Nogo receptor and the cognate monoclonal antibody IN-1 by means of the SPOT technique. *J Mol Recognit*. 20: 185–196.

9 – ANEXOS

9.1 – Plasmídeos utilizados na clonagem e na expressão das proteínas quiméricas



Plasmídeo pUC57



Plasmídeo pET9a24a

9.2 - Resultados dos testes diagnósticos realizados em amostras de soro canino provenientes de 3 diferentes coletas.

Amostras que iniciaram a coorte com resultado PCR negativo					
Cão	Coletas	Resultados			
		PCR	ELISA Biomanguinhos	PQ10	PQ20
1	Tempo 0	n	n	p	p
	12 meses	p	n	n	p
	18 meses	p	n	n	n
2	Tempo 0	n	n	p	p
	12 meses	p	n	n	n
	18 meses	p	n	n	n
3	Tempo 0	n	n	p	p
	12 meses	p	n	p	p
	18 meses	p	n	n	n
4	Tempo 0	n	n	p	p
	12 meses	p	n	n	p
	18 meses	p	n	p	n
5	Tempo 0	n	n	p	p
	12 meses	p	n	n	n
	18 meses	n	n	n	n
6	Tempo 0	n	n	n	n
	12 meses	p	n	n	n
	18 meses	p	n	n	n
7	Tempo 0	n	n	p	p
	12 meses	p	n	n	n
	18 meses	p	n	p	n

Amostras que iniciaram a coorte com resultado PCR positivo					
Cão	Coletas	Resultados			
		PCR	ELISA Biomanguinhos	PQ10	PQ20
A	Tempo 0	p	n	n	p
	12 meses	p	n	n	p
	18 meses	p	n	p	n
B	Tempo 0	p	n	n	n
	12 meses	p	n	n	n
	18 meses	p	p	n	n
C	Tempo 0	p	n	p	p
	12 meses	p	n	n	n
	18 meses	p	n	n	n
D	Tempo 0	p	n	p	n
	12 meses	p	n	n	p
	18 meses	p	n	p	p
E	Tempo 0	p	n	p	p
	12 meses	p	n	n	n
	18 meses	p	n	p	n
F	Tempo 0	p	n	p	n
	12 meses	p	n	n	n
	18 meses	p	n	n	n
G	Tempo 0	p	n	n	p
	12 meses	p	n	p	p
	18 meses	p	n	n	n

8	Tempo 0	n	n	p	p
	12 meses	n	n	n	p
	18 meses	p	n	n	p
9	Tempo 0	n	n	n	n
	12 meses	n	n	p	p
	18 meses	p	n	n	n
10	Tempo 0	n	n	n	n
	12 meses	p	n	p	n
	18 meses	p	n	n	n
11	Tempo 0	n	n	n	p
	12 meses	p	n	n	p
	18 meses	p	n	n	n
12	Tempo 0	n	n	n	n
	12 meses	p	n	p	n
	18 meses	n	n	n	n
13	Tempo 0	n	n	p	p
	12 meses	p	n	p	n
	18 meses	p	n	p	n
14	Tempo 0	n	n	p	p
	12 meses	p	n	p	p
	18 meses	p	n	n	n
15	Tempo 0	n	n	p	p
	12 meses	p	n	p	p
	18 meses	p	n	n	p
16	Tempo 0	n	n	n	n
	12 meses	p	n	p	n
	18 meses	p	n	n	n

H	Tempo 0	p	n	p	n
	12 meses	p	n	p	p
	18 meses	p	p	p	p
I	Tempo 0	p	n	n	p
	12 meses	p	n	p	p
	18 meses	p	n	n	p
J	Tempo 0	p	n	n	n
	12 meses	p	n	p	p
	18 meses	p	n	n	n
K	Tempo 0	p	n	n	n
	12 meses	p	n	p	p
	18 meses	p	n	n	n
L	Tempo 0	p	n	n	p
	12 meses	p	n	p	p
	18 meses	p	n	n	n
M	Tempo 0	p	n	n	n
	12 meses	p	n	n	n
	18 meses	p	n	n	n
N	Tempo 0	p	n	n	n
	12 meses	p	n	n	n
	18 meses	p	n	n	n
O	Tempo 0	p	n	n	n
	Tempo 0	n	n	p	n
	12 meses	n	n	n	n
P	Tempo 0	p	n	n	p
	12 meses	p	n	p	n
	18 meses	p	n	n	n

17	Tempo 0	n	n	n	p
	12 meses	p	n	p	p
	18 meses	p	n	n	p
18	Tempo 0	n	n	n	p
	12 meses	p	n	p	p
	18 meses	p	n	n	p
19	Tempo 0	n	n	p	p
	12 meses	p	n	p	p
	18 meses	p	n	n	n
20	Tempo 0	n	n	n	p
	12 meses	p	n	n	p
	18 meses	p	n	n	p
21	Tempo 0	n	n	n	n
	12 meses	p	n	p	n
	18 meses	p	n	p	n
22	Tempo 0	n	n	p	n
	12 meses	p	n	p	n
	18 meses	p	p	p	n
23	Tempo 0	n	n	p	p
	12 meses	p	n	n	n
	18 meses	n	n	n	n
24	Tempo 0	n	n	n	n
	12 meses	p	n	n	n
	18 meses	n	n	n	n
25	Tempo 0	n	n	n	p
	12 meses	p	n	n	p
	18 meses	n	n	n	n

Q	Tempo 0	p	n	p	p
	12 meses	p	n	p	p
	18 meses	p	n	n	n
R	Tempo 0	p	n	p	p
	12 meses	p	n	p	p
	18 meses	p	p	p	p
S	Tempo 0	p	n	n	p
	12 meses	p	n	p	p
	18 meses	p	n	n	p
T	Tempo 0	p	n	n	p
	12 meses	p	n	n	n
	18 meses	p	n	n	n
U	Tempo 0	p	n	n	n
	12 meses	p	n	p	p
	18 meses	p	n	n	n
V	Tempo 0	p	n	n	p
	12 meses	p	n	n	n
	18 meses	p	n	n	n
W	Tempo 0	p	n	p	n
	12 meses	p	n	p	n
	18 meses	p	p	n	p
X	Tempo 0	p	n	n	p
	12 meses	p	n	p	n
	18 meses	p	n	n	n
Y	Tempo 0	p	n	p	n
	12 meses	p	n	n	n
	18 meses	p	n	n	n

26	Tempo 0	n	n	n	n
	12 meses	p	n	p	p
	18 meses	p	n	n	n
27	Tempo 0	n	n	p	p
	12 meses	p	n	p	p
	18 meses	p	n	p	p
28	Tempo 0	n	n	n	n
	12 meses	p	n	p	p
	18 meses	p	n	n	n
29	Tempo 0	n	n	n	p
	12 meses	p	n	p	n
	18 meses	p	n	n	n
30	Tempo 0	n	n	p	p
	12 meses	p	n	p	p
	18 meses	p	n	p	p
31	Tempo 0	n	n	p	p
	12 meses	p	n	p	n
	18 meses	p	n	n	n
32	Tempo 0	n	n	n	n
	12 meses	p	n	n	n
	18 meses	p	n	n	n
33	Tempo 0	n	n	p	n
	12 meses	p	n	p	p
	18 meses	p	n	n	n
34	Tempo 0	n	n	n	n
	12 meses	p	n	n	p
	18 meses	p	n	n	n

Z	Tempo 0	p	n	n	n
	12 meses	p	n	p	p
	18 meses	p	n	n	n
AA	Tempo 0	p	n	p	p
	12 meses	p	n	p	p
	18 meses	p	n	n	p
BB	Tempo 0	p	n	p	p
	12 meses	p	n	p	p
	18 meses	n	n	n	p
CC	Tempo 0	p	n	p	n
	12 meses	p	n	n	p
	18 meses	p	n	n	n
DD	Tempo 0	p	n	p	p
	12 meses	p	n	p	p
	18 meses	p	n	p	n
EE	Tempo 0	p	n	n	n
	12 meses	p	n	p	n
	18 meses	p	n	p	n
FF	Tempo 0	p	n	n	p
	12 meses	p	n	n	n
	18 meses	p	n	n	n
GG	Tempo 0	p	n	n	p
	12 meses	p	n	p	n
	18 meses	p	n	n	n
HH	Tempo 0	p	n	n	n
	12 meses	p	n	p	p
	18 meses	p	n	n	p

35	Tempo 0	n	n	p	n
	12 meses	p	n	n	n
	18 meses	p	n	n	n
36	Tempo 0	n	n	p	p
	12 meses	p	n	p	p
	18 meses	p	n	p	n
37	Tempo 0	n	n	n	p
	12 meses	p	n	p	n
	18 meses	p	n	p	n
38	Tempo 0	n	n	n	n
	12 meses	p	p	p	n
	18 meses	p	p	p	n
39	Tempo 0	n	n	p	p
	12 meses	p	n	p	n
	18 meses	p	n	p	p
40	Tempo 0	n	n	n	p
	12 meses	p	n	p	p
	18 meses	p	n	p	p
41	Tempo 0	n	n	p	p
	12 meses	p	n	p	p
	18 meses	p	n	p	p
42	Tempo 0	n	n	p	p
	12 meses	p	p	n	p
	18 meses	p	n	p	p

n: negativo

p: positivo

II	Tempo 0	p	n	p	p
	12 meses	p	n	n	p
	18 meses	p	n	p	p
JJ	Tempo 0	p	n	p	p
	12 meses	p	n	n	n
	18 meses	p	n	n	p
KK	Tempo 0	p	n	p	p
	12 meses	p	n	p	p
	18 meses	p	n	p	n
LL	Tempo 0	p	n	n	p
	12 meses	p	n	p	n
	18 meses	p	n	n	p