

Wanderley Almeida Ferreira

**Identificação e Caracterização Parcial de Antígenos
Isolados de Vacinas Contra Leishmaniose
Tegumentar Americana (Leishvacin[®])**

Tese apresentada ao Curso de pós-graduação do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

**Belo Horizonte – Brasil
2002**

Orientador: Professor Dr. CARLOS ALBERTO PEREIRA TAVARES.

Co-orientador: Professor Dr. MARCOS LUIZ DOS MARES GUIA.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Imunologia de Parasitos do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade federal de Minas gerais, com a colaboração financeira dos seguintes instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento do Ensino Superior (CAPES);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Bioquímica do Brasil S / A (BIOBRÁS).

Aos meus filhos

João Pedro e Carlos Miguel;

A meus pais

João (*in memoriam*) e Francisca;

Aos meus irmãos

Tone, Bete, Luca, Tuca, Bitinho e Solange.

A aquele que não vemos mas, sabemos, nos acompanha...

AGRADECIMENTOS.

Agradeço ao meu Orientador Professor Doutor Carlos Alberto Pereira Tavares (Beto) pela paciência e pelas importantes colocações, não só de cunho científico mas também pessoal, que trocamos ao longo deste trabalho. Mais que um orientador, acredito que durante nossa convivência tive o prazer de discutir Ciência com um amigo.

Ao Professor Doutor Marcos Luiz dos Mares guia, meu orientador de mestrado e co-orientador neste trabalho de doutoramento, pelas raras mas indispensáveis colocações sobre este estudo.

Devo agradecer ainda:

Ao Professor Doutor Marcelo Porto Bemquerer pelas importantes discussões e sugestões dadas, não só durante o meu exame de qualificação, mas ao longo toda a execução deste trabalho.

A Professora Doutora Maria Norma de Melo pelas importantes discussões e sugestões dadas durante o exame de qualificação, sobretudo as contribuições relativas à discussão correta no Universo da Parasitologia.

Ao Professor Doutor Wilson Mayrink não só pelo fornecimento dos soros especiais usados neste trabalho, mas também pelas valiosas discussões que travamos em momentos importantes deste estudo. Agradeço aqui, ainda, todos os professores do Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Parasitologia desta Instituição, em especial o Dr. Odair Genaro e o Dr. Alexandre Barbosa Reis.

Ao Professor Doutor Ricardo José Alves do Laboratório de Pesquisa Bioquímica da Escola de Farmácia da UFMG, peça imprescindível para o meu entendimento sobre o universo da química de carboidratos.

Ao Professor Doutor Fernando Carazza do Departamento de Química da UFMG, por ter aberto seu laboratório para que pudéssemos realizar os experimentos de espectroscopia no infravermelho e, pelas valiosas discussões que travamos.

Ao Professor Doutor Marcelo Matos Santoro pelas orientações e sugestões dadas durante este estudo, no Departamento e fora dele.

A Professora Rosângela Barbosa de Deus da Escola de Farmácia da UFOP pelas importantes contribuições durante a execução dos ensaios de Elisa e de “western blotting”.

A Kátia Moraes pelo importante auxílio técnico dado a mim no início deste trabalho, apoio sem o qual este trabalho não teria avançado.

Ao Jamil Silvano de Oliveira, não só pelo apoio técnico dado durante os experimentos de cromatografia, mas pela amizade e companheirismo dedicado ao longo de toda execução deste trabalho.

As minhas companheiras de laboratório, Rita e Estér, peças imprescindíveis ao perfeito andamento dos experimentos no nosso dia a dia de laboratório.

Aos companheiros de Laboratório, Fê, Dudu, Karina, Rafaela, Maíra, Kadma, Daniela, Ana Paula e a todos aqueles que no nosso laboratório passaram e, de alguma maneira, tornaram este trabalho prazeroso.

A todos os companheiros do Laboratório de Enzimologia e Físico Química de Proteínas, minha segunda casa ao longo de todo este estudo, agradeço a boa convivência.

Ela é sem dúvida aquela que mais sente as agruras e tormentos que passamos durante nossos trabalhos neste Departamento, por isto agradeço a Secretária Celise pela compreensão e atenção que ela dedica a todos os estudantes que por este Departamento passam.

Agradeço ainda a todos os companheiros de Pós Graduação deste Departamento, porque no fundo nos apoiamos uns nos outros para atingirmos objetivos que são comuns.

Finalmente, eles tiram-me do laboratório a qualquer momento, bebem feito gambás, fazem do entender o “Universo Bioquímico” algo extremamente trivial, efeitos da grande quantidade de etanol ingerida durante discussões coloquiais nos bares da vida, suspeito eu. Sem estes desvios de conduta jamais teria atingido os objetivos propostos neste estudo, por isso agradeço de modo muito especial ao Kaloro, Phodão, Burrão, Zema (isuma), James tchuthuca, Neura, Spertão, Thiago Mané, Fê, Dudu, Zé tigrão, Bob e a outros “alcoólatras” que minha memória (as vezes abalada por amnésia alcoólica) tenham deixados de ser aqui mencionados.

A imaginação é mais importante que a inteligência,
mas a imaginação sem inteligência é fantasia.

Albert Einstein.

We dance 'round in a ring and suppose
But the Secrets sits in the middle and knows

Robert Frost

ABSTRACT.

This work concerns with the aim of to isolate antigens from a vaccine against American Tegumentar Leishmaniasis (ATL), of long storage time (Leishvacin[®]). These vaccines present high grade of degradation upon storage, but are able to protect human individuals against ATL; some after have been storage by many years.

Antigens were isolated from polyvalent vaccine (PI antigen) and from monovalente ones of the strain *Leishmania amazonensis* (P8 antigen), by two fractionating methods (dialysis and chromatography). PI and P8 antigens, isolated by chromatographic methods, are molecules of highly molecular weight, formed by complexes aggregation phenomena involving low molecular weight molecules. Both antigens display specific reactivity against sera from American humans and dogs suffering of visceral leishmaniasis (AVL). These antigens not showed cross-reactivity with sera from individuals with other forms of the leishmaniasis or disease related ones. Not cross-reactivity between PI and P8 antigens with sera of healthy humans or healthy dogs was observed, indicating that these antigens could be used in diagnostic assays to leishmaniasis. Chemical analysis showed that PI and P8 antigens are sensible to sodium dodecyl sulphate, periodic acid and 2-mercaptoethanol treatment, being that two latter chemicals agents abolish the reactivity of these antigens with AVL sera. All these treatments deaggregate the molecular structure of PI and P8 antigens, but by different mechanisms. Chemical and analytical methods discarded the presence of any moiety protein or nucleic acids ones in the structure of these antigens. However, carbohydrate was detected by chemical or analytical analysis as some major component of PI and P8 antigens. The antigens PI and P8 isolated of vaccines against ATL

are, therefore, antigenic aggregates formed by the aggregation of small saccharides or oligosaccharides. These antigens are composed plausibly by glucose, galactose, manose, and by some forms of saccharide derivatives (phosphate, sulpho and amino sugars).

The results of this study indicates early changes in molecular composition of the vaccines against ATL (Leishvacin[®]), independent of the storage. Among these changes are relevant: i) the high degradation grade of the molecules initially present in vaccine, ii) formation of high molecular structures by aggregations phenomena, iii) recognizing of these antigenic aggregates specifically by sera to AVL patients and dogs but not by ATL sera from ones, iv) these antigenic aggregates are essentially constituted by carbohydrates.

ÍNDICE GERAL.

	PÁGINA
I. INTRODUÇÃO.....	1
I.1. A Leishmania e as Leishmanioses.....	2
I.2. O parasito, o hospedeiro e a resposta imunológica.....	5
I.3. A doença: as terapias, os antígenos e as vacinas.....	14
II. OBJETIVOS.....	42
II.1. Objetivo Geral.....	43
II.2. Objetivos Específicos.....	43
III. MATERIAL E METODOLOGIAS.....	44
III.1. Materiais.....	45
Extrato total de formas promastigotas de Leishmania.....	45
Soros.....	45
III.2. Metodologias.....	46
Preparação da fração solúvel das vacinas.....	46
Quantificação de proteínas e de carboidratos.....	46
III.2.1. Isolamento de antígenos.....	47
Isolamento de antígenos por diálise em câmaras de microdiálise.....	47
Isolamento de antígenos por métodos cromatográficos.....	48
Cromatografias de exclusão molecular em FPLC.....	48
Cromatografias de exclusão molecular em HPLC.....	48
Cromatografias de fase reversa em HPLC.....	49
III.2.2. Caracterização imunogênica dos antígenos isolados	50

Caracterização por ensaios de Elisa.....	50
Caracterização por ensaios de “western blotting”	51
III.2.3. Caracterização química dos antígenos isolados.....	52
Caracterização por métodos eletroforéticos em géis de poliacrilamida (PAGE).....	52
Procedimentos de coloração dos géis de poliacrilamida pelo método da Prata.....	52
Procedimentos de coloração dos géis de poliacrilamida pelo método do Ácido periódico / base de Schiff (PAS).....	53
Caracterização por eletroforese em géis de agarose (AGE).....	54
Caracterização dos epitopos por tratamentos químicos e enzimático em Placas de Alisa.....	54
Caracterização das frações antigênicas, após tratamentos químicos, por cromatografias e por espectrofotometria.....	55
Protocolo de tratamento dos antígenos com 2-mercaptoetanol.....	55
Cromatografias dos antígenos tratados, em HPLC, utilizando coluna de exclusão molecular Ultra Hydrogel Linear.....	56
Cromatografias dos antígenos tratados, em HPLC, utilizando coluna de fase reversa RP 300 HR (coluna C8).....	56
Caracterização dos antígenos tratados por espectrofotometria no visível.....	57
Análise de aminoácidos nos antígenos por cromatografia de fase reversa, em HPLC, utilizando o método Pico.Tag.....	57
Protocolo de hidrólise ácida dos antígenos.....	58

Protocolo de hidrólise alcalina dos antígenos.....	58
Procedimento de derivatização dos aminoácidos pelo método do fenilisotiocianato (PITC).....	59
Análise cromatográfica dos hidrolisados por cromatografia de fase Reversa, em HPLC, utilizando a coluna Pico.Tag.....	59
Caracterização das frações antigênicas por espectroscopia no infra vermelho.....	60
Caracterização das frações antigênicas por cromatografias em camada Delgada (TLC).....	61
Procedimentos de cromatografia em camada delgada.....	61
Procedimentos de revelação dos monossacarídeos após as cromatografias em camada delgada	62
Análise estatística	62
IV. Resultados e discussão.....	63
V. Discussão.....	106
VI. Conclusões.....	130
VII. Resumo.....	134
VIII. Referências Bibliográficas.....	137

ÍNDICE DE FIGURAS.

	Página
Figura 1. Reatividade dos antígenos da vacina pentavalente obtidos por métodos de diálise, medida em ensaios de Elisa.....	65
Figura 2. Reatividade dos antígenos, obtidos por diálise da vacina pentavalente contra H ₂ O, observada em ensaios de “western blotting”.....	66
Figura 3. Perfil eletroforético dos antígenos obtidos por diálise da vacina e atividade enzimática sobre o substrato BApNA recuperada no dialisado de tripsina suína.....	68
Figura 4. SDS-PAGE das frações precipitada e solúvel dos antígenos obtidos por diálise extensiva da vacina pentavalente contra H ₂ O, na ausência e presença 2-mercaptoentanol.....	70
Figura 5. Reatividade dos antígenos obtidos por diálise contra H ₂ O de amostras de vacinas pentavalente e monovalentes, mediadas em ensaio de Elisa.....	71
Figura 6. Perfil obtido por cromatografia em FPLC (coluna Superose 12) de amostras de vacina pentavalente e monovalente (cepa PH8) armazenada ou recém preparada.....	73

Figura 7. Reatividade das frações obtidas por cromatografias de amostras das vacinas em coluna Superose 12, mediada em ensaios de Elisa.....	74
Figura 8. Reatividade das frações obtidas por cromatografias de amostras das vacinas em coluna Superose 12, antígenos PI e P8, reativos em ensaios de Elisa, mediada em ensaios de “western blot”	76
Figura 9. SDS-PAGE dos antígenos PI e P8 na presença e na ausência de 2-mercaptoetanol.....	78
Figura 10. PAGE do antígeno PI em condições nativas e sua reatividade nas mesmas condições em ensaio de “western blot”	79
Figura 11. Perfis obtidos por cromatografias em coluna de fase reversa do antígeno PI, hidrolisado em condições ácidas ou alcalinas e submetido ao processo de derivatização com PITC para identificação de aminoácidos.....	81
Figura 12. Perfis obtidos por cromatografias em coluna de fase reversa do antígeno PI, hidrolisado em condições ácidas e submetido a oxidação com TEA e derivatização com PITC para identificação de resíduos de Cys.....	82

- Figura 13. Perfis obtidos por cromatografias em coluna de fase reversa do antígeno P8, hidrolisado em condições alcalinas e submetido ao processo de derivatização com PITC para identificação de aminoácidos.....83
- Figura 14. Perfis eletroforéticos dos antígenos PI e P8 em PAGE corados pelos métodos da prata ou do PAS com ou sem SDS e / ou mercaptoetanol e perfil em AGE de PI e P8 revelados com brometo de Etídeo.....84
- Figura 15. Efeitos do 2-mercaptoetanol do ácido periódico e da pronase sobre a reatividade de PI e P8 com soro de cães com leishmaniose visceral observados em ensaios de Elisa.....86
- Figura 16. Curva de calibração da coluna de exclusão molecular Ultra Hydrogel Linear88
- Figura 17. Perfis cromatográficos obtidos por cromatografia do antígeno PI na coluna Ultra Hydrogel Linear em alta e baixas concentrações de fosfato de sódio.....89
- Figura 18. Perfis cromatográficos obtidos por cromatografia do antígeno PI na coluna Ultra Hydrogel Linear, após tratamento o tratamento com 2-mercaptoetanol.....91

Figura 19. Perfis obtidos por cromatografia das frações isoladas, obtidas por cromatografia do antígeno PI tratado com 2-mercaptoetanol em coluna Ultra Hydrogel Linear, após cromatografia na mesma coluna.....	93
Figura 20. Perfis cromatográficos obtidos por cromatografia do antígeno P8 em coluna Ultra Hydrogel Linear, em alta e baixa concentrações de fosfato de sódio.....	94
Figura 21. Espectros dos antígenos PI e P8 após o tratamento com o reagente 2-mercaptoetanol.....	96
Figura 22. Espectro do antígeno PI no infravermelho.....	97
Figura 23. Perfis obtidos das cromatografias de fase reversa do antígeno PI tratado ou não com 2-mercaptoetanol.....	99
Figura 24. Perfis obtidos das cromatografias de fase reversa das frações do antígeno PI, obtidas após tratamento com 2-mercaptoetanol e cromatografia em coluna Ultra Hydrogel Linear.....	100
Figura 25. Perfis cromatográficos de padrões de monossacarídeos e dos antígenos PI e P8 em SDS, 2-mercaptoetanol ou após serem hidrolisados, obtidos por cromatografia em camada delgada.....	102

Figura 26. Perfis cromatográficos de monossacarídeos, dissacarídeos, PI, P8, após tratamento com 2-mercaptoetanol ou com SDS, obtidos por cromatografias em camada delgada.....104

Figura 27. Painel de reatividade do antígeno PI contra soro de pacientes, de indivíduos normais e de cães normais ou infectados com LVA, em Elisa.....105

ABREVIATURAS UTILIZADAS NESTE ESTUDO.

AGEEletroforese em gel de agarose (Agarose Gel Electrophoresis)
ATLLeishmaniose Tegumentar Americana (American Tegumentary Leishmaniasis)
AVLLeishmaniose Visceral Americana (Active Visceral Leishmaniasis)
BAPNAN-Benzoil-L-Tirosil- <i>p</i> -Nitroanilida
FM8Fração solúvel de vacina monovalente (cepa PH8) recém preparada
FS8Fração solúvel da vacina monovalente (cepa PH8) armazenada
FSEFração solúvel da vacina pentavalente
KDaKiloDalton
LTALeishmaniose Tegumentar Americana
LVALeishmaniose Visceral Ativa
PAGEEletroforese em gel de poliacrilamida (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
PITCFenilisotiocianato (PhenylIsoThyoCyanate)
PrDMFração precipitada dos antígenos isolados por diálise, com mercaptoetanol
PrDSFração precipitada dos antígenos isolados por diálise, com SDS
SbDMFração solúvel dos antígenos isolados por diálise, com mercaptoetanol
SbDSFração solúvel dos antígenos isolados por diálise, com SDS
SDSDodecil sulfato de sódio (sodium dodecyl sulphate)
TLCCromatografia em camada delgada (Thin Layer Chromatography)
VPeVacina total pentavalente
VPeMVacina total pentavalente com mercaptoetanol
VPeSVacina total pentavalente com SDS

I. INTRODUÇÃO.

I.1. A Leishmania e as Leishmanioses.

As leishmanioses constituem um amplo espectro de doenças causadas por protozoários parasitos do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). A doença se estabelece após a picada dos hospedeiros vertebrados pelos insetos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae), o hospedeiro invertebrado do parasito. Estas doenças ocorrem em praticamente todos os continentes, sendo conhecidas diferentes formas clínicas da doença, causadas por diferentes espécies do parasito. Os sintomas da doença variam desde a lesões cutâneas deformantes, que podem ser únicas ou dispersas pela pele do hospedeiro vertebrado, características da forma tegumentar ou cutânea da doença (LTA), lesões mutilantes de mucosas típicas da forma mucocutânea da doença e, finalmente, lesões de órgãos internos como baço e fígado principalmente, características da forma visceral da doença (LVA). Esta última forma da doença é letal em boa parte dos casos. Entre os hospedeiros vertebrados que podem contrair a leishmaniose, o homem e o cão são os mais relevantes (ADLER 1964, ZUCKERMAN 1975, PEARSON *et al.* 1983).

A importância das leishmanioses tem crescido em todo o mundo e estima-se que cerca de 400 milhões de pessoas correm risco de contrair a doença, sendo que 12 milhões de pessoas já se encontram infectadas (WHO 1998). A Leishmaniose Tegumentar ocorre em todos os continentes excetuando-se a Austrália e a Antártica. Nas Américas é encontrada desde o México até a Argentina e ocorrem cerca de 400000 casos anuais da LTA segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS). A forma visceral da doença é endêmica na África, Ásia, América do Sul e Bacia do Mediterrâneo, onde 98% dos casos não tratados terminam em morte do paciente. Apenas no sudoeste do Sudão cerca de 10% da população morreu vítima da leishmaniose visceral nos últimos anos (DAVIDSON

1998). A leishmaniose constitui-se numa das mais importantes zoonoses atualmente, sendo considerada uma das doenças emergentes no mundo. Estima-se que 1/10 da população mundial está em risco de contrair a infecção por *Leishmanias*, sendo que, na maioria das áreas endêmicas para esta doença a incidência vêm tendo uma tendência ao crescimento. (BERMAN 1988, JAFFE & GREENBLAT 1991, LYNDEN *et al.* 2001).

Várias espécies de *Leishmanias* estão associadas às diferentes formas clínicas da doença, havendo também uma distribuição diferencial das espécies do parasito nos continentes onde a doença ocorre. Nas Américas a forma tegumentar da doença é atribuída a infecções por *L. mexicana* e *L. brasiliensis*, esta última sendo também responsável pelos casos da forma mucocutânea, enquanto que no Velho Mundo tal forma da doença é causada por parasitos das espécies *Leishmania major*, *Leishmania tropica* e *Leishmania aethiopica*, sendo esta última espécie responsável pela forma mucocutânea. No Velho Mundo a forma visceral é causada principalmente por parasitos da espécie *L. donovani*, enquanto que no Novo Mundo tal forma da doença é atribuída a infecções por parasitos das espécies *Leishmania chagasi* e *L. donovani*. Existem ainda outras espécies do parasito causadoras da doença como *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. guianensis*, *L. tarentolae* e *L. enrietti*, havendo uma tendência em se agrupar as diferentes espécies segundo a forma clínica da doença que causam e a sintomatologia pertinente a cada caso (DORAN & HERMAN 1981, FRANCK *et al.* 1985, PETERS & KILICK-KENDRICK 1987, GROGL *et al.* 1987, PUENTES *et al.* 1988, SARAIVA 1988, BERMAN 1988).

Além de constituir-se numa das principais doenças endêmicas nos últimos anos, os efeitos da infecção na população humana com parasitos do gênero *Leishmania* têm assumido papel relevante, quando em combinação com os efeitos de outras doenças, sobretudo as complicações decorrentes da coinfeção de pacientes aidéticos com

leishmanioses. Com a disseminação do vírus da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida Humana (AIDS), casos de coinfeção com leishmaniose visceral tem aumentado, sendo que manifestações incomuns da doença tem ocorrido. Reativações da doença em pacientes previamente curados ou em pacientes assintomáticos ocorrem com frequência. Mais crítico ainda, pacientes coinfectados com parasitos do gênero *Leishmania* e com o vírus da AIDS são frequentemente resistentes ao tratamento e têm acelerada a progressão tanto da AIDS quanto da própria leishmaniose. Também é freqüente a evolução de outras formas clínicas da leishmaniose para a forma visceral da doença, sendo que esta forma clínica é letal na maioria dos casos (LOPEZ-VELEZ *et al.* 1998, AMBROISE-THOMAS 2000, PINTADO *et al.* 2001).

I.2. O parasito, os hospedeiros e a resposta imunológica.

As Leishmanias apresentam três formas distintas em seu ciclo biológico, duas flageladas e uma não flagelada. A forma infectante para os vertebrados é a forma flagelada promastigota metacíclica, que é introduzida no hospedeiro vertebrado pela picada do inseto vetor flebotomíneo. Esta forma penetra nas células da linhagem monocítica, sobretudo no macrófago, diferenciando-se então na forma não flagelada denominada amastigota, forma esta que é parasita obrigatória do macrófago. Dados clínicos revelam que fatores ligados ao vetor, ao parasita e ao hospedeiro, definem em conjunto, a evolução da infecção e as dificuldades em se controlar o avanço da doença (SACKS & PERKINS 1984, SACKS & PERKINS 1985, SACKS *et al.* 1985, DA SILVA & SACKS 1987, HOWARD *et al.* 1987).

Dois fatores principais respondem pela dificuldade do sistema imune em controlar a progressão da leishmaniose: a grande diversidade de espécies do parasito capazes de causar a doença, e a ausência de uma resposta imunológica celular contra a Leishmaniose. Após a penetração, a leishmania sobrevive e multiplica-se no macrófago, sendo que a ativação destas células constitui importante mecanismo efetor no combate ao parasito (MOSSER & ROSENTHAL 1993, JAMES & NACY 1993). A ativação dos macrófagos requer ainda a participação de fatores solúveis liberados por linfócitos T (LT) ativados. Macrófagos peritoneais de camundongos, ativados *in vitro* com interferon- γ (IFN- γ) e lipopolissacáride (LPS), são capazes de destruir o parasito através da produção maciça de óxido nítrico (REED & SCOTT 1993, STOUT 1993 e LIEW & O'DONNELL 1993). A habilidade do parasito em resistir aos efeitos tóxicos do macrófago ativado constitui um dos eventos responsáveis pela ausência de uma imunidade protetora no caso da leishmaniose (CONVIT *et al.* 1972, HOWARD *et al.* 1980, CARVALHO *et al.* 1985 e COUTINHO *et al.* 1987).

Linfócitos T desempenham papel crucial na infecção por *L. major* em camundongos, como verificado pelo fato de que camundongos atímicos serem incapazes de impedir a progressão da doença. Estes mesmos animais tem a progressão da doença revertida quando recebem LT de camundongos singênicos durante o curso da infecção (MITCHEL *et al.* 1980). Foi também observado que células T provenientes de tecido linfóide de camundongos resistentes, infectados com *L. tropica*, são capazes de conferir proteção quando transferidas para camundongos susceptíveis C57BL/6 infectados com *L. tropica* (HOWARD *et al.* 1981, LIEW *et al.* 1982). MILON *et al.* (1986) demonstraram que a susceptibilidade a infecção experimental por *L. major*, em camundongos susceptíveis BALB/c, decorre de um aumento na população de células T com fenótipo L3T4⁺ nos animais infectados. Foi ainda demonstrado que a susceptibilidade pode ser revertida pela administração maciça de anticorpos monoclonais anti-células T L3T4⁺. TITUS *et al.* (1985) relataram a importância das células T L3T4⁺ na resistência de camundongos BALB/c susceptíveis a infecção por *L. major*, porém mostraram que o efeito era dependente do isotipo de anticorpo monoclonal anti-L3T4.

As células T CD4⁺ de camundongos foram divididas em duas subpopulações segundo o seu padrão de secreção de citocinas. Células T CD4⁺ secretoras de interleucina-2 (IL-2) e interferon gama foram denominadas células Th1, enquanto que células T CD4⁺ secretoras de interleucina-4 (IL-4) e interleucina-10 (IL-10) foram denominadas células Th2 (MOSMANN & COFFMAN 1989). GALLO *et al.* (1991) descreveram uma terceira subpopulação de células T, denominada Th3, secretora de IL-2, IL-4 e IFN- γ . SWAIN *et al.* (1991) caracterizaram subpopulações de células T CD4⁺ semelhantes às células Th3, cuja diferenciação e padrão de secreção de linfocinas é estimulado pelo fator de crescimento e

transformação de células T (transforming Growth Factor, TGF- β). A produção de altos níveis de TGF- β como caráter fenotípico das células Th3 foi posteriormente demonstrada, bem como a secreção de interleucina-13 (IL-13) pelas células Th2 (CHEN *et al.* 1994, ZURAWSKI & VRIES 1994).

Existe ainda uma população de células T CD4⁺ precursora (Th0), cujo perfil de secreção de citocinas não foi ainda definido como Th1 ou Th2. Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que citocinas presentes no início do processo de resposta imune têm importante papel na diferenciação destas células precursoras em Th1 ou Th2 (ROCKEN *et al.* 1992, O'GARRA & MURPHY 1994). Têm-se considerado que as subpopulações Th1 e Th2 correspondem aos extremos de uma ampla gama de fenótipos de expressão de linfocinas e, estas duas subpopulações celulares definem o tipo de resposta imune a ser desencadeado no organismo, celular ou humoral (MOSMANN & SAD 1994).

A correlação entre a expansão de células Th1 e o controle da leishmaniose tem sido amplamente descrita na literatura, seja na infecção em modelos animais experimentais ou mesmo em casos da doença entre humanos. Camundongos susceptíveis BALB/c, quando infectados com *L. major*, desencadeiam uma resposta imunológica do tipo Th2, enquanto camundongos resistentes C57BL/6 e C3H/HeN desencadeiam uma resposta imunológica predominantemente do tipo Th1 (LOCKSLEY & SCOTT 1991). Camundongos BALB/c susceptíveis a infecção por *L. major* tornaram-se resistentes, após tratamento com anticorpo monoclonal anti-CD4 acompanhado da reposição, no curso da infecção, de células T CD4⁺ obtidas de tecido linfóide de camundongos resistentes. A mesma resistência era adquirida quando os animais susceptíveis eram tratados com anticorpos monoclonais anti-IL-4,

resultando num aumento de células CD4⁺ secretoras de IL-2 e IFN- γ e numa diminuição de células CD4⁺ secretoras de IL-4 e IL-10 (HEINZEL *et al.* 1991).

É amplamente discutido na literatura o papel das citocinas na evolução das leishmanioses, havendo mesmo resultados controversos. Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que o IFN- γ produzido por macrófagos e células T apresenta função efetora anti-leishmania (MURRAY *et al.* 1983, REED *et al.* 1984, MURRAY *et al.* 1987). Em 1990 SADICK *et al.* realizaram estudos nos quais administraram altas doses de IFN- γ a camundongos susceptíveis BALB/c, após infecção experimental com *L. major*. Tais autores não observaram quaisquer modificações na evolução da doença nestes animais. Após a combinação de IFN- γ e antimoniais pentavalentes administrados a pacientes com LVA, não respondedores a terapia convencional, BADARÓ *et al.* (1990) concluíram que tal combinação era eficaz no tratamento clínico da doença em pacientes humanos. Também foi demonstrado que o IFN- γ , em combinação com o TNF- α endogenamente produzido pelos macrófagos, induz a síntese das óxido nítrico sintases, enzimas responsáveis pela síntese de radicais reativos de nitrogênio no interior do fagolisossomo dos macrófagos, de ação tóxica para as leishmanias (GREEN *et al.* 1990, LIEW & O'DONNELL 1993). Os estudos de SCOTT (1991) mostraram que camundongos resistentes C3H/HEN injetados com anticorpos monoclonais anti-IFN- γ durante infecção com *L. major*, após 28 dias de infecção, não apresentavam IFN- γ nos seus linfonodos. Os animais apresentaram uma supressão da resposta do tipo Th1 e concomitante progressão da doença.

A IL-4 têm sido relacionada com a manutenção do quadro clínico da leishmaniose induzida por *L. major*. Foi observado o desenvolvimento de resposta celular do tipo Th1, em camundongos BALB/c tratados com anticorpos monoclonais anti-IL-4 no início da

infecção com *L. major* (SADICK *et al.* 1990, CHATELAIN *et al.* 1992). Observações semelhantes foram relatadas por AFONSO & SCOTT em 1993. Após tratarem camundongos BALB/c com anticorpos anti-IL-4, estes autores observaram tanto a redução das lesões provocadas nestes animais, após infecção por *L. amazonensis*, quanto a redução nos níveis de IL-4, sugerindo um papel relevante desta citocina na susceptibilidade destes animais à infecção por esta espécie de leishmania. A capacidade de células Th2 em induzir a liberação de citocinas como a IL-4 pode ser responsável pela inibição da função efetora destas células. Também é sabido que células Th2 induzem a secreção de IL-10 e IL-13, citocinas relacionadas com a redução da atividade anti-leishmania dos macrófagos (LIEW *et al.* 1993, MOORE *et al.* 1993, ZURALSKI & VRIES 1994).

Outra citocina envolvida nos mecanismos de proteção contra a leishmaniose é a IL-12. Foi observado que esta citocina aumenta a resposta Th1 em pacientes com leishmaniose visceral (GHALIB *et al.* 1995). O mesmo foi observado após infecção experimental de camundongos C3H por *L. major* (SCHARTON-KERSTEN *et al.* 1995). Sabe-se que esta citocina interage com células “natural killer” (NK) e com células T, desempenhando importante papel na iniciação e manutenção de uma resposta do tipo Th1 e na produção de IFN- γ . A estimulação de células NK até a produção de IFN- γ é responsável pelo início da diferenciação de células Th1 na leishmaniose e no controle da resistência inicial a infecção por *L. major* (SCHARTON-KERSTEN & SCOTT 1993).

GURUNATHAN *et al.* (1998) demonstraram que a administração e manutenção de IL-12, em combinação com o estímulo antigênico, produz uma imunidade muito mais duradoura que a obtida apenas na presença do estímulo antigênico isolado durante a infecção por *L. major*. ENGWERDA *et al.* (1998) utilizando anticorpos monoclonais anti-

IL-12 demonstraram que a neutralização da IL-12, em camundongos BALB/c geneticamente susceptíveis a infecção por *L. donovani*, tanto nos estágios iniciais quanto tardios da doença, causou um retardamento na eliminação do parasito. Também foi relatada uma diminuição transitória dos níveis de IFN- γ , TNF- α e IL-4, assim como uma redução nos níveis de óxido nítrico sintase indutível e supressão da formação de granuloma no fígado destes animais. A neutralização da IL-12, entretanto, não tem qualquer efeito sobre a morte dos parasitos no baço destes animais até 28 dias após a infecção. Após este período a IL-12 parece ser crítica para o desencadeamento dos eventos relacionados ao crescimento e manutenção do parasito no baço, sendo que sua neutralização culmina com uma progressiva desestruturação da arquitetura deste órgão. Estudos imunohistoquímicos têm mostrado que células normais de camundongos BALB/c geneticamente resistentes produzem grandes quantidades de IL-12. Foi demonstrado que a IL-12 parece estar relacionada tanto na geração de resposta do tipo Th1 quanto Th2 durante a infecção por *L. donovani* em camundongos BALB/ c, sendo que a expressão da IL-12 no fígado e baço destes animais ocorre em tempos diferentes no curso da infecção, entretanto observou-se que a IL-12 não tem qualquer papel no curso da infecção no baço e fígado de camundongos susceptíveis CBA/n.

Já é sabido que a progressão da leishmaniose está associada à redução nos níveis de IFN- γ e da atividade da óxido nítrico sintase, entretanto os níveis de IL-12 no fígado e baço dos camundongos BALB/c são diferentes nos estágios iniciais da infecção, havendo no baço níveis consideráveis desta interleucina, em comparação aos níveis observados no fígado dos mesmos animais. GORAK *et al.* (1998) demonstraram que a IL-12 presente no baço de camundongos BALB/c infectados por *L. donovani* é produzida inicialmente, não

por macrófagos ou linfócitos, mas por células dendríticas. Estes autores sugeriram que a IL-12 produzida por estas células estimularia a ativação de células T e células NK, o que explicaria o controle da progressão da doença neste órgão.

GABAGLIA *et al.* (1999) protegeram camundongos susceptíveis BALB/c contra a infecção por *L. major*, injetando via intramuscular, adenovírus como vetor de expressão de IL-12. A IL-12 expressada era transitória e altamente expressa no tecido onde o vetor foi injetado, onde também se observou alta concentração de linfócitos secretores de IFN- γ e alta atividade de células NK. Inversamente, a injeção de adenovírus expressando IL-4 levou a um aumento da susceptibilidade a doença, com aparecimento de lesões graves nos animais infectados. Estudos de QUINONES *et al.* (2000) demonstraram a presença de estoques de IL-12 induzidas pela estimulação de células mielóides com LPS mais interferon- γ após 2 a 4 horas da estimulação. Estes autores também demonstraram a presença de estoques preformados de IL-12 associados à membrana de células mielóides em repouso, humanas e de camundongos (células dendríticas, macrófagos e tecidos ricos em células dendríticas). Segundo os autores estes estoques são imediatamente liberados após o contato *in vitro* e *in vivo* destas células com *Leishmania donovani*.

BOURREAU *et al.* (2001) demonstraram que a ausência de resposta de células T humanas específicas para *Leishmania guyanensis* à IL-12 e a intensa produção de IL-13 por estas células seriam os eventos responsáveis pela persistência da infecção. YAMAKAMI *et al.* (2001) demonstraram que a injeção intradérmica de uma única dose de antígeno solúvel de *L. major*, combinado a um plasmídeo contendo as subunidades P35 e P40 da IL-12, são suficientes para induzir uma resposta Th1 em camundongos BALBc infectados sete dias antes com *L. major*, havendo total cura das lesões e significativa redução dos parasitos

no sítio da infecção. Os animais totalmente curados tornaram-se resistentes a uma subsequente infecção com uma dose letal de parasitos. O efeito protetor estava associado a produção de níveis consideráveis de IFN- γ e de IgG-2a. Foi observado que a injeção do plasmídeo sem os insertos combinado ao antígeno solúvel, ou a injeção apenas do plasmídeo com os insertos, eram incapazes de produzir o efeito protetor e o perfil de resposta Th1. A administração de anticorpos anti-IL12 ou anti-IFN- γ também inibiram o efeito protetor.

Estudos realizados por NOORMOHAMMADI *et al.* (2001) utilizando camundongos susceptíveis BALBc e camundongos resistentes C3H/He demonstraram que a injeção intramuscular de DNA codificando para IL-12 ou para o antígeno de superfície do parasito (PSA), isoladamente, induzia uma proteção significativa nos camundongos BALBc à infecção por *L. major*. Os camundongos CH/He vacinados neste protocolo apresentaram resolução das lesões em tempo ainda menor que os camundongos BALBc. Entretanto a vacinação destes animais com a combinação do DNA para IL-12 mais o DNA codificando para o PSA aboliu a resistência a infecção dos camundongos C3H/He e não conferiu proteção nos camundongos BALBc. NISHIKOMORI *et al.* (2001) estudaram os efeitos reguladores da IL-4 produzida precocemente na infecção de camundongos BALBc por *L. major* sobre a expressão dos receptores para IL-12 (IL-12R β 2) e na manutenção do perfil de resposta TH2. Estes autores observaram um intenso acúmulo de células T CD4⁺/IL-12R β 2⁺ nos linfonodos de camundongos resistentes C57BL/6, infectados com *L. major*. As células CD4⁺/IL-12R β 2⁺ produziram altos níveis de IFN- γ . Entretanto, camundongos BALBc susceptíveis a *L. major* e transgênicos para a expressão do receptor CD4⁺/IL-12R β 2⁺ não foram capazes de reverter o fenótipo Th2 após infecção por *L. major*. Estes

camundongos apresentaram exacerbação da infecção quando tratados com IL-12 sete dias após a infecção, apresentando aumento da secreção de IL-4 induzida por antígenos do parasito.

O papel das citocinas e dos seus diferentes receptores, dos diferentes tipos celulares e das diferentes moléculas acessórias no estabelecimento de um perfil de resposta imune vem sendo atualmente elucidado. Suas funções tem sido desvendadas por estudos comparativos utilizando doenças que são modelos típicos de interações parasito-hospedeiro. Têm-se observado que esses elementos podem desempenhar papéis distintos de acordo com a doença envolvida e com o hospedeiro infectado, sendo suas atividades dependentes de fatores intrínsecos ao “status” imunológico do hospedeiro infectado (ALEXANDER *et al.* 1999 e MARIE-PIERRE *et al.* 2001).

I.3. A doença: as terapias, os antígenos e as vacinas.

Apesar de haver apenas duas espécies de flebotomíneos confirmadamente envolvidos na transmissão do parasito aos hospedeiros vertebrados, sabe-se que existem diversas espécies potenciais de invertebrados capazes de responder pela transmissão da doença. A erradicação dos vetores envolve o uso de agentes químicos extremamente danosos ao meio ambiente e de alto custo. Do ponto de vista de saúde pública, os hospedeiros vertebrados de importância são o cão e o homem, entretanto são conhecidas outras espécies de vertebrados silvestres capazes de serem infectadas pelas leishmanias, inviabilizando um controle a este nível. Considerando-se o cão, a erradicação do parasito é feita mediante sacrifício dos animais infectados, o que acaba por gerar um custo social alto, haja visto que nem sempre os donos de animais infectados concordam com o sacrifício dos seus animais, apesar do conhecimento dos riscos de manterem seus animais infectados vivos (LAINSON & DIXON 1963, MODDABER 1990, DESJEUX 1991).

Estudos clínicos com os antimoniais pentavalentes, agentes clássicos utilizados no tratamento da doença, permitiram estabelecer o melhor regime de utilização destes fármacos, permitindo um melhor controle dos efeitos colaterais associados a sua utilização, efeitos estes responsáveis pelas limitações do uso destas drogas. Apesar de ser desconhecido o mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes e da sua estrutura química, eles ainda são a droga de escolha para tratamento, seja isolado ou em combinações outros fármacos recentemente propostos, ou ainda em protocolos de imunoterapia. (BERMAN 1988, MAYRINK *et al.* 1992, CARVALHO *et al.* 2000, TOLEDO *et al.* 2001).

O “design” de novas drogas também experimentou considerável avanço nos últimos anos, basicamente devido ao estudo das vias metabólicas do parasito. Tais estudos

mostraram que o metabolismo deste parasito apresenta diferenças em relação ao metabolismo de células eucariontes. O parasito apresenta vias bioquímicas parasito-específicas, relacionadas ao metabolismo de glicose, purinas, lípidos e poliaminas. O conhecimento destas vias parasito-específicas tem permitido o aparecimento de uma variedade de modalidades de tratamento, empregando drogas relacionadas a diferentes aspectos do metabolismo do parasito. Dentre as novas drogas utilizadas destacam-se o cetoconazol, o alopurinol, a anfotericina B e as diaminidinas como a pentamidina e os aminoglicosídeos como a paromomicina, esta última tendo se mostrado bastante eficiente no controle da leishmaniose tegumentar no modelo murino (BERGMAN 1988, JAFFE & GREENBLAT 1991, CARVALHO *et al.* 2000).

O sucesso da utilização das diferentes drogas no tratamento das leishmanioses depende ainda de um rápido e preciso diagnóstico da doença. Por décadas, o diagnóstico definitivo das leishmanioses tem continuamente se baseado na detecção do parasito nos sítios de infecção. Tal procedimento consiste na obtenção de amostras de tecido das lesões de órgãos como baço, pulmões, medula óssea, linfonodos e pele, e/ou aspirado de fluídos dos órgãos afetados, seguida da análise microscópica das amostras afim de se detectar a presença do parasito. Tais procedimentos, além de invasivos, são demorados, sendo ineficazes em estudos de campo ou epidemiológicos. Outros métodos tradicionais incluem o cultivo de parasitos em meios especiais para análise microscópica e o teste cutâneo com leishmanina ou o teste de Montenegro, que apresentam as mesmas restrições de rapidez e grau de certeza. Ainda hoje, em clínicas de zonas rurais, o diagnóstico é feito por análise da sintomatologia da leishmaniose, freqüentemente levando a confusão da leishmaniose visceral com doenças de sintomatologia semelhante, tal como a malária (PRICE & SILVERS 1977, SINGH *et al.* 1995).

BRAY & LAINSON (1965) descreveram pela primeira vez a utilização de anticorpos fluorescentes como técnica de coloração para identificação de parasitos em casos de leishmaniose. Ensaios para detecção de *Leishmania* utilizando anticorpos marcados com fluorescência foram explorados também por HERMAN em 1965. Nestes estudos anticorpos foram utilizados para detectar a forma infectante do parasito em macrófagos. A utilização de anticorpos fluorescentes para detecção indireta de antígenos de *Leishmania* em casos de leishmanioses foi explorada também por SHUIKINA (1965) e por DEL REY (1966). A sensibilidade e especificidade do teste com anticorpos fluorescentes para detecção de antígenos do parasito em casos de leishmaniose foram determinados por MAYRINK *et al.* (1967) e ARAÚJO & MAYRYNK (1968) em comparação com a técnica de fixação de complemento (QUILICI *et al.* 1968). Os ensaios de imunofluorescência para o diagnóstico de leishmanioses são ainda um dos mais utilizados, e sua eficiência, em comparação a outros métodos, foi revista por KALTER (1994).

PRICE & SILVERS (1977) discutiram as vantagens dos testes sorológicos sobre os testes tradicionais no diagnóstico das leishmanioses, sobretudo o aspecto de poder explorar a presença de anticorpos dirigidos contra antígenos do parasito, tanto na busca de diferentes métodos de diagnóstico, quanto na obtenção de antígenos para fins de profilaxia. Ensaios diagnósticos de base sorológica têm sido propostos, tanto no sentido de aumentar a rapidez quanto a especificidade do diagnóstico das leishmanioses.

BALDELLI *et al.* (1978) relataram o diagnóstico sorológico de leishmanioses em humanos utilizando a técnica de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Da mesma maneira EDRISSIAN *et al.* (1979) relataram o diagnóstico de leishmanioses cutânea e visceral, utilizando soros de pacientes iranianos com estas formas clínicas da doença, demonstrando boa concordância entre o diagnóstico por ELISA e por

imunofluorescência indireta. Uma sucessão de ensaios diagnósticos de leishmanioses baseados em ELISA, utilizando tanto moléculas solúveis do parasito como parasitos intactos para detecção de anticorpos antiparasito foram posteriormente relatados (LUZZIO *et al.* 1979, ROFFI *et al.* 1980, MOHAMMED *et al.* 1985, HANDMAN *et al.* 1987, GARCIA-MISS *et al.* 1990, MONTOYA *et al.* 1997, MARTIN *et al.* 1998). MOHAMMED *et al.* (1985) argumentaram que a utilização de formas intactas do parasita seria mais indicada nos ensaios imunoenzimáticos uma vez que, os antígenos semi-purificados ou purificados do parasito, por serem solúveis, exigem extensa manipulação, levando a perda de reprodutibilidade e de especificidade do diagnóstico.

PIARROUX *et al.* (1994) utilizaram a técnica de PCR para amplificar uma seqüência repetida do genoma de *Leishmania infantum*. A ocorrência da repetição em pacientes de área endêmica para leishmaniose, nos quais a suspeita da infecção era avaliada por exame físico, foi comparada com exame direto de aspirados de medula óssea, mielocultura, e testes sorológicos. De 73 pacientes analisados, apenas 10 apresentaram diagnóstico indiscutível de calazar. De acordo com os autores nenhum dos testes apresentou 100% de sensibilidade para o diagnóstico da doença, mas entre todos o teste de PCR foi o mais sensível, apresentando sensibilidade acima de 82%. De todos os testes, os sorológicos foram os de maior sensibilidade e especificidade para os novos casos da doença, porém eram menos eficientes nos casos de recidiva, em comparação com o PCR.

Regiões correspondentes ao DNA do cinetoplasto (kDNA) das espécies de Leishmanias têm sido utilizadas como alvo para testes de diagnóstico das leishmanioses, seja por PCR ou por ensaios de ELISA. Em estudo recente SALOTRA *et al.* (2001) amplificaram um fragmento de 600 Kb do kDNA de *L. donovani*. Utilizando sangue de pacientes indianos com leishmaniose visceral, ou tecido colhido de pacientes com

leishmaniose visceral pós leishmaniose tegumentar, estes autores conseguiram amplificar o fragmento de 600Kb do kDNA de *L donovani* nestas amostras. Segundo os autores o teste é capaz de amplificar este fragmento partindo de amostras correspondentes ao kDNA de um único parasito. Mais importante ainda é o fato deste PCR não amplificar o DNA de parasitos normalmente coendêmicos com a *Leishmania*, sendo espécie-específico. O teste forneceu valores de 96% de positividade no diagnóstico de leishmaniose visceral e de 93,8% para o diagnóstico de leishmaniose visceral pós-leishmaniose tegumentar. Estudos foram conduzidos para avaliar a sensibilidade da técnica de PCR para o diagnóstico de leishmaniose tegumentar causada por *Leishmania (Viannia) guyanensis*. Utilizando a amplificação de um fragmento do kDNA deste parasito a partir de amostras de biópsias de pele de pacientes infectados, foi obtido 100% de sensibilidade no diagnóstico, quando comparado a visualização de amastigotas do parasito nas amostras de biópsias. Apesar deste resultado, foi sugerido que o teste de PCR deveria ser utilizado apenas naqueles casos em que a visualização do parasito seja negativa, por questões do custo e do trabalho envolvido nesta técnica (ROMERO *et al.* 2001).

Estudos foram conduzidos para avaliar a resposta imune de pacientes com leishmaniose visceral, utilizando ensaios de ELISA e como antígeno uma proteína recombinante purificada (rK39), obtida pela clonagem de um gene do cinetoplasto de *L. chagasi*. Esta proteína corresponde a um trecho repetitivo de 39 resíduos, proveniente de uma proteína de 230 KDa, predominante nas formas amastigotas do parasito, sendo uma proteína membro da superfamília de proteínas do cinetoplasto, as Cinesinas. Análises por “western blotting” revelaram seqüências relacionadas a essa proteína presentes em sete espécies de leishmanias, sendo que a maior homologia de seqüência da repetição ocorre entre as espécies *L chagasi* e *L donovani*. A avaliação sorológica por ELISA revelou que

98% dos pacientes brasileiros e 100% dos pacientes sudaneses com calazar, apresentaram altos títulos de anticorpos dirigidos contra a rK39. Anticorpos anti-rK39 estavam ausentes em pacientes com leishmanioses tegumentar e mucocutânea. Estes dados segundo os autores indicam que este antígeno purificado poderia substituir o extrato cru de parasitos como antígeno em testes de diagnóstico, sem perda de especificidade (BURNS *et al.* 1993). Também não foi observada reatividade cruzada da rK39 com soros de pacientes chagásicos (SINGH *et al.* 1995, BADARÓ *et al.* 1996).

A importância de se trabalhar com antígenos específicos purificados é alvo de discussão na literatura. Entre outros aspectos encontram-se não só a questão do diagnóstico, mas também o acompanhamento da resposta imune ao longo da doença e a seleção de moléculas, possíveis candidatas para testes de vacinação (SHEPPARD & DWYER 1986, BLAXTER *et al.* 1988, REED *et al.* 1990, BURNS *et al.* 1993). Por ser de extrema simplicidade e permitir o diagnóstico rápido das leishmanioses, inúmeros antígenos vêm sendo propostos para uso em ELISA com fins diagnósticos. Outras variáveis que possam maximizar o diagnóstico de leishmaniose por este ensaio foram estudadas recentemente, principalmente para o diagnóstico de Leishmaniose tegumentar, a mais predominante das formas clínicas desta doença (RAJASEKARIAH *et al.* 2001).

Outra técnica sorológica que tem recebido atenção em ensaios de diagnóstico é o “immunoblotting”. Esta técnica não só tem se mostrado promissora para diagnóstico das leishmanioses, como também tem sido uma ferramenta importante para detecção e isolamento de antígenos potenciais, tanto para diagnóstico quanto para estudos epidemiológicos e de profilaxia. CARDENOSA *et al.* (1995) relataram a caracterização parcial de uma série de polipeptídeos provenientes *L. infantum*, de pesos moleculares entre 14 e 100 KDa, reconhecidos por soros de pacientes com leishmaniose visceral. Dentre os

polipetídeos selecionados, uma banda de 17 KDa mostrou-se apropriada para estudos de avaliação clínica, pós-tratamento e também para estudos epidemiológicos.

Componentes antigênicos de uma fração semi-purificada de *L. infantum* foram também estudados quanto a sua reatividade, frente a soros de 14 cães com leishmaniose visceral sintomática e 11 soros de cães aparentemente saudáveis, provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral canina. Foram isolados 7 polipeptídeos de peso molecular (PM) entre 18 e 73 KDa reconhecidos pelos soros de animais infectados e dois componentes de PM de 63 e 70 KDa, reconhecidos por 3 dos 11 soros de animais saudáveis. Foi sugerido que estes antígenos específicos semi-purificados podem induzir uma resposta imune humoral, em animais infectados assintomáticos ou em animais com leishmaniose visceral ativa (COSTA *et al.* 1996).

Apesar do número crescente de propostas de ensaios diagnósticos de base sorológica, ensaios alternativos tem sido propostos, baseados em metodologias já bem estabelecidas. BARRECA *et al.* (2000) demonstraram que o laranja de acridina, um corante bastante conhecido, é mais eficiente para identificar por microscopia, promastigotas de culturas de medula óssea de cães infectados com *Leishmania*, quando comparado com os métodos de uso corrente. O método proposto é também mais eficaz para detectar o parasito ainda nos estágios iniciais de progressão da infecção. Recentemente foi descrito um teste diagnóstico para leishmaniose visceral em pacientes e em ratos infectados com *L. donovani* (ATTAR *et al.* (2001). Neste teste, partículas de látex recobertas com anticorpos dirigidos contra antígenos de *L. donovani* se ligam a antígenos presentes na urina dos humanos com leishmaniose visceral ou dos ratos experimentalmente infectados com *L. donovani*. Este teste apresentou sensibilidade superior ao teste de ELISA para o diagnóstico de

leishmaniose visceral, sendo semelhante ao ELISA no monitoramento da evolução da cura da doença após tratamento.

A busca por métodos diagnósticos mais eficientes incluem não só a purificação de antígenos potenciais para este fim, mas tem caminhado para a identificação, a nível molecular, dos epitopos ou porções mínimas das moléculas envolvidas, tanto no reconhecimento pelos anticorpos de pacientes infectados, quanto na influência destas interações Ag/Ac e/ou Ag/células sobre o sistema imune. Com o advento das técnicas de biologia molecular e engenharia genética, antígenos têm sido montados, pela clonagem de segmentos relevantes de uma molécula fundidos a segmentos igualmente relevantes de outra molécula, e avaliados quanto ao seu potencial no diagnóstico de leishmanioses. Da mesma maneira uma série de estudos têm-se focado na seleção de segmentos de antígenos relevantes, tanto para diagnóstico quanto para fins de profilaxia.

Em 1996 SOTO *et al.* sintetizaram peptídeos cobrindo toda a seqüência linear da histona H3 de *L. infantum* e demonstraram que os determinantes antigênicos deste Ag compreendem os 40 resíduos do terminal amino da molécula. Eles ainda demonstraram, utilizando proteínas recombinantes constituídas pelos 39 resíduos amino terminais e recombinantes constituídos pelos 90 resíduos carbóxi terminais, em experimentos de competição utilizando soros de cães com leishmaniose visceral, que realmente os determinantes antigênicos deste antígeno estão confinados na porção amino terminal. Como o soro de leishmaniose visceral não reage com histonas de mamíferos, os autores sugeriram que a resposta imune anti-histona, observada durante a infecção por leishmania, seja provocada pelas histonas do parasita. Eles então concluíram que desta proteína recombinante, a porção amino terminal (rLiH3-Nt) poderia ser útil para diagnóstico rápido e seguro de leishmaniose visceral canina. Estudos utilizando uma proteína recombinante,

constituída de diferentes determinantes antigênicos, provenientes de proteínas ribossomais de *L. infantum* (LiP2A, LiP2b e liPO) e da histona H2A da mesma espécie foram descritos por SOTO *et al.* em 1998. A proteína híbrida apresentou alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico de leishmaniose visceral canina, em testes de Elisa com soros de cães infectados por *L. infantum*.

Outra proteína cuja estrutura tem sido explorada é a proteína de membrana-11 do cinetoplasto de *L. donovani* (KMP-11). JENSEN *et al.* (1998) utilizaram três peptídeos, KMP-11-1, KMP-11-2 e KMP-11-3, derivados de trechos da seqüência da KMP-11, como ligantes em ensaios de ELISA e como antígenos em ensaios de linfoproliferação com células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com leishmaniose. Anticorpos reativos contra os três peptídeos sintéticos foram encontrados no plasma de 63 indivíduos sudaneses com leishmaniose visceral, entretanto a reatividade era distinta, sendo de 37% para KMP-11-1, 30% para KMP-11-2 e 58% para KMP-11-3. Foi também detectada reatividade cruzada com soros de pacientes sudaneses infectados com *L. major* e com soros de pacientes dinamarqueses infectados com *Plasmodium falciparum*. Nos ensaios de linfoproliferação, 10 de 17 isolados de PBMC, de pacientes infectados com *L. major*, mostraram resposta a um ou mais dos três peptídeos, porém com níveis de proliferação distintos, sendo que o KMP-11-3 foi o que induziu uma maior proliferação celular. A proteína KMP-11 intacta apresenta intensa reatividade cruzada com epitopos de *T. cruzi*, agente causador da doença de Chagas. Estes resultados comprometem o uso desta molécula para diagnóstico de Leishmaniose em regiões onde estas duas doenças sejam endêmicas (TRUJILLO *et al.* 1999). Recentemente foi demonstrado que os epitopos responsáveis pela reatividade cruzada de KMP-11 com anticorpos contra a leishmaniose visceral residem na porção amino-terminal desta molécula. Epitopos imunodominantes

presentes na porção carbóxi-terminal desta mesma proteína são especificamente reconhecidos por anticorpos dirigidos contra a doença de Chagas (THOMAS *et al.* 2000). Estes resultados estão de acordo com a alta reatividade observada para o soro de pacientes Chagásicos com o antígeno B13, um antígeno constituído por uma série de repetições “in tandem” de um trecho da seqüência de uma proteína (140/116 KDa), altamente expressa na membrana de formas tripomastigotas infectivas de *T. cruzi*, sendo sua reatividade específica para soro de pacientes chagásicos (DURANTI *et al.* 1999).

Outro nível de controle da progressão das leishmanioses consiste na obtenção de vacinas capazes de conferir proteção contra estas doenças. Inicialmente foram utilizados parasitos virulentos vivos para imunização, parasitos vivos atenuados, parasitos mortos, misturas complexas de moléculas ou de diferentes formas e espécies dos parasitos e, mais recentemente, pesquisas têm se focado na obtenção de moléculas purificadas derivadas de diferentes espécies e formas do parasito (MODDABER 1990, JAFFE & GREENBLAT 1991, MAYRINK *et al.* 1979, GENARO *et al.* 1996, GUIMARÃES *et al.* 1996, SJOLANDER *et al.* 1998).

Dada a sua importância como doença emergente, duas abordagens nos estudos de vacinação têm sido utilizadas para obtenção de imunidade protetora para as diferentes formas de leishmanioses. A primeira, sistemática, inclui estudos de identificação, purificação e produção de frações protéicas de várias espécies de leishmanias, capazes de induzir proteção, bem como a seleção de adjuvantes e avaliação da resposta imunológica em modelos animais. A segunda abordagem, pragmática, inclui a maioria das vacinas em testes clínicos atualmente, constituídas de extratos crus de leishmania ou formas vivas do parasito, as quais, embora padronizadas em alguns casos, são ainda muito pouco definidas. Ambas abordagens tem progredido e têm sido usados três procedimentos de vacinação.

a- Leishmanização. Consiste na inoculação do parasito vivo numa região não exposta do corpo, em pessoas que vivem em regiões de alta incidência da forma cutânea ou tegumentar da doença no velho mundo. Esta estratégia se baseia no fato de que as lesões promovidas pelas espécies de leishmania no velho mundo evoluem para cura espontânea, a qual está associada com um estado de proteção a infecções futuras pelo parasita. Em suma, consiste em promover a doença em pessoa sadia em condições controladas, de forma que um estado de imunidade se estabeleça nestes indivíduos contra infecções futuras. O fato de muitas das lesões artificialmente produzidas não terem evoluído para cura espontânea, levaram ao descarte desta metodologia de vacinação como método de uso em larga escala, sendo que ela não é mais recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

b- Vacinação com extratos de *Leishmania* sp. Embora mais restrita a modelos experimentais, esta abordagem foi testada recentemente com base nos resultados obtidos por MONJOUR *et al.* (1986a e b), que relataram a proteção contra a leishmaniose tegumentar induzida em um voluntário vacinado com um extrato solúvel de *L. brasiliensis*. Num segundo estudo de triagem clínica em área endêmica, MONJOUR *et al.* (1992) testaram frações antigênicas de *L. brasiliensis* como vacina em um grupo restrito de voluntários, obtendo resultados promissores e altamente encorajadores, apesar da ausência de controle nestes ensaios.

c- Vacinas baseadas em diferentes formas do parasito mortas. Esta abordagem tem sido aplicada no controle da leishmaniose tegumentar no Novo Mundo e tem dado resultados promissores, tendo sido inclusive aprovada pela organização Mundial de Saúde (OMS) para testes em humanos em áreas onde a doença é endêmica.

SALLES-GOMES (1939) utilizou uma suspensão de formas promastigotas mortas como antígeno imunizante em indivíduos na cidade de São Paulo, Brasil. A vacina consistia

de uma suspensão de formas promastigotas de *Leishmania* sp dermatrópicas, mortas com fenol, que eram inoculadas em pacientes com leishmaniose tegumentar americana (LTA). Dois efeitos chamaram atenção do autor: as reações gerais diminuía em grau, após injeção intravenosa da suspensão e, havia um efeito terapêutico, caracterizado pela redução no tamanho das lesões no paciente à medida que o tratamento progredia.

PESSÔA & PESTANA (1940) utilizaram uma suspensão de promastigotas constituída de 18 linhagens dermatrópicas de *Leishmania* sp como vacina, preparadas numa solução salina contendo fenol. Esta vacina foi injetada em 527 indivíduos, sabidamente negativos para o Teste de Montenegro, por via intramuscular. Um grupo controle de 600 indivíduos não vacinados foi incluído também neste estudo de triagem. Após 20 meses foi observado que 18% do grupo controle encontrava-se infectado com *Leishmania*, quando comparado aos 3.2% de indivíduos infectados no grupo vacinado, correspondendo a uma redução de 80% da infecção no grupo vacinado. Os autores também relataram a ausência de quaisquer efeitos colaterais significativos no grupo vacinado protegido (80% não infectados após a vacinação), sendo que o Teste de Montenegro dos indivíduos restantes (20% não protegidos) permaneceu negativo.

MAYRINK *et al.* (1979) desenvolveram uma vacina constituída de formas promastigotas de cinco linhagens dermatrópicas de Leishmanias. A vacina constituía-se de uma suspensão de promastigotas do parasito mortos e sonicados, suspensos em tampão fosfato 0,10 M pH 7,40, contendo timerosal na proporção de 1:10000. Os autores verificaram que a administração intramuscular desta vacina era capaz de induzir um teste de Montenegro positivo em indivíduos voluntários. Pela primeira vez ficou demonstrado que uma preparação de parasitos mortos era capaz de gerar uma resposta imune do tipo

celular em humanos. Os autores também ressaltaram que nenhum efeito colateral significativo foi observado após a vacinação.

Cinco ensaios clínicos utilizando a vacina produzida por MAYRINK *et al.* (1979) foram conduzidos de 1978 a 1990. Nestes estudos foram testados desde diferentes protocolos de vacinação, variações no número e nas linhagens constituintes da vacina, ensaios de imunoterapia utilizando a vacina e avaliação da resposta imune humoral e celular observada em indivíduos vacinados. Um encontro científico, patrocinado pela OMS, foi realizado em 1991 para discutir os resultados destes estudos e entre as conclusões e decisões tomadas ressaltaram-se:

1- A BIOBRÁS S/A (Bioquímica do Brasil) iria produzir a formulação da vacina constituída de cinco cepas do parasito (IFLA/BR/67/PH8, uma linhagem de *L. amazonensis*, MHOM/BR/70/M1176, uma linhagem de *L. guyanensis*, MHOM/BR/60/BH6, uma linhagem de *L. mexicana* e, MHOM/BR/71/BH49 e MHOM/BR/73/BH121, linhagens de *L. major*-Like (Silva *et al.* 1994)). Esta vacina recebeu a denominação de LEISHVACIN[®] e seria feita segundo normas GMP (Good Manufacturing Practices) da OMS. Esta vacina pentavalente, produzida em escala industrial, passou a ser utilizada a partir de então em novos ensaios clínicos, em regiões de alta incidência da doença.

2- Em virtude das insuficientes indicações de diferenças de imunogenicidade entre as diferentes linhagens, critérios técnicos mais que imunológicos seriam adotados na escolha de uma linhagem do parasito, para produção de uma vacina constituída de cepa única.

3- Entre as conclusões dos estudos utilizando a LEISHVACIN[®] na formulação pentavalente destacaram-se:

- i- Antígenos purificados da vacina pentavalente, isolados ou em combinação, apresentam eficácia semelhante a da vacina original na indução de proteção, quando testados em modelos experimentais (REGALADO *et al.* 1992, SANTOS *et al.* 1994).
- ii- Uma vacina de constituição química definida, com antígenos desta vacina, necessariamente deve conter mais que um dos antígenos isolados e testados nos ensaios de imunização em modelos experimentais.
- iii- A vacina apresenta propriedades terapêuticas quando utilizada isoladamente, ou em combinação com os fármacos utilizados tradicionalmente na terapia contra a doença, quando testada em humanos (MAYRINK *et al.* 1991, MAYRINK *et al.* 1992)
- iv- Tanto as propriedades de indução de proteção quanto as propriedades terapêuticas da vacina são mantidas após o armazenamento por 14 meses e/ou após autoclavagem (COSTA *et al.* 1996).
- v- A produção industrial do LEISHVACIN[®] se concentraria numa única linhagem, ou seja, a marca LEISHVACIN[®] passaria a ser utilizada apenas para denominar a versão monovalente da vacina. A linhagem escolhida para sua produção foi a IFLA/BR/67/PH8 (MAYRINK *et al.* 1978, MAYRINK *et al.* 1979, MAYRINK *et al.* 1985, ANTUNES *et al.* 1986, MAYRINK *et al.* 1989, NASCIMENTO *et al.* 1990, TAVARES *et al.* 1991, COSTA *et al.* 1996, GUIMARÃES *et al.* 1996, A Technical Consultation on Vaccine Development. Meeting on Vaccines. Washington. Fevereiro de 1991, Meeting on Vaccines Against Leishmaniasis. Belo Horizonte. Setembro de 1991).

Recentemente um novo programa de vacinação, utilizando formas promastigotas mortas de *L. major*, autoclavadas, foi aplicado no Sudão. A leishmaniose visceral é endêmica nesta região, sendo que cerca de 5093 voluntários humanos foram vacinados com duas doses intramusculares desta vacina, acrescida ou não de BCG. Os voluntários

vacinados foram acompanhados por cerca de 2 anos, não sendo observada nenhuma evidência significativa de níveis de proteção diferentes entre os dois protocolos de vacinação. Indivíduos vacinados que apresentaram a reversão do teste de Montenegro foram menos acometidos da doença. O índice de proteção alcançado neste ensaio de vacinação foi 40%. (KALIL *et al.* 2000).

Ensaio de vacinação utilizando formas promastigotas mortas tem sido testada em modelos animais filogeneticamente próximos ao humano. Vacinas constituídas por promastigotas de *L. major* autoclavadas (ALM) encontram-se em fase II de testes como vacina, utilizando protocolos de duas e três doses da vacina acrescida de BCG. Índices de proteção satisfatórios contra infecção por *L. donovani* têm sido obtidos em ensaios utilizando macacos *Presbytes entellus*. MISRA *et al.* (2001) testaram a utilização de ALM ou de vacina constituída por antígenos autoclavados de *L. Donovanii* (ALD), precipitados com alúmen e acrescidas de BCG neste mesmo modelo animal. Índices de proteção significativos foram obtidos utilizando estas formulações em ensaios de vacinação com dose única via intravenosa. Os níveis de IFN- γ no sobrenadante de PBMCs do grupo vacinado foi sempre superior aos níveis de IFN- γ do grupo controle, após estimulação tanto por ALD quanto por ALM. Os autores sugeriram a formulação do ALM precipitada com alúmen acrescida de BCG como potencial vacina contra leishmaniose visceral.

O controle das leishmanioses através de vacinação têm também explorado o uso de moléculas dos vetores do parasito como antígenos. KANHAWI *et al.* (2000) demonstraram que a saliva de *Phlebotomus papatasi* é capaz de conferir proteção contra infecção por *Leishmania major* em modelo murino. Mais importante ainda neste estudo foi o fato dos flebotomíneos utilizados no estudo não estarem infectados com *L. major*. O efeito protetor,

segundo este estudo, estava fortemente associado a promoção de uma reação de hipersensibilidade retardada (DTH) nos animais vacinados, caracterizada por intensa produção de IFN- γ no sítio de injeção de saliva dos flebotomíneos. O efeito protetor também foi observado em animais previamente inoculados com extrato de glândula salivar de flebotomíneos não infectados mais *L. major*, porém, a injeção apenas de *L. major* não era capaz de conferir proteção à picada por flebotomíneos infectados com o parasito.

Em estudo recente foi isolada uma proteína salivar de *P. papatasi*, de cerca de 15 KDa, capaz de conferir proteção contra infecção por *L. major* no modelo murino, em animais desafiados com extrato de glândula de *P. papatasi* mais *L. major*. Semelhante proteção foi obtida em animais vacinados com cDNA desta proteína de 15 KDa, sendo observada tanto uma intensa resposta do tipo DTH quanto humoral nos animais vacinados. Animais deficientes de células B, vacinados com cDNA da proteína de 15 KDa, apresentaram níveis satisfatórios de resistência a infecção por *L. major* mais o extrato de glândula salivar do flebotomíneo, o que indica que a resposta de DTH é a principal responsável pelo efeito protetor observado nestes animais (VALENZUELA *et al.* 2001).

Como os cães constituem o principal reservatório de parasitos causadores de leishmaniose em centros urbanos, vacinas visando proteger estes animais têm sido investigadas nos últimos anos, principalmente por serem estes os principais propagadores da forma visceral da doença para humanos. Os aspectos a serem considerados para obter-se uma vacina eficiente para controlar a progressão das leishmanioses em cães foram recentemente discutidos por GRADONI (2001). Numa primeira tentativa de vacinar cães contra leishmaniose visceral, utilizou-se preparações liofilizadas de proteínas de *L. donovani*, de pesos moleculares entre 94-67 KDa. Neste estudo, os níveis de proteção

obtidos durante o primeiro ano de acompanhamento foram inferiores ao do grupo controle, entretanto esta relação inverteu-se no segundo ano pós vacinação dos animais. Os autores deste estudo argumentaram que, apesar de se mostrar eficiente em modelo murino, esta vacina não era capaz de conferir proteção por longo tempo contra a leishmaniose visceral nos cães utilizados neste estudo (DUNAN *et al.* 1989). O antígeno FMN (fucose-manose ligand) isolado por PALATNIK *et al.* (1989) foi descrito como uma das moléculas importantes para a penetração da *Leishmania donovani* no interior dos macrófagos. Este antígeno é uma fração glicoprotéica complexa, composta predominantemente por monossacarídeos (60%), rica em resíduos de fucose, manose e galactose. Estudos recentes tem utilizado este antígeno como vacina para o controle da leishmaniose visceral em cães. Estes estudos já se encontram em fase III de testes e uma proteção de cerca de 92% foi obtida entre os animais vacinados. Os animais vem sendo acompanhados a cerca de dois anos, indicando que o FMN pode ser útil para o controle da leishmaniose visceral entre cães (SILVA *et al.* 2001).

A despeito das diferentes formulações de vacinas utilizadas em ensaios clínicos em humanos terem se concentrado em misturas complexas de parasito e/ou antígenos purificados, diversos estudos têm sido descritos sobre a possibilidade de se obter vacinas de constituição química definida. Estes estudos envolvem desde a purificação de antígenos quanto estudos sobre sua imunogenicidade, sobre a imunogenicidade de regiões isoladas da estrutura química dos antígenos (mapeamento de determinantes antigênicos) e, finalmente, a possibilidade de se utilizar misturas de diferentes epitopos relevantes e sabidamente protetores contra a leishmaniose, seja na sua forma original ou com algumas alterações na sua estrutura química original.

Dentre os diversos antígenos isolados, candidatos potenciais a vacina quimicamente definida contra leishmaniose destacam-se a gp63, a glicoproteína mais abundante da superfície de leishmanias e o lipofosfoglicano (LPG), a principal molécula de superfície de formas promastigotas de todas as espécies de leishmanias. NASCIMENTO *et al.* 1990 imunizaram voluntários humanos contra leishmaniose tegumentar utilizando LEISHVACIN[®], composto de estoques de cinco ou seis linhagens de *Leishmania*, com e sem *Corynebacterium parvum* (*C. parvum*) como adjuvante. Os autores não observaram nenhuma diferença entre o índice de estimulação de linfócitos de pacientes nos grupos vacinados apenas com Leishvacin ou com a vacina combinada com o adjuvante, entretanto o índice de estimulação era significativamente maior para os grupos vacinados, quando comparados ao grupo controle não vacinado. Utilizando ensaios de linfoproliferação de linfócitos (PBL) dos indivíduos vacinados e de imunoprecipitação com soros dos mesmos indivíduos os autores concluíram que, dentre os antígenos responsáveis pela proteção salientava-se a gp63, que é imunogênica tanto a nível de resposta celular quanto humoral.

Usando uma série de peptídeos sintéticos derivados da seqüência da gp63 de *L. major*, YANG *et al.* (1991) identificaram onze epitopos reconhecidos por células T de camundongos CBA e BALB/c. Seis dos peptídeos sintéticos eram reconhecidos por células T de camundongos CBA infectados experimentalmente com *L. major*. Após imunização com os peptídeos, observou-se que células de linfonodos dos animais eram capazes de reconhecer os mesmos peptídeos (sete para CBA e um para BALB/c). Cinco peptídeos compreendendo os resíduos 10 a 28 (p10-28), p22-40, p209-309, p459-471 e p467-482, induziam uma vigorosa resposta celular nos camundongos CBA, mas não eram reconhecidos por células T isoladas do mesmo animal. Quatro peptídeos (p321-336, p364-476, p372-385 e p378-396) eram reconhecidos por células T provenientes de camundongos

CBA imunizados, mas não por células de animais normais. Três peptídeos (p146-171, p289-309 e p395-414) eram capazes tanto de induzir uma resposta de células T, quanto de serem reconhecidos por células recuperadas do animal após a imunização. Apenas dois peptídeos (p146-171 e p467-482) eram capazes de ativar células T, que também reconheciam epitópos expressados por células apresentadoras de antígeno (APC), de animais previamente infectados com promastigotas de *L. major*. As células T ativadas com estes peptídeos ou com uma mistura de ambos eram CD4⁺ produtoras de IFN- γ e de IL-2, mas não de IL-4. Estes dois peptídeos induziam uma típica resposta do tipo retardada (DTH) em camundongos CBA. Imunização de camundongos CBA com uma mistura dos dois peptídeos, com ou sem adjuvante (*C. parvum*), ou incorporados em lipossomos, induziu uma significativa resistência nos animais a uma subsequente infecção por *L. major*. A produção de uma vacina sintética composta por estes dois peptídeos foi sugerida pelos autores.

Peptídeos derivados da seqüência da gp63, com potencial para induzir proteção na infecção por *L. major*, foram também estudados por SOARES *et al.* (1994). Utilizando camundongos susceptíveis e não susceptíveis a infecção pelo parasito, BALB/c e C57BL/6 respectivamente, estes autores concluíram que peptídeos mais extensos e derivados da porção central da seqüência da gp63 eram mais eficientes em desencadear uma resposta do tipo Th1, em comparação com peptídeos derivados das seqüências vizinhas à região central da molécula, ou seqüências derivadas dos extremos da estrutura da proteína.

Estudos de imunização de camundongos CBA, utilizando como antígeno um peptídeo sintético derivado da gp63, compreendendo a região da proteína constituída pelos resíduos 467 a 482 (p467), covalentemente modificado na porção amino terminal pela adição de um

grupo lauril-cisteína (LC-p467) foram conduzidos por FRANKENBURK *et al.* (1996). Esses autores observaram que, em contraste com a exacerbação da doença observada quando animais eram imunizados com o p467, cisteinil-p467 ou a glicoproteína intacta e posteriormente desafiados com *L. major*, significativa proteção era obtida com a imunização utilizando o peptídeo modificado LC-p467. Também relataram uma intensa resposta proliferativa, seguida da secreção de IL-2, IFN- γ e GM-CSF pelas células esplênicas dos camundongos imunizados com o LC-p467, sugerindo que a imunização com o antígeno modificado induziu uma resposta do tipo Th1, associada com uma imunidade mediada por células.

GUIMARÃES *et al.* 1996 demonstraram que entre os diversos antígenos purificados da LEISHVACIN[®] e testados como vacina, a gp63 proveniente das cinco linhagens de leishmania constituintes da vacina, era capaz de conferir proteção em camundongos C57BL/10 infectados com *L. amazonensis*. Entretanto foram observadas diferenças significativas nos níveis de IL-2 e IFN- γ produzidos pelas células esplênicas dos animais após a imunização, dependendo da gp63 utilizada. Mesma observação pôde ser feita em relação aos níveis de IgM sérica que, apesar de aumentados após vacinação, não era igualmente aumentado para todas as gp63 utilizadas.

TSIKARIS *et al.* (1996) ligaram covalentemente a seqüência antigênica IARSRYDQL da gp63 aos grupos H₂ do épsilon amino de um carreador oligopeptídico contendo lisina como amino terminal. A estrutura química obtida ainda apresentava o octapeptídeo na sua estrutura química original, sendo esta estrutura utilizada para imunização de coelhos. Altos títulos de anticorpos capazes de reconhecer o octapeptídeo e a própria gp63 foram observados. Os autores sugeriram que este modelo quimicamente

definido poderia ser utilizado para incorporar epitopos protetores de leishmania, na formulação de uma vacina sintética multivalente.

Estudos sobre a antigenicidade e conformação das seqüências compreendendo a região dos sítios de ligação de Zn de diversas metaloproteases, entre estas a gp63 de *L. major* e a endopeptidase 24.11 de mamíferos (E-24.11) foram conduzidos por SOTERIADOU *et al.* (1996). Peptídeos sintéticos correspondentes a estrutura primária da região do sítio de ligação do Zn destas metaloproteases foram produzidos e anticorpos oligoclonais dirigidos contra eles foram purificados por afinidade. Os anticorpos eram altamente seletivos quando testados contra os respectivos peptídeos, a partir dos quais foram produzidos, entretanto foi observada a ocorrência de reatividade cruzada quando o mesmo anticorpo oligoclonal era testado contra a gp63 e a E-24.11 de mamíferos.

PAPADOPOULOU *et al.* (1998) relataram a imunização de camundongos BALB/c com gp63 incorporada em complexos imunoestimulantes (ISCONS). A proteção obtida foi avaliada pela redução das lesões após desafio dos animais vacinados com *L. major*. Os autores relataram um aumento da expressão de IgG nos soros dos animais vacinados, com mudança para o isotipo IgG2a. Células do baço, previamente colocadas em contato com os complexos imunoestimulantes e, em seguida reestimuladas *in vitro* com antígenos solúveis de leishmania ou com parasitos vivos, apresentaram intensa resposta proliferativa contra gp63, secretando altos níveis de IL-2, IFN- γ e IL-10, mas não de IL-4.

Camundongos BALB/c imunizados com uma gp63 recombinante de *L. major*, incorporada a ISCONS ou com *C. parvum* como adjuvante, seguidos de infecção desafio com *L. major*, apresentaram um perfil de resposta do tipo Th1. Apesar desta imunização desencadear uma resposta do tipo Th1, não houve uma indução de imunidade protetora nos

animais vacinados. Segundo os autores estes resultados sugerem que a indução de proteção dependeria de uma habilidade do antígeno induzir células “Th1-like”, previamente comprometidas com a infecção. Eles também sugeriram que a conformação do antígeno pode ter uma importância muito mais ampla na indução de uma imunidade mediada por células T, que aquela proposta originalmente na literatura (SJOLANDER *et al.* 1998).

Estudos recentes tem revelado aspectos moleculares da interação da gp63 de *L major* com receptores celulares. PETIT *et al.* (1998) sintetizaram o octapeptídeo IASRYDQL, correspondente aos resíduos 250-257 da gp63 e obtiveram anticorpos monoclonais dirigidos contra a seqüência imunogênica SRYD. Estes anticorpos reconheceram tanto os peptídeos contendo a fração SRYD quanto a gp63 intacta. Dois peptídeos contendo a fração RSYD mimetizam a seqüência RGDS de fibronectinas, sendo capazes de inibir a ligação do parasito à superfície de macrófagos. A estrutura do complexo RSYD ligada ao anticorpo monoclonal teve sua estrutura conformacional resolvida, mostrando-se comparável tanto a estrutura do octapeptídeo livre em solução de DMSO, quanto a estrutura do octapeptídeo ligado a um anti-anticorpo que imita os sítios de ligação RGDS de macrófago.

A estrutura cristalográfica completa da gp63 de formas promastigotas de *L major* foi obtida por SCHLAGENHAUF *et al.* em 1998. Da análise desta estrutura destacam-se a intensa similaridade estrutural entre a gp63 e outras metaloproteases de tripanossomatídeos. Também foram observados uma série de motivos estruturais novos, sugerindo que este tipo de estrutura pode ser mais amplamente distribuído entre zinco-proteases. A estrutura do sítio ativo da gp63 apresenta intensa similaridade com o sítio ativo de outras zinco-proteases descritas. Estas informações podem ser úteis para o desenvolvimento de inibidores específicos, o que permitiria estudar o papel da gp63 na infecção do inseto vetor pelo parasito e o seu papel no curso da infecção nos hospedeiros vertebrados. O

conhecimento da resposta imune desencadeada por porções da gp63 de diferentes linhagens de *Leishmania* têm permitido testar vacinas de composição definida, baseadas apenas naquelas porções da molécula capazes de induzir proteção significativa. SPITZER *et al.* (1999) sintetizaram o peptídeo correspondente a porção da molécula de gp63 de *L. major*, onde se localiza a His que liga o átomo de Zn pertencente ao centro ativo. Este peptídeo, denominado PT3, foi sintetizado mantendo o único resíduo de Met presente no peptídeo na forma oxidada, como Met sulfóxido. Uma única injeção de PT3 mais o adjuvante poloxâmico 407 foi capaz de induzir proteção em camundongos BALBc desafiados com promastigotas de duas linhagens de *L. major*, proteção esta que se estendeu por cerca de 10 meses pós a infecção.

Outro grupo de moléculas extremamente importantes na infecção por leishmanias são os glicoconjugados. Muita atenção têm sido recentemente dada ao estudo desta família de moléculas, tendo sido observada sua produção em diferentes estágios de vida do parasito, como moléculas associadas ou não a membrana, secretadas ou não e livres ou associadas a outras macromoléculas. Em 1972, SCHNUR *et al.* mostraram que formas promastigotas de leishmanias excretam componentes antigênicos para o meio de cultura, os quais eles denominaram fator excretado (EF). Este fator, semi-purificado, foi reconhecido por anticorpos relacionados ao parasito, sendo observada a precipitação de complexos Ag/Ac destes materiais. Aquecimento era capaz de romper os complexos imune, entretanto o EF não tinha sua capacidade antigênica abolida após este tratamento. Foram obtidos EF de promastigotas de *L. tropica* e *L. donovani*, sendo que o EF de *L. donovani* constitui-se de um material altamente negativo, resistente a uma série de tratamentos químicos e extremos de pH, sendo todavia sensível a solventes orgânicos como dioxano e acetona.

SLUTZKY & GREENBLAT (1977) obtiveram frações antigênicas de *L. tropica*, através da precipitação do meio de cultura com soro de coelho imunizado com o meio de cultura ou com soro de coelhos infectados com promastigotas de *L. tropica*, seguida de cromatografia do precipitado com Sephadex G 120-150. As frações eluídas imediatamente após o volume de exclusão da coluna, apesar de ricas em proteína, não continham quaisquer antígenos reconhecidos por soro de animais imunizados com meio de cultura, ao passo que as frações seguintes, de conteúdo protéico decrescente, apresentavam reatividade crescente contra este soro. Estas frações foram reunidas e o componente protéico (cerca de 80%) foi separado do componente sacarídico. O componente protéico reagiu com o soro de coelhos previamente infectados com *L. tropica*, enquanto que o soro dos coelhos imunizados com meio de cultura reagiam com o componente sacarídico. Estes autores sugeriram que este componente corresponde ao fator excretado de *L. tropica* (EF).

Os exometabólitos antigênicos de leishmanias têm sido alvo de discussão e de controvérsias na literatura, sobretudo sobre sua constituição química. SEMPREVIVO (1978) descreveu os exometabólitos de promastigotas de *L. donovani* como um glicopetídeo de baixo PM, exibindo espectros de absorção máximos em 193 e 278nm. DECKER-JACKSON & HONIGBERG (1978) descreveram estes exometabólitos como uma glicoproteína, com máximos de absorção em 230, 260 e 280 nm. EL-ON *et al.* (1979) descreveram os mesmos exometabólitos como substâncias semelhantes a um polissacarídeo, com espectros de absorção máximos em 220 e 730 nm. Afim de definir a natureza química dos exometabólitos de promastigotas de *L. donovani*, SEMPRE-VIVO & HONIGBERG (1980) conduziram uma série de estudos simulando as diferentes condições em que os exometabólitos foram isolados, demonstrando que as diferenças observadas pelos autores era devida a forma de isolamento, aos tipos de meio de cultura utilizados,

forma de armazenamento e fase de vida da forma promastigota utilizada, e do tempo de cultivo da cultura da qual as formas promastigotas eram obtidas. Eles concluíram ainda que o exometabólito inicial é uma pequena molécula semelhante a um glicopeptídeo, sendo as diferentes formas químicas dos fatores de excreção encontradas na literatura, o resultado de modificações espontâneas que ocorrem após o isolamento deste glicopéptideo.

MITCHEL & HANDMAN (1986) descreveram um glicoconjugado solúvel derivado de *L. major*, cuja injeção em camundongos geneticamente resistentes C57BL/6, levava a um aumento nas lesões e a persistência da infecção nestes animais. Este glicoconjugado é derivado de um glicolípide ligado a membrana do parasita e que, segundo os autores, seria o ligante utilizado pelo parasito para ligação ao receptor localizado na superfície dos macrófagos. Células linfóides de camundongos BALB/c imunizados contra o glicoconjugado e transfectadas para camundongos BALB/c “nude” induziram a leishmaniose cutânea nestes animais. Segundo estes autores as células transfectadas seriam diferentes daquelas provenientes de animais não imunizados que, é sabido, são células capazes de permitir a reconstituição nos camundongos “nude “ sem induzir infecção. Ainda segundo os autores este glicoconjugado pode ser uma molécula importante para indução de proteção contra a leishmaniose, mas a presença de elementos protetores ou indutores da doença na mesma estrutura química poderia complicar sua utilização como vacina.

Um glicoconjugado da superfície de formas promastigotas de *L. donovani* foi isolado por KING *et al.* em 1987. A molécula constituía-se de uma porção lipídica, uma sacarídica e continha ainda grupos fosfato na sua constituição, sendo denominada portanto como lipofosfoglicano (LPG). PIMENTA *et al.* (1991) estudaram glicoconjugados de superfície de *L. major* e relataram a ocorrência de LPG também nesta espécie. Sabe-se hoje que o LPG corresponde a principal molécula de superfície, incluindo o flagelo, de formas

promastigotas de todas as espécies de leishmanias. Todos os LPGs estudados são constituídos de 4 domínios: uma âncora de lipídeos de fosfatidilinositol, um núcleo de fosfosacarídeos, uma região rica em repetições de açúcares fosforilados e um pequeno “cap” oligosacarídico. A análise de LPGs de várias espécies de leishmanias revelou que a âncora de fosfatidilinositol e o núcleo de fosfosacarídeos são extremamente conservados entre as diferentes espécies do parasito, enquanto que a composição de açúcares e a seqüência das repetições sacarídicas fosforiladas variam de uma espécie para outra, assim como a estrutura do “cap” (TURCO & DESCOTEUX (1992). Existem ainda algumas características estruturais dos LPGs que os torna bem distintos dos glicoconjugados de eucariotos. A porção polissacarídica é ancorada pôr um derivado fosfolipídico incomum, um 1-*O*-alquil-2-liso-fosfatidil(mio) inositol. A cadeia alifática consiste sempre de hidrocarbonetos de 24 ou de 26 carbonos saturados e sem ramificações. O core fosfosacarídico apresenta entre outros, resíduos de galactofuranose, incomuns em glicoconjugados eucarióticos. Outro aspecto importante é a presença da unidade repetitiva Gal(α 1,3)Gal, um dos epitopos para os quais anticorpos circulantes têm sempre sido descritos em pacientes infectados com leishmanias.

O aspecto mais marcante da estrutura dos LPGs encontra-se nas unidades sacarídicas fosforiladas. Todas elas são múltiplas unidades de um esqueleto do tipo PO_4^{4-} 6Gal(β 1,4)Man(α 1). Outra característica marcante desta porção da molécula é o resíduo de Man 4-*O* substituído, ausente em qualquer glicoconjugado conhecido de eucariotos. A presença nas unidades sacarídicas fosforiladas da repetição do dissacarídeo Gal-Man, comum aos LPGs descritos, e as substituições no grupo OH do C3 de resíduos de Gal, variáveis de uma espécie para outra, podem responder pelos epitopos espécie-específicos

descritos na literatura. Outro aspecto relevante desta região da molécula é que, em estudos de dinâmica molecular, observou-se que as unidades dissacarídicas repetidas, em solução, apresentam restrições de mobilidade em torno das ligações Gal(β 1,4)Man, enquanto que uma série de rotâmeros de baixa energia são obtidos para as repetições Gal(α 1,4)Man, sendo que elas podem ser encontradas, numa mesma molécula de LPG, em diferentes configurações, permitindo inclusive que a molécula possa variar seu comprimento em até duas vezes. Também foi observado que o grupo OH, ligado ao C3 do resíduo de Gal, em qualquer dos rotâmeros de baixa energia, encontra-se exposto ao solvente e apresenta alto grau de mobilidade. Isto é relevante pois é nesta posição que ocorrem as substituições de resíduos, observadas nos LPGs de diferentes espécies do parasito (ORLANDI & TURCO 1987, MACCONVILLE *et al.* 1990, HOMANS *et al.* 1992, ILG *et al.* 1992).

Também é sabido que partes da estrutura do LPG são encontradas em outras moléculas do parasito, como nas âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPIs) e nos glicosilinositolfosfolípides de leishmanias, no fator excretado (EF) e como parte da estrutura química de glicoproteínas. O LPG também é encontrado complexado com proteínas dos meios de cultura, ou com proteínas séricas dos hospedeiros vertebrados, sendo que esta forma têm implicações a nível da resposta imune do hospedeiro infectado. Partes da estrutura do LPG foram observadas também em uma série de glicoconjugados excretados, como na fosfatase ácida (SAP) encontrada em meios de cultura, que contém as repetições de fosfoglicanos do LPG como parte de sua estrutura química, ou nos fosfoglicanos que contém o “cap” ligado às mesmas unidades fosfosacarídicas encontradas no LPG (JARDIM *et al.* 1991, MENDONÇA *et al.* 1991, KELLEHER *et al.* 1992, TURCO & DESCOTEUX 1992, MENDONÇA *et al.* 1994, BEVERLEY & TURCO 1998).

Recentemente, vacinas sintéticas e semi-sintéticas tem sido propostas explorando o tetrasacarídeo correspondente ao ‘cap’ do LPG de *L donovani*. O tetrasacarídeo contendo a ligação incomum Gal- β -(1 \rightarrow 4)Man foi obtido por síntese química e, numa primeira construção o ‘cap’ foi conjugado ao imunoestimulador Pam₃Cys para produção de uma vacina totalmente sintética. Uma segunda construção foi feita conjugando o ‘cap’ sintético ao carreador protéico KLH, produzindo-se desta forma uma vacina semi-sintética. Os ensaios de proteção contra infecção por *L donovani* utilizando camundongos vacinados com estas construções estão em andamento (HEWITT & SEEBERGER 2001).

Muita informação têm sido acumulada sobre o papel do LPG na infecção por *Leishmania*. Esta molécula assim, como a gp63, têm sido considerada uma das prováveis candidatas a uma vacina de composição química definida contra a leishmaniose. Muitos aspectos da resposta imunológica, definidos em estudos com o LPG, com a gp63 e com partes da estrutura química de ambas, têm indicado que mais estudos devam ser conduzidos para definir melhor a resposta imune contra estes antígenos (MITCHELL & HANDMAN 1986, JAFFE *et al.* 1990, KEMP *et al.* 1991). Estudos recentes utilizando técnicas de biologia molecular têm fornecido informações sobre os genes e moléculas ligadas a síntese do LPG e de glicoconjugados de parasitos intracelulares, indicando que estes podem ser os determinantes de virulência, nestes tipos de parasitos (BEVERLEY & TURCO 1998, MENGELING & TURCO 1998). A importância e o papel destes conjugados nos processos de resposta imunológica e as suas interações com proteínas têm sido alvo de diversos estudos, tendo sido muito bem revistos (RUDD *et al.* 2001, SPENCER & DAVIES 2001).

II. OBJETIVOS.

II.1. Objetivo geral:

Isolar , identificar e fazer a caracterização molecular e imunogênica de antígenos presentes em amostras da vacina contra Leishmaniose Tegumentar Americana (LEISHVACIN[®]), submetidas a longos períodos de armazenamento.

II.2. Objetivos específicos:

II.2.1. Isolar antígenos a partir da fração solúvel de amostras de Leishvacin polivalente e monovalente;

II.2.2. Identificar a(s) cepa(s) de *Leishmania* das quais o(s) antígeno(s) isolado(s) da vacina polivalente são originados;

II.2.3. Comparar a natureza química e imunogênica do(s) antígeno(s) isolado(s) da vacina polivalente com aquele(s) obtido(s) de vacina monovalente;

II.2.4. Determinar o peso molecular dos antígenos isolados;

II.2.5. Determinar a natureza química dos antígenos isolados;

II.2.6. Determinar a composição química dos antígenos isolados;

III. MATERIAIS E METODOLOGIAS.

III.1. MATERIAIS

Extrato total de formas promastigotas de *Leishmania*.

Como fonte de extrato total de parasitos foram utilizadas amostras de vacinas contra Leishmaniose Tegumentar Americana (Leishvacin[®]), produzidas pela Bioquímica do Brasil (BIOBRAS, SA), como proposto por MAYRINK *et al.* 1979. Antígenos foram isolados de vacinas constituídas de cinco cepas do parasito: *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *Leishmania (Leishmania) mexicana* (MHOM/BR/BH6), *Leishmania (Viannia) guyanensis* (MHOM/BR/70/M1176), *Leishmania* major-like (MHOM/BR/BH49) e *Leishmania* major-like (MHOM/BR/63/BH21), lote 9031004-1V produzido em 1991. Antígenos foram também isolados de vacinas de cepa única do parasito, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), vacina monovalente, lote 3031012-1V produzido em 1993, ou vacina monovalente recém preparada.

Soros

Os soros humanos infectados com todas as formas de leishmaniose, soros de indivíduos vacinados e soros de pessoas residentes em área endêmica para leishmanioses, mas não afetados pela doença, e os soros de cães foram fornecidos pelo Departamento de Parasitologia da UFMG e tiveram o diagnóstico das infecções, quando presentes, confirmados por exame parasitológico. Os demais soros de pacientes foram fornecidos pela Fundação Hemominas e tiveram seu diagnóstico comprovado por teste de Elisa e por exame parasitológico.

III.2- METODOLOGIAS

III.2.1. Preparação dos extratos solúveis de parasitos.

Para obtenção da fração solúvel das vacinas, amostras de vacinas foram inicialmente centrifugadas a $1,0 \times 10^5$ g por 75 min a 10°C. O sobrenadante (fração solúvel) foi então recolhido e filtrado em filtro de 0,45 μ m e o precipitado desprezado. A fração solúvel de amostras de vacina pentavalente foi denominada SFE. A fração solúvel de vacina monovalente de longo tempo de armazenamento foi denominada SF8 e a da vacina recentemente preparada foi denominada FM8.

III.2.2. Quantificação de proteínas e de carboidratos totais.

Dosagens de proteínas totais

Todas as dosagens de proteínas foram feitas pelos métodos de LOWRY *et al.* 1951 ou pelo método de BRADFORD 1976. Foram utilizadas em cada método, albumina bovina e ovalbumina, respectivamente.

Dosagens de carboidrato total

Todas as dosagens de carboidrato total foram feitas pelo método do fenol/ácido sulfúrico como proposto por DUBBOIS *et al.* (1956) utilizando glicose como monossacarídeo padrão.

II.2.3. Isolamento dos antígenos.

Isolamento de antígenos por diálise em câmaras de microdiálise.

Câmaras de microdiálise tiveram seus compartimentos separados por membranas de diálise de poros de 12-14 KDa. Um dos compartimentos foi preenchido com 1,2 mL de fração solúvel das vacinas e o outro compartimento com 1,2 mL de solvente. Neste sistema de isolamento, amostras de dialisado foram obtidas utilizando como solventes água, carbonato de sódio 0,10M pH 7,40 e acetato de amônio 0,10M pH 6,70. Amostras de dialisado foram coletadas em vários intervalos de tempo e diferentes sistemas de solventes.

Como controle da integridade do sistema e das membranas de diálise, amostras de 1,2 mL de solução de tripsina suína (10 mg/mL) foram dialisadas contra 1,2 mL de HCl pH 3,0. Amostras de dialisado foram então coletadas e a atividade enzimática no dialisado foi medida utilizando uma solução do substrato trípico BapNA (N-Benzoil-DL-Tirosil-p-Nitroanilida) em tampão TRIS-HCl 0,050 M, pH7,40.

Isolamento de antígenos por métodos cromatográficos

Cromatografia de exclusão molecular em FPLC.

Amostras de fração solúvel das vacinas foram submetidas a cromatografia de exclusão molecular utilizando coluna Superose 12. Após o equilíbrio da coluna com tampão fosfato 0,10 M, pH 7,4, amostras da fração solúvel de diferentes formulações da vacina (SFE, SF8 ou FM8) foram aplicadas a coluna (2 mL/corrída) e eluídas com o mesmo tampão de equilíbrio, a temperatura ambiente. Foi utilizado um fluxo de 0,25 mL/min, sendo colhidas frações de 1,25 mL por tubo. A presença de material nas frações foi avaliada pelo monitoramento da absorção do eluato em 280nm. Frações de interesse foram coletadas e reunidas, concentradas e submetidas as etapa cromatográficas subsequentes. Uma curva de calibração da coluna foi feita utilizando como padrões de pesos moleculares o blue-dextran ($2,00 \times 10^6$ KDa), Álcool desidrogenase (150×10^3 KDa), soroalbumina bovina ($66,0 \times 10^3$ KDa), ovalbumina ($45,0 \times 10^3$ KDa), anidrase carbônica ($29,0 \times 10^3$ KDa) e ribonuclease ($14,7 \times 10^3$ KDa). Estes marcadores foram eluídos no mesmo tampão utilizado no isolamento de antígenos da fração solúvel das vacinas. O limite de exclusão desta coluna é de 300 KDa.

Cromatografia de exclusão molecular em HPLC.

As frações de interesse provenientes da cromatografia em coluna Superose 12 foram reunidas e submetidas a uma nova cromatografia de exclusão molecular utilizando a coluna Ultra Hydrogel Linear. Após o equilíbrio da coluna com tampão fosfato 0,10M, pH 7,4, amostras foram aplicadas e eluídas com o mesmo tampão de equilíbrio. Foi utilizado um fluxo de 0.8 mL/min e as frações eluídas foram coletadas manualmente. A presença de

material de interesse nas frações foi feita pelo monitoramento da absorção do eluato em 280nm e 212 nm, simultaneamente. As frações de interesse obtidas nesta etapa foram reunidas, dialisadas e concentradas para o próximo passo cromatográfico. Uma curva de calibração desta coluna foi feita utilizando como padrões de peso molecular, dextrans de $2,0 \times 10^6$, $600,0 \times 10^3$, $200,0 \times 10^3$, $75,0 \times 10^3$, $45,0 \times 10^3$, $10,0 \times 10^3$, $5,00 \times 10^3$, e cadeia alfa da insulina humana ($23,0 \times 10^2$), eluídos no mesmo tampão utilizado no isolamento de antígenos. O limite de exclusão da coluna Ultra Hydrogel Linear é de $7,00 \times 10^6$ KDa. O mesmo protocolo foi utilizado nas cromatografias de frações obtidas nesta mesma coluna.

Cromatografia de fase reversa em HPLC.

As frações de interesse provenientes da cromatografia de exclusão molecular em HPLC foram submetidas a uma cromatografia de fase-reversa em HPLC utilizando a coluna RP 300 HR (coluna C8) de 250/4,5 mm. Como eluente foi utilizada um solução de acetonitrila (CH_3CN) 70% em ácido trifluoroacético (TFA) 0,08%. A coluna era previamente equilibrada com solução de TFA 0,02%. Após o equilíbrio da coluna, as amostras suspensas em H_2O eram aplicadas a coluna e eluídas em gradiente crescente de solução de CH_3CN em TFA a temperatura ambiente. Foi utilizado um fluxo de 1,5 mL/min. Frações correspondente aos picos eluídos foram coletadas manualmente. A presença de material de interesse nas frações foi avaliada pelo monitoramento da absorção do eluato em 280nm e 212 nm, simultaneamente. Nesta etapa as amostras foram também secas em “speed vac” e em seguida ressuspensas no solvente apropriado para as subseqüentes análises. O mesmo protocolo foi utilizado quando amostras coletadas nesta coluna foram submetidas nesta mesma coluna.

III.2.4. Caracterização imunogênica dos antígenos isolados.

Caracterização por ensaios de ELISA.

Frações antigênicas foram selecionadas através de ensaios de ELISA como realizado por TAVARES *et al.* (1984). Placas de ELISA de 96 poços foram sensibilizadas e incubadas durante uma noite com os antígenos diluídos em tampão carbonato / bicarbonato de sódio 0,50 M, pH 9,60. Após esta incubação as placas foram lavadas 3 vezes com tampão salina fosfato 0,150 M, pH 7,40 (PBS), contendo 0,050% de Tween 20 (PBS-Tween) e incubadas por 1 hora com solução de albumina bovina 2,0% em PBS. Após este período as placas foram lavadas e incubadas com os soros teste diluídos em tampão de incubação (PBS contendo 0,10% albumina bovina) por 1 hora a 37°C. Após 3 lavagens as placas eram então incubadas com os conjugados apropriados, diluídos em tampão de incubação, por 1 hora a 37°C. Após 5 lavagens com PBS-Tween e 1 lavagem com PBS as placas foram incubadas com solução reveladora (tampão citrato/fosfato 5,0 M, pH 5,0, contendo 0.012% H₂O₂ e 0,0020% de OPD) por 15 minutos. A reação foi então paralisada pela adição de 20 µl de H₂SO₄ 8,0N e a densidade ótica em 492nm determinada em leitor automático de ELISA.

Caracterização por ensaios de “Western Blotting”.

Após separação dos antígenos por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (descrito em 3.2.5), bandas contidas no gel foram submetidas à eletrotransferência para membranas de nitrocelulose (0,22 μ) segundo método descrito por TOWBIN *et al.* 1979. Após a transferência as membranas de nitrocelulose foram cortadas em tiras de cerca de 0,50 mm. Tiras contendo marcadores de peso molecular foram reveladas por coloração com Ponceau 0,50% em solução de ácido acético 10%. Tiras contendo amostras foram lavadas com PBS-Tween 5,0% por 20 min. sob agitação. Em seguida as tiras foram incubadas com PBS-Tween contendo 0,30% de caseína por 30 min. Após o bloqueio, as tiras foram então incubadas com os soros apropriados diluídos em PBS-Tween por 60 min, sob agitação. Após esta etapa as tiras foram submetidas a duas lavagens de 20 min com PBS-Tween e duas lavagens de 20 min. com PBS. As bandas reativas foram evidenciadas pela incubação das tiras em tampão TRIS-HCl 0,10 M, pH 7,40, contendo 0,050% de 3,3' diaminobenzidina e 0,10% de H₂O₂. A reações foram paralisadas pela adição de ácido acético 60%.

III.2.5. Caracterização química dos antígenos isolados.

Caracterização por métodos eletroforéticos em géis de poliacrilamida (PAGE).

As eletroforeses em gel de poliacrilamida foram conduzidas segundo proposto por LAEMLI 1970, com ligeiras modificações. Amostras foram suspensas e dissolvidas em tampão TRIS-HCl 0,5 M, pH 6,8, contendo 0,002% de SDS e, 0,10% de azul de bromofenol (tampão de amostras). Quando conveniente, o tampão de amostras era acrescido de 5,0% de agente redutor (2-mercaptoetanol) para verificar a presença ou não de ligações de dissulfeto nas bandas observadas no gel. Géis em condições nativas foram obtidos utilizando tampões de corrida e de amostras sem SDS. O tampão de corrida utilizado foi o tampão TRIS-HCl 1,5 M, pH 8,30, com ou sem SDS. As corridas foram desenvolvidas a 150 V.

Procedimentos de coloração dos géis de poliacrilamida pela método da prata.

Após a corrida eletroforética os géis foram coradas pela prata, como proposto por OAKLEY *et al.* 1980, com ligeiras modificações, para detecção de proteínas. Inicialmente os géis foram incubados por 1 h no sistema metanol / ácido acético / água na proporção 6,7: 1,0: 2,3. Em seguida os géis foram incubados por 1 h no sistema metanol / ácido acético / água na proporção de 0,67: 1,0: 8,33. Numa terceira etapa os géis foram incubados em glutaraldeído 10% por 45 minutos. Após extensiva lavagem para retirada do excesso de glutaraldeído, os géis foram incubados por 20 minutos em solução amoniacal de prata. A solução amoniacal foi preparada pela suspensão de 0,70g de AgNO_3 em 32 mL de solução de NaOH 0,36%, que foi titulada com NH_4OH até a completa dissolução da prata. O

volume da solução foi então completado para 100 mL com H₂O. Após incubação dos géis na solução de prata, procedeu-se a lavagem com H₂O (5 lavagens de 5 min) e à posterior revelação das bandas. A solução de revelação foi preparada pela mistura de 25 µL de ácido cítrico 2,60 M e 100 µL de formaldeído em 100 mL de H₂O. Os géis foram mantidos na solução reveladora até a visualização das bandas, sendo que a reação foi paralisada pela substituição da solução reveladora por ácido acético 0,020%.

Coloração dos géis de poliacrilamida pelo método do ácido periódico-base de Schiff (Periodic Schiff Acid, PAS).

Para detecção de carboidratos, géis de poliacrilamida foram corados pelo método do PAS como proposto por DUBBOIS et al. 1956, com algumas modificações. Após a corrida eletroforética os géis foram incubados por 1 h numa solução fixadora composta por metanol / ácido acético / água na proporção de 7,0: 2,0: 1,0. Em seguida os géis foram incubados em 60 mM de H₅IO₆ em CH₃COOH 5% por 1 h. O géis foram em seguida brevemente lavados com água e incubados por 20 minutos em 10 mM de Na₂S₂O₅ em CH₃COOH 5%. Após lavagem dos géis procedeu-se à revelação das bandas incubando o gel reagente de Schiff por 2 h. O reagente de Schiff foi preparado pela dissolução de 4g de fucsina básica em 800 mL de água a 100°C. Após fervura por 5 minutos, a solução foi resfriada até 50°C e acrescida de 100 mL de HCl 1,0 M sob agitação. A mistura foi então resfriada até 25°C e adicionou-se 6,80g de Na₂S₂O₅. Após incubação por uma noite a 4°C, a solução foi decantada com 20g de carvão ativado durante 12 h, pré-filtrada em filtro de papel Whatman N° 1 e em seguida filtrada em membrana Millipore de 0,45µ.

Caracterização por eletroforese em géis de agarose (AGE).

Para a detecção de ácidos nucleicos nas frações, amostras foram submetidas a AGE como proposto por MANIATIS *et al.* 1982. Géis de 0,50% de agarose foram preparados pela dissolução a quente da agarose em tampão TRIS-borato 50 mM, pH 8,0, contendo 1,0 mM de EDTA (TBE). Após a suspensão em tampão da amostra (azul de bromofenol 0,040%, xilenocianol 0,040% e sacarose 6,60%) as amostras foram submetidas a eletroforese em TBE a 75V. Após a corrida o gel foi incubado em solução de brometo de etídeo 0,50 mg/mL e as bandas foram visualizadas em transiluminador sob luz ultra violeta.

Caracterização dos epitopos por tratamentos químicos e enzimático em placas de ELISA.

Após a sensibilização e bloqueio (ver item III.2.4), poços contendo amostras de antígenos (CT⁺) foram tratados por incubações isoladas em 100 µL, por 4 h a 37°C, com os seguintes reagentes químicos e enzimas:

- 2-mercaptoetanol 0,060 M, pH 4,71;
- Ácido periódico 0,020 M, pH 4,70;
- Pronase 1,0 mg/ml em tampão acetato de sódio pH 5,60;

Após a incubação os poços foram lavados cinco vezes com PBS-Tween e uma vez com PBS e os ensaios de ELISA foram conduzidos como descrito no item III.2.4. Foram feitos poços sensibilizados mas não tratados (NT⁺), e poços controles não sensibilizados mas também tratados (TN⁺). Foram ainda feitos poços controles sensibilizados e não tratados mas incubados com soro normal (NT⁻). O efeito (E) foi calculado de acordo com a equação:

$E = (A - B) + C$, onde:

$$A = NT^+ - NT^-$$

$$B = CT^+$$

$$C = TN^+$$

Caracterização das frações antigênicas após tratamentos químicos, por cromatografia e por espectrofotometria.

Protocolo de tratamento dos antígenos com 2-mercaptoetanol.

Amostras dos antígenos foram dissolvidas em 2,0 mL de água desionizada, sendo retirada uma alíquota de 1,0 mL. O 1,0 mL restante foi então seco em centrífuga a vácuo e ressuspenso em 200 μ L de mercaptoetanol 0,060 M, pH 4,71 e então incubadas em banho a 95°C por 10 min. Após esta incubação as amostras foram secas em centrífuga a vácuo a 50°C, sendo em seguida incubadas a 37°C por 30 min com 200 μ L de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,78 contendo 0,60 M de iodoacetamida. Após a reação com a iodoacetamida as amostras foram extensivamente dialisadas contra H₂O e secas em centrífuga a vácuo.

Um controle de reação foi feito e consistiu em submeter amostras dos reagentes a todo o procedimento descrito anteriormente, na ausência dos antígenos. Após dissolução em 1,0 mL de água desionizada, as amostras tratadas foram analisadas por métodos cromatográficos em HPLC e por espectrofotometria.

Cromatografia em HPLC dos antígenos tratados, utilizando coluna de exclusão molecular Ultra Hydrogel Linear.

Após o equilíbrio da coluna com tampão fosfato de sódio 0,10 M, pH 7,4, ou com H₂O desionizada, amostras de 20 µL de antígenos tratados foram aplicadas a coluna e eluídas nos respectivos sistemas de equilíbrio. Nos dois sistemas de eluição foi empregado um fluxo de 0,8 mL/min. A absorvância das frações foi monitorada a 280nm e a 212 nm, simultaneamente. Frações correspondentes a cada pico eluído, nos diferentes sistemas eluentes, foram coletadas manualmente e separadamente. As frações provenientes dos diferentes sistemas de eluição foram recromatografadas, cada qual isoladamente, empregando as mesmas condições de eluição da amostra original ou no outro sistema eluente empregado.

Cromatografia em HPLC dos antígenos tratados utilizando coluna de fase reversa RP 300 HR (coluna C8).

As amostras tratadas ou não com 2-mercaptoetanol foram submetidas a cromatografia de fase-reversa, a temperatura de 40°C. Como eluente foi utilizada uma solução de acetonitrila 70% em TFA 0,08%. A coluna era previamente equilibrada com solução de TFA 0,02%. Após o equilíbrio da coluna, amostras de 20 µL foram aplicadas e eluídas em gradiente crescente de solução de CH₃CN em TFA. Foi utilizado um fluxo de 1,5 mL/ min. Frações provenientes da cromatografia de filtração, em HPLC, das amostras tratadas com 2-mercaptoetanol, foram também submetidas a este mesmo procedimento cromatográfico e nas mesmas condições. A presença de material nas frações foi avaliada pelo monitoramento da absorção do eluato em 280nm e 212nm, simultaneamente.

Caracterização dos antígenos tratados por espectrofotometria.

O espectrofotômetro foi zerado utilizando o controle de reação e a linha de base foi obtida utilizando o próprio controle de reação, após ter sido dialisado. Em seguida os espectros das amostras de antígenos tratadas com 2-mercaptoetanol e iodoacetamida foram obtidos tendo como branco o controle de reação. O espectro das amostras de antígeno não tratadas foram obtidos utilizando como branco a água desionizada. Neste caso a água desionizada foi utilizada para zerar o aparelho, bem como para obtenção da linha de base.

Análise de aminoácidos nos antígenos por cromatografia de fase reversa em HPLC (Método Pico.Tag).

Protocolo de hidrólise ácida.

Amostras de antígenos contendo 100 µg em peso e amostras de padrões de aminoácidos (Pierce) contendo cerca de 1,0 µmol de cada resíduo foram acondicionadas em tubos de vidro limpos por pirólise e suspensas em 100 µL de água desionizada. Um branco de hidrólise foi também preparado pela adição de água desionizada em dois tubos. Os tubos foram então secos em centrífuga a vácuo e em seguida acondicionados em uma frasco de vácuo contendo 250 µL de HCl 6,0 N e um cristal de fenol. O frasco de vácuo foi então fechado a vácuo e com atmosfera de N₂, incubada em estufa a 100°C e mantida nesta temperatura em intervalos de 2, 6, 12 e 16 horas. Após hidrólise as amostras foram secas em centrífuga a vácuo durante 15 minutos a 50°C.

Amostras de cisteína foram previamente convertidas a ácido cistéico numa mistura de ácido fórmico 97% contendo peróxido de hidrogênio na proporção de 19:1. Amostras de 250 picomoles deste resíduo foram incubadas em 100 μL desta mistura por 30 minutos a 22°C e em seguida secas em centrífuga a vácuo. Após sua conversão a ácido cistéico as amostras foram submetidas ao procedimento de hidrólise ácida descrito anteriormente. Amostras de insulina humana foram utilizadas como controle do protocolo de oxidação de cisteína. Controles de insulina e cisteína não oxidados também foram analisados.

Protocolo de hidrólise alcalina.

Amostras de antígenos contendo 100 μg de carboidrato e amostras de padrões de aminoácidos (Pierce) foram acondicionadas em ampolas de 3,0 mL e suspensas em 100 μL de NaOH 4,0 N. Um branco de hidrólise foi também preparado pela adição 100 μL de NaOH 4,0 N em duas ampolas. As ampolas foram então fechadas a vácuo e em atmosfera de N_2 e acondicionadas em frasco de vácuo, também fechada a vácuo e com atmosfera de N_2 . O frasco de vácuo foi então incubado a 100°C em intervalos de 2, 6, 12 e 16 horas. Após hidrólise as ampolas foram abertas e o pH das amostras foi neutralizado pela adição de 100 μL de CH_3COOH . Em seguida as amostras foram secas em centrífuga a vácuo a 50°C durante 75 minutos.

Amostras de cisteína e de insulina humana foram previamente oxidadas a ácido cistéico, como descrito anteriormente, antes de serem submetidas a hidrólise alcalina. Amostras de insulina humana e de cisteína não oxidadas foram também submetidas ao protocolo de hidrólise alcalina.

Procedimento de derivatização dos aminoácidos utilizando o método do fenilisotiocianato (COHEN *et al.* (1988).

Amostras e padrões hidrolisados foram inicialmente submetidas a um procedimento de ressecagem em uma mistura de metanol/ ácido acético/ trietilamina (TEA) na proporção de 2,0: 2,0: 1,0. As amostras foram ressuspensas em 20 μ L desta mistura e secas em centrífuga a vácuo durante 15 minutos. Após secagem as amostras e padrões hidrolisados e amostras e controles não submetidos ao procedimento de hidrólise foram ressuspensos em 100 μ L de solução de derivatização, composta por etanol/ H₂O/ TEA/ PITC na proporção de 7,0: 2,0: 1,0: 1,0 e incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente. Após incubação o excesso de reagente foi retirado em centrífuga a vácuo, a temperatura ambiente, durante cerca de 1 hora.

Análise cromatográfica dos hidrolisados por cromatografia de fase reversa em HPLC utilizando coluna Pico.Tag (Waters, Millipore).

Após derivatização, as amostras secas foram ressuspensas em tampão acetato de sódio 0,140 M, pH 5,80 contendo 5,0% de acetonitrila (CH₃CN). Amostras de 20 μ L de padrões e de insulina, contendo cerca de 200 picomoles de cada resíduo foram aplicadas em cada corrida. Para as amostras desconhecidas foram aplicados volumes contendo cerca de 10 μ g de amostra, em massa.

A análise dos aminoácidos foi feita por cromatografia de fase reversa em HPLC, utilizando o método PICO.TAG, como proposto por KOOP *et al.* (1982), com algumas modificações. Como eluente foi usado o sistema acetonitrila / água (CH₃CN 60%, solução B) e tampão acetato de sódio 0,14M, pH 5,8 contendo 0,05% de TEA (solução A). As

cromatografias foram conduzidas utilizando um fluxo de 1,0 mL / min e a 40°C, tendo a duração de 12 min. A coluna era previamente equilibrada por 10 min com 6,0% de CH₃CN (10% de solução B) antes da aplicação de cada amostra. Após a completa eluição das amostras (11,5 min), a concentração da solução B era elevada para 100% e mantida assim por 7,0 min para completa lavagem da coluna, sendo então retomado o período de 10 min de equilíbrio da coluna.

Caracterização das frações antigênicas por espectroscopia no infra vermelho.

Amostras de 1,0 mg do antígeno foram misturadas a 1,0 mg KBr até se obter um pasta homogênea. A pasta foi então seca e comprimida sob pressão de 240 Kg/cm² para se obter o disco de sal de KBr da amostra. Os espectros foram obtidos em espectrômetro FTIR utilizando detetor DGTS KBr. Como controle foi obtido o espectro do peptídeo C numa frequência de 32 varreduras min⁻¹ em resolução de 4,0 cm⁻¹. A amostra do antígeno PI foi obtida utilizando uma frequência de 46 varreduras min⁻¹ numa resolução de 4,0 cm⁻¹, sendo realizados 2000 varreduras.

Caracterização das frações antigênicas por cromatografias em camada delgada (TLC).

Procedimentos de cromatografia em camada delgada.

As cromatografias em camada delgada foram desenvolvidas utilizando como fase estacionária placas de sílica. Os ensaios foram conduzidas em capela de exaustão, sendo que em todas cromatografias foram aplicados 20 μ g de amostras teste num volume de 2,0 μ L e 2,0 μ g de padrões de mono e / ou dissacarídeos num volume de 2,0 μ L por placa. Após a aplicação das amostras as placas foram colocadas na cuba de TLC contendo 20 mL da fase móvel. A fase móvel era colocada na cuba 30 min antes da colocação da placa para formar uma atmosfera da fase móvel na cuba antes de iniciar-se as cromatografias. Como fase móvel foi utilizado o sistema piridina/ butanol/ água na proporção de 3: 1: 3, sendo as corridas neste sistema realizadas em 60 min. Cromatografias foram também desenvolvidas utilizando como fase móvel o sistema acetonitrila/ água (CH₃CN 85%), neste caso utilizando placas previamente tratadas com Na₂S₂O₅ 0,10 M e tampão citrato de sódio 9,0 mM, pH 4,80. O tratamento consistiu em imergir as placas brevemente na solução de metabissulfito seguida de secagem a 37°C. O processo foi então repetido com o tampão citrato seguido da secagem das placas nas mesmas condições antes da aplicação das amostras. No sistema acetonitrila/ água, três corridas com mesma placa eram realizadas em seqüência, sendo a placa seca a temperatura ambiente e em capela de exaustão no intervalo entre cada corrida. Após a última corrida as placas eram secas em capela de exaustão e a temperatura ambiente.

Procedimento de revelação das placas de TLC.

A detecção dos carboidratos nas placas de cromatografia foi feita utilizando o sistema difenilamina/ anilina. A solução reveladora consistiu de uma mistura de 0,40 g de anilina dissolvidos em 8,0 mL de acetona, acrescida de 100 mL de anilina 4,0% v/v em acetona. O volume final da solução era então completado para 128 mL com 20 mL de ácido fosfórico 85%. As placas foram borrifadas com a solução reveladora e em seguida secas a temperatura ambiente na câmara de exaustão. Após a secagem as placas foram incubadas a 100°C em estufa até o aparecimento dos sinais de carboidratos. O tempo de incubação a 100°C variou de 2,0 – 5,0 min.

III.2.6. Análise estatística dos dados.

Comparações entre dados foram analisadas para sua significância pelo Teste de Student (teste *t*) bicaudal, pareado, utilizando o programa comercial SIGMA PLOT da Jandel Coop. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.01$.

IV. RESULTADOS.

Numa primeira abordagem partimos para o isolamento de antígenos de amostras de vacina pentavalente por métodos de diálise. Com a intenção de evitar problemas com altas concentrações de sal nos possíveis antígenos isolados nesta abordagem, utilizamos três sistemas de solvente distintos nos procedimentos. Surpreendentemente apenas nos dialisados da vacina contra água obtivemos antígenos reativos com soro de pacientes com leishmaniose visceral. Nos outros dois sistemas solventes utilizados (acetato de amônio e carbonato de amônio) os materiais obtidos não foram reativos (Figura 1).

Outra característica observada nesta abordagem é que, com a diálise ao longo do tempo, a concentração dos antígenos presentes no dialisado contra H₂O atingem uma concentração de equilíbrio nas primeiras 24 horas de diálise, ocorrendo uma queda nesta concentração por volta de 120 horas de diálise. Observa-se que após 24 horas de diálise ocorre precipitação parcial no dialisado. Apesar da vacina ser constituída de cepas de *Leishmania* causadoras da forma tegumentar da doença, a reatividade dos antígenos presentes no dialisado é observada somente contra soros de pacientes com a forma visceral da leishmaniose (Figuras 1 B e 2 A), não havendo nenhuma reatividade com soros de pacientes com a forma tegumentar da leishmaniose (Figura 2 B). Antígenos com esta propriedade não são observados no dialisado dos outros dois sistemas de solvente testados (Figura 1 B, símbolos verde e vermelho). Entretanto na fração não dialisável destes mesmos sistemas são observados antígenos com esta propriedade (Figura 1 A, símbolos verde e vermelho).

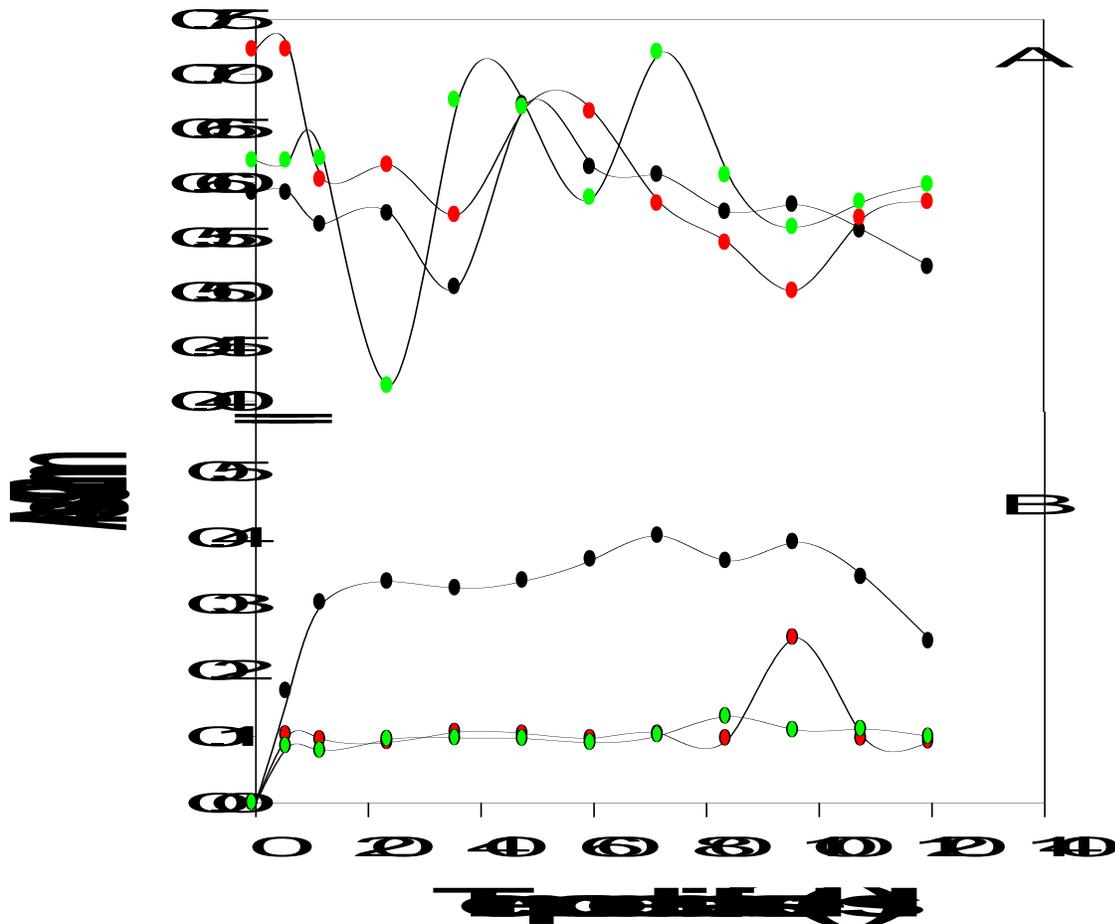




Figura 2. **Reatividade dos antígenos obtidos por diálise da vacina pentavalente contra água, observada em ensaios de “Western blotting”.** Reatividade dos dialisados contra um grupo de 5 soros de pacientes infectados com leishmaniose visceral (A). Reatividade dos dialisados contra uma reunião de 5 soros de pacientes infectados com Leishmaniose Tegumentar Americana (B). Os soros foram utilizados na diluição de 1: 100. Como conjugado foi utilizada anti-IgG humana conjugada a peroxidase na diluição de 1 : 2000. Em cada canaleta do gel foram aplicados 100 μ L de dialisado que foram submetidos a SDS-PAGE (10%) antes da eletrotransferência.

Como observado na figura 2, as moléculas presentes no dialisado da vacina contra H₂O, reativas com soros de pacientes humanos com leishmaniose visceral, apresentam peso molecular muito superior ao corte da membrana utilizada no procedimento de diálise (12-14 KDa). Estes antígenos começam a surgir por volta de 24 horas de diálise e praticamente não penetram na malha do gel (Figuras 2 e 3 A). Em tentativas de se obter grandes quantidades destes antígenos procedendo com a diálise não em câmaras de diálise mas em sacos de diálise com maior volume de vacina, a precipitação do dialisado se torna mais evidente, e o rendimento obtido foi baixo.

Observa-se que já nas primeiras 6 horas de diálise são detectados no dialisado moléculas de peso molecular (24 KDa) muito acima do corte imposto pela membrana de diálise, entretanto estas moléculas não reagem com os soros testados, apesar de se apresentarem em concentração maior, visíveis à prata, em comparação com aquelas de peso molecular alto e que são reativas (Figuras 2 A e 3 A). Estas moléculas de alto peso molecular não são provenientes de contaminação ou de vazamentos através da membrana, uma vez que amostras de tripsina suína, cujo peso molecular é de 24 KDa não atravessam de maneira significativa a membrana (Figura 3 B). Estas observações indicam que estes antígenos de alto peso molecular são, provavelmente, produtos de associação de moléculas menores que cruzam a membrana ao longo do processo de diálise.

Este achado está de acordo com os resultados da figura 1, onde se observa que o material não dialisável da vacina contém a maior parte dos antígenos que reagem com o soro de pacientes com leishmaniose e, sua reatividade praticamente não se altera ao longo de 120 horas de diálise. Isso sugere que os antígenos presentes no dialisado já se encontram na fração solúvel da vacina original, podendo ser formados durante a diálise contra H₂O por fenômenos de agregação molecular no compartimento do dialisado.

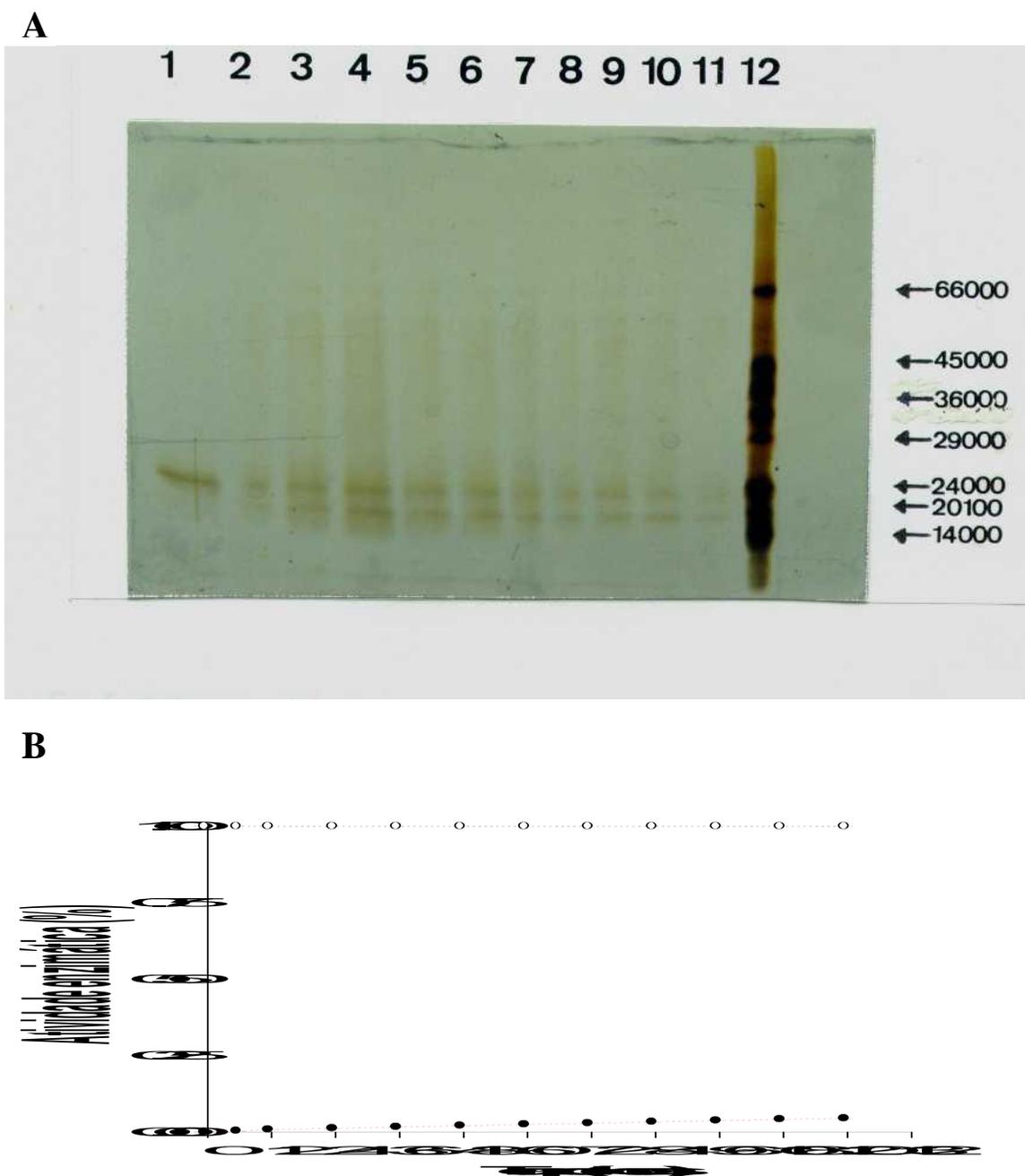


Figura 3. SDS-PAGE dos antígenos obtidos por diálise da vacina polivalente durante 108 horas e atividade enzimática apresentada pelo dialisado de tripsina suína. Em (A): SDS-PAGE (10%) corado pela prata. Foram aplicados 100 μ L de cada dialisado por canaleta. Em (B): Atividade enzimática da tripsina suína presente nos dialisados (círculos cheios). Atividade enzimática da tripsina suína no compartimento da fração não dialisada (círculos vazios).

Apesar de antígenos terem sido obtidos por diálise da vacina pentavalente contra água, este sistema não se mostrou apropriado um vez que, após longos períodos de diálise, parte do dialisado sofre um processo de precipitação. Apesar da precipitação observa-se que, após redução química com 2-mercaptoetanol, tanto o precipitado formado durante a diálise (PrDM) quanto a porção solúvel do dialisado (SbDM) apresentam bandas semelhantes em SDS-PAGE, sugerindo que as duas frações, precipitada e sobrenadante, possuem identidade química semelhante (Figura 4). Pode-se observar ainda que, apesar desta vacina ter sido estocada por cerca de 10 anos, moléculas com peso molecular muito acima de 60 KDa ainda estão presentes (Figura 4, VPes). Na fração correspondente ao sobrenadante do dialisado são vistas bandas que praticamente não penetram na malha do gel, independente ou não do tratamento com o 2-mercaptoetanol (Figura 4, SbDS e SbDM).

Antígenos com a propriedade de reconhecer especificamente soros de cães e de pacientes humanos com leishmaniose visceral foram obtidos no dialisado de vacinas constituídas por 4 das cinco cepas presentes na vacina pentavalente (Figura 5). Em todos os casos, observou-se as mesmas propriedades vistas para os antígenos provenientes de vacina pentavalente, principalmente o fenômeno de precipitação após tempo extenso de diálise.

Os resultados até aqui apresentados indicam que os antígenos presentes nas amostras de dialisados, das diferentes formulações da vacina, já se encontram nas vacinas originalmente. Os eventos de precipitação limitam o isolamento destes antígenos por diálise, além de não termos obtido antígenos de peso molecular baixo, o que era a princípio esperado. Resolvemos então isolar estes antígenos diretamente da fração solúvel das vacinas por métodos cromatográficos e concentrar o estudo nas amostras das vacinas pentavalente ou monovalente constituída pela cepa PH8, de longos períodos de armazenamento.

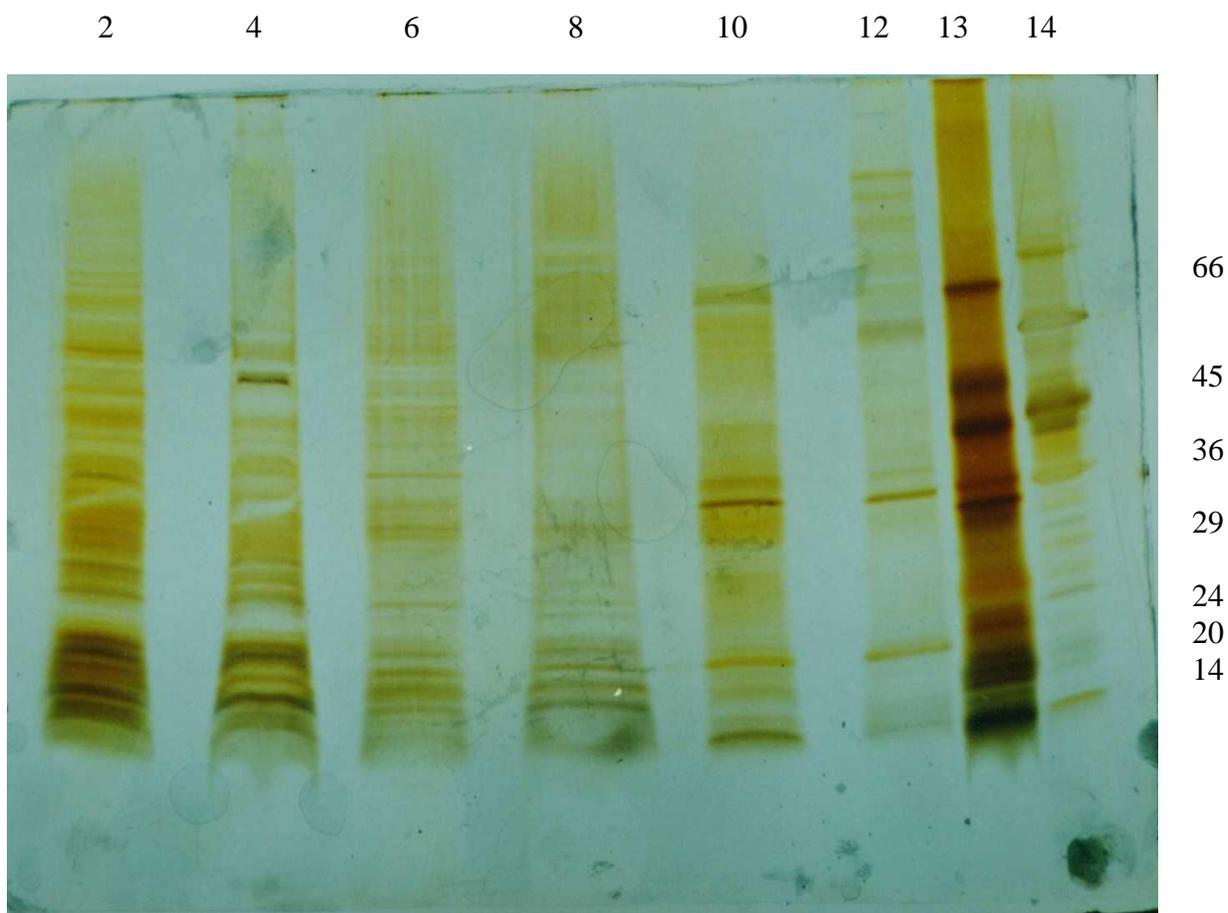


Figura 4. **SDS-PAGE em condições redutoras (com 2-mercaptoetanol) das frações precipitada e solúvel dos antígenos da vacina pentavalente (lote 9031004-1V, 1991), obtidos por diálise extensiva contra H₂O.** Gel de 10% corado pela prata. Foram aplicados 10 µg em proteínas de cada amostra de fração solúvel da vacina total e da fração solúvel dos antígenos por canaleta. Da fração precipitada do antígeno foram aplicados 10 µL por canaleta. Antígeno precipitado com redutor (**PrDM**). Antígeno precipitado sem redutor, (**PrDS**). Antígeno solúvel com redutor (**SbDM**). Antígeno solúvel sem redutor (**SbDS**). Fração solúvel total da vacina com redutor (**VPeM**). Fração solúvel total da vacina sem redutor (**VPeS**). Marcadores de peso molecular (**Pd**).

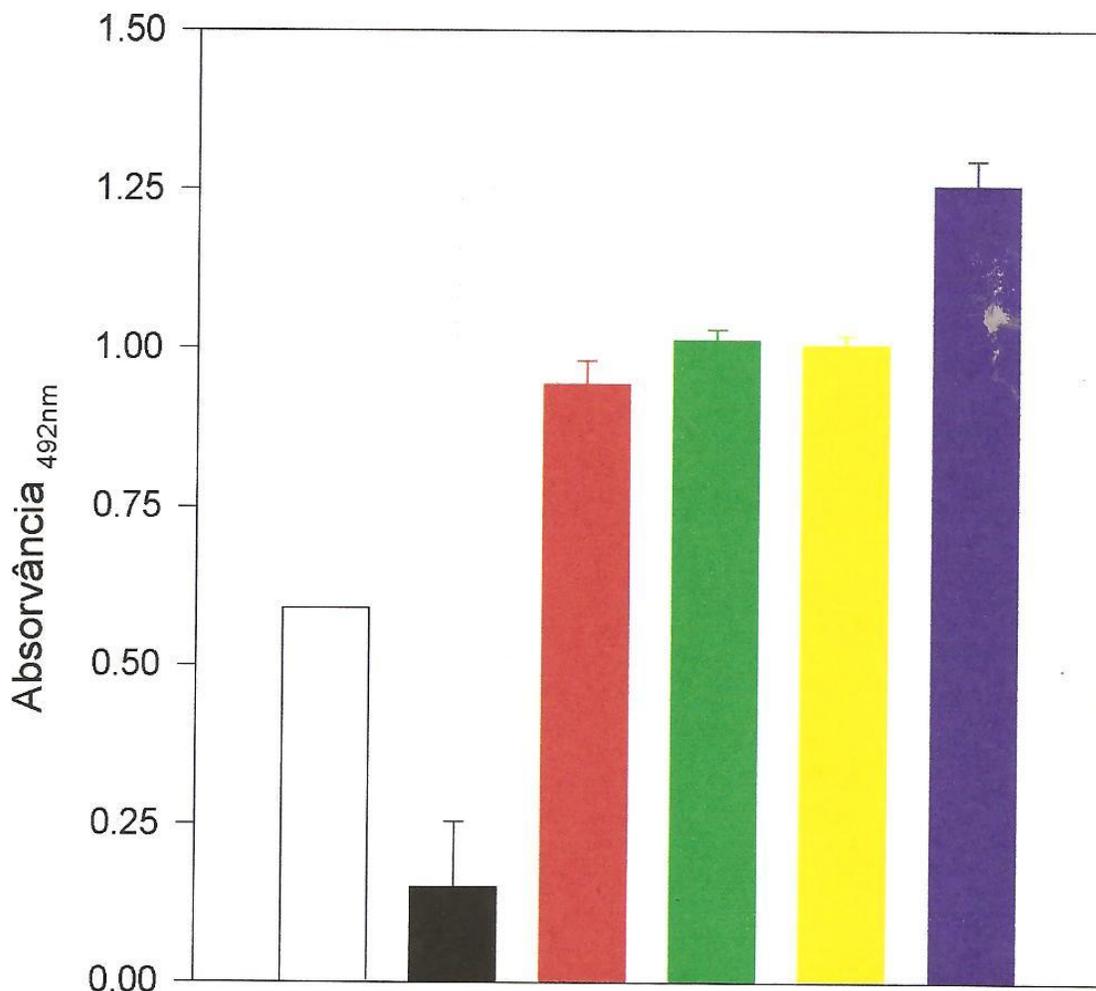


Figura 5. **Reatividade dos antígenos, da vacina pentavalente e monovalentes obtidos por diálise, medida em ensaios de Elisa.** Antígenos de vacina pentavalente (**barra vazia**), antígenos isolados de vacina da cepa BH06 (**barra preta**), antígenos isolados de vacina da cepa M1176 (**barra vermelha**), antígenos isolados da cepa BH121 (**barra amarela**), antígenos isolados de vacina da cepa BH49 (**barra verde**), antígenos isolados de vacina da cepa PH8 (**barra azul**). Foi utilizado para reação um grupo de 5 soros de cães com leishmaniose visceral na diluição de 1 : 640. Como conjugado foi usada anti-IgG de cão conjugada a peroxidase na diluição de 1 : 10000.

Por métodos cromatográficos também obtivemos moléculas de alto peso molecular da fração solúvel das vacinas. Moléculas foram obtidas tanto de amostra de vacina fresca, quanto de amostras de vacinas com mais de 7 anos de armazenamento. As vacinas armazenadas apresentam alto grau de degradação protéica, o que pode ser inferido da baixa absorção a 280nm das frações que eluem no volume de exclusão da coluna, quando se compara a vacina fresca (FM8) com as demais (Figura 6, setas). Isto concorda com o fato de não detectarmos proteínas nas frações que eluem nestes volumes, no caso das vacinas armazenadas, após concentrarmos estas frações até 1000X.

Após reunir as frações e submetê-las a ensaio de ELISA, verifica-se que apenas as frações que eluem no volume de exclusão da coluna, denominadas P1, e as outras três frações que eluem imediatamente após este volume, denominadas P2, são reconhecidas pelo soro de cães com leishmaniose visceral. Observa-se ainda estes antígenos nas mesmas frações provenientes de vacina monovalente fresca (Figura 7, símbolos verdes, P1 e P2). Nenhuma reatividade é observada para as frações que eluem em volumes correspondentes a moléculas de peso médio ou baixo (< 100 KDa) (Figura 7, P4 – P12). A sobreposição das linhas de absorção a 280nm com a medida da reatividade das frações confirma que as frações reativas não apresentam conteúdo protéico, tomando a absorção a 280nm como indicativo da presença de proteína. Apesar das frações correspondentes a P1, isoladas de vacina fresca (FM8) apresentarem maior absorção a 280nm (Figura 7, linha verde), sua reatividade é menor (Figura 7, símbolo verde), em comparação as frações isoladas das vacinas armazenadas, FSE e FS8 (Figura 7, símbolos preto e vermelho). As frações 4, 5, 6 da cromatografia de exclusão molecular (Figura 6) foram reunidas e denominadas **P1** se isoladas de vacina armazenada pentavalente, **P8** se isoladas de vacina armazenada monovalente cepa PH8 e **P9** se isoladas de vacina armazenada cepa BH49 de *Leishmania*.

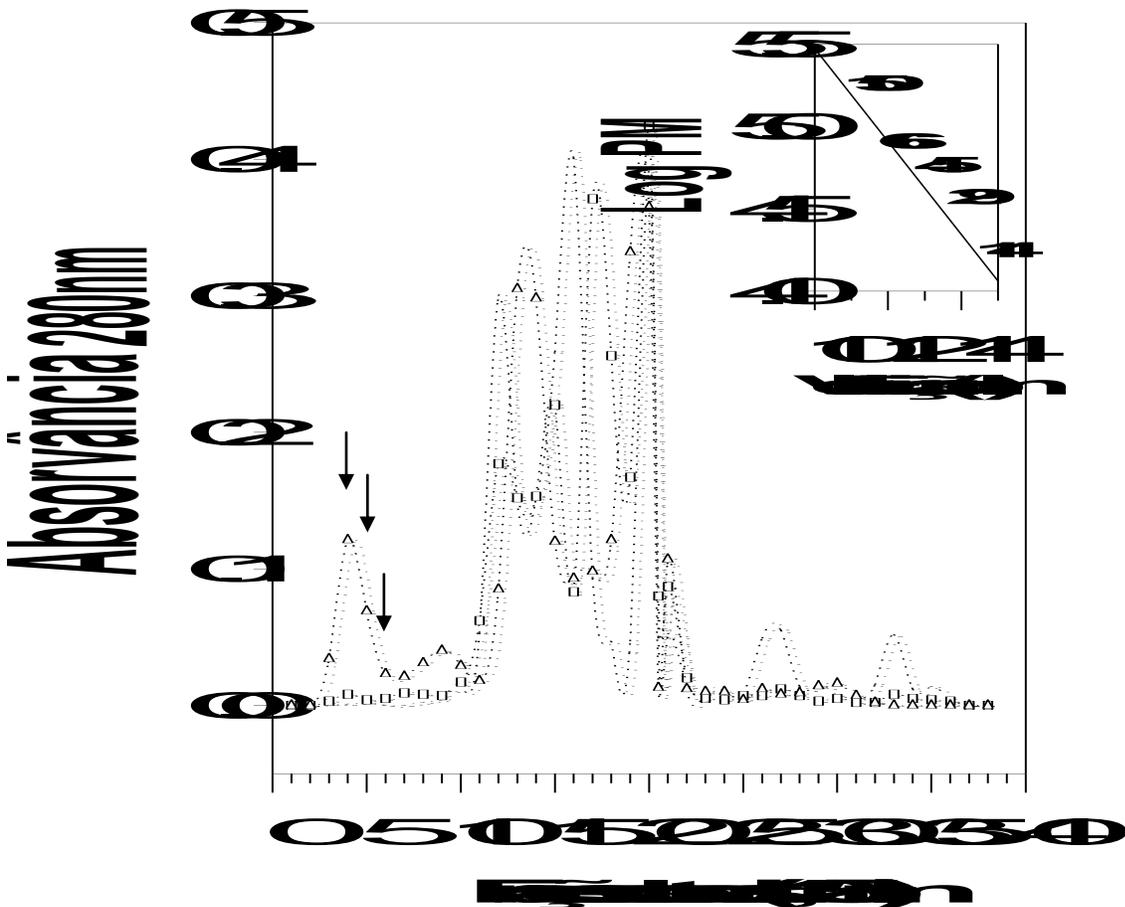


Figura 6. Cromatografias de exclusão molecular da fração solúvel das vacinas em FPLC utilizando coluna Superose 12. Vacina pentavalente lote de 1991, FSE (círculos), vacina monovalente PH8 lote de 1994, FS8 (quadrados), vacina monovalente fresca lote 1999, FM8 (triângulos). Em todos os casos foram aplicados 3,2 mg de proteína. As amostras foram eluídas com tampão fosfato de sódio 0,10 M, pH 7,4 em fluxo de 0,25 mL / min, na coluna previamente equilibrada com o mesmo tampão de eluição. Inserção: curva de calibração da coluna. Os números correspondem aos padrões utilizados para a calibração, em KDa. As setas indicam as frações correspondentes ao volume de exclusão da coluna.

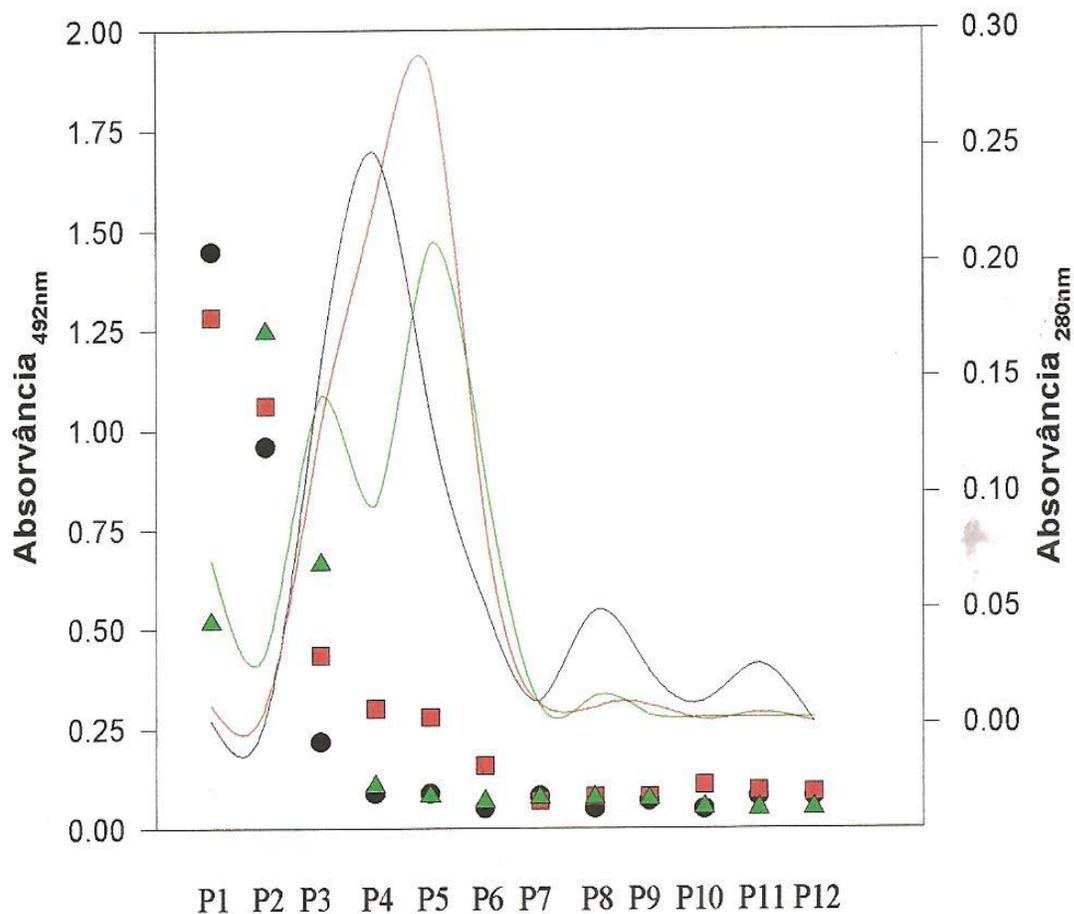


Figura 7. **Reatividade das frações obtidas por cromatografia das vacinas em coluna Superose 12 frente a soros de cães com leishmaniose visceral medidas por Elisa.** Fração solúvel da vacina pentavalente, FSe (**cor preta**). Vacina monovalente armazenada da cepa PH8, FS8 (**cor vermelha**). Vacina monovalente recém preparada cepa PH8, FM8 (**cor verde**). Cada símbolo corresponde à reunião de diferentes frações cromatográficas coletadas. P1 corresponde às frações 4, 5, e 6 que eluem no volume de exclusão da coluna. P2 corresponde à reunião das 3 frações que eluem imediatamente após o volume de exclusão da coluna (frações 7, 8 e 9). **As linhas** correspondem ao perfil de absorção em 280nm de cada cromatografia. Para o Elisa cada poço foi sensibilizado com 20 μ L de amostra de cada reunião de frações cromatográficas. Foi utilizado um grupo de soros de 4 cães infectados na diluição de 1 : 640. Como conjugado foi utilizada anti-IgG de cão conjugada a peroxidase na diluição de 1 : 10000. Cada símbolo corresponde a média de 2 determinações individuais.

Assim como observado em ELISA, também em ensaio de eletrotransferência os antígenos PI e P8 mostraram-se reativos contra soros de pacientes humanos e de cães com a forma visceral da leishmaniose. Não se observa nenhuma reatividade deste antígenos contra soros de pacientes infectados com a forma tegumentar da doença e nem com soros normais de humanos e de cães (Figura 8). Observa-se que as mesmas bandas que reagem com o antígeno PI também reagem com o antígeno P8, indicando uma possível identidade química entre eles. Apesar da reatividade observada para estes antígenos, é interessante notar que esta reatividade ocorre com moléculas de pesos moleculares variando numa faixa de 90 KDa a mais de 200 KDa, em contraste com a faixa de peso molecular esperada para estas bandas reativas, em torno de 300 KDa ou mais, de acordo com seu volume de eluição na cromatografia (Figura 6).

A reatividade dos antígenos PI e P8 apresenta muita semelhança com aquelas observadas para antígenos que obtivemos por métodos de diálise. PI e P8 só são reconhecidos por soros humanos e de cães com a forma visceral da leishmaniose e apresentam peso molecular alto. Outra característica comum aos antígenos obtidos nas diferentes abordagens é o fato deles parecerem ser formados por associações de moléculas menores. No caso dos antígenos PI e P8 as bandas reativas de peso inferior à faixa de separação da coluna com a qual foram isolados, só poderiam ter surgido a partir de um fenômeno físico-químico durante o processo de eletroforese ou de eletrotransferência. Apenas bandas reativas com pesos igual ou acima de 300KDa seriam esperadas considerando o limite de exclusão da coluna e o volume de eluição de PI e P8. Para verificar quais eventos são responsáveis pela dissociação da estrutura molecular dos antígenos PI e P8, resolvemos testar o efeito de alguns dos reagentes utilizados na eletroforese e na eletrotransferência sobre a estrutura molecular dos antígenos.

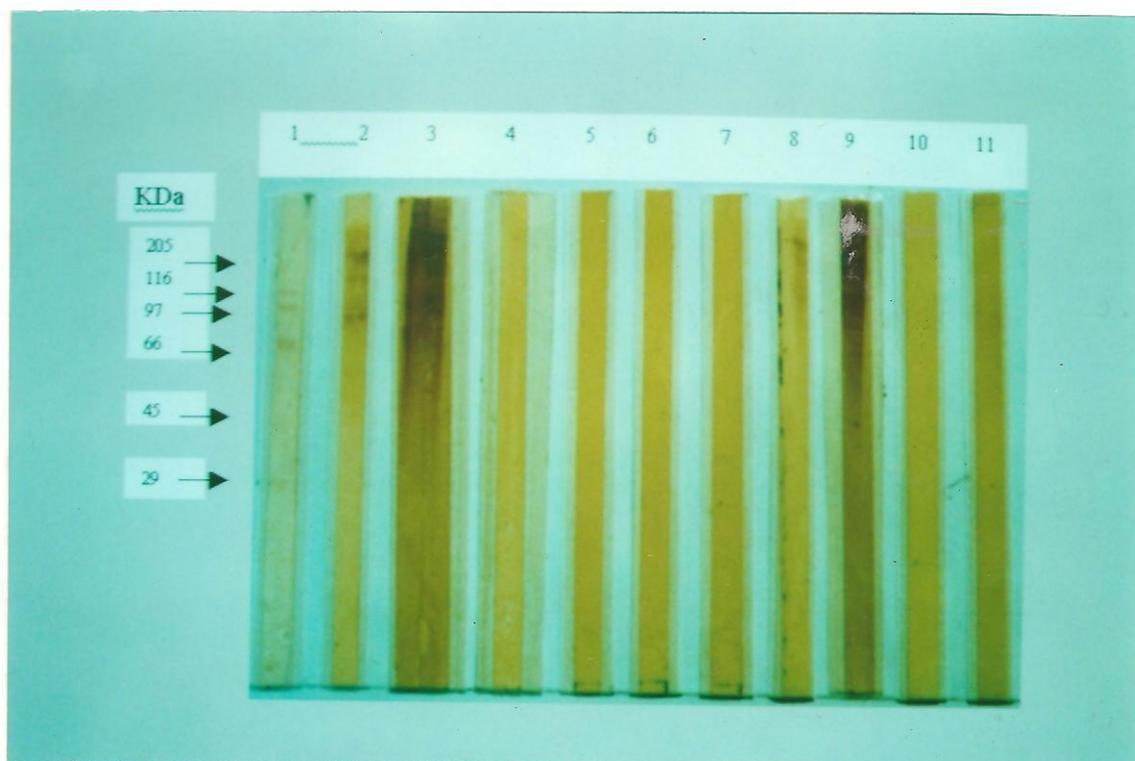


Figura 8. **Reatividade dos antígenos eluídos no volume de exclusão da coluna Superose12 (PI, antígeno pentavalente e P8, antígeno da vacina monovalente PH8 estocada) em “western blotting”.** Padrão de peso molecular corado por “Ponceau”, (**Canaleta 1**). Reatividade dos antígenos PI e P8 com soro de pacientes com leishmaniose visceral (**canaletas 2 e 3**). Reatividade dos antígenos PI e P8 com soro de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (**canaletas 4 e 5**). Reatividade de PI e P8 com soros de indivíduos normais (**canaletas 6 e 7**). Reatividade de PI e P8 com soros de cães com leishmaniose visceral (**canaletas 8 e 9**). Reatividade de PI e P8 com soros de cães normais (**canaletas 10 e 11**). Em todos os casos foi utilizado um grupo de 4 soros em cada teste. Os soros humanos e de cães foram utilizados na diluição de 1 : 100. Os conjugados utilizados foram anti-IgG humana e de cão conjugadas a peroxidase na diluição de 1 : 5000.

Observa-se a formação de várias bandas em PAGE na presença tanto de 2-mercaptoetanol quanto na presença de SDS (Figura 9). Este resultado indica que o efeito de dissociação dos antígenos PI e P8 é causado pelo SDS, que estava presente nas soluções dos ensaios eletroforéticos e de eletrotransferência desenvolvidos para se identificar as bandas reativas com os soros (Figura 8). As bandas de peso molecular inferiores a 300 KDa, reativas com os soros testados, são resultantes de uma ação desagregadora do SDS sobre os antígenos originais (Figura 9). No ensaio de eletrotransferência (Figura 8) o 2-mercaptoetanol não foi utilizado, entretanto observa-se que este reagente também age sobre a estrutura molecular dos antígenos PI e P8, produzindo uma série de bandas, porém o padrão destas bandas é distinto daquele produzido pelo SDS (Figura 9). Isto indica que os dois reagentes atuam sobre a estrutura química dos antígenos provavelmente por mecanismos distintos.

Confirmando nossa suspeita, tanto a eletroforese quanto a eletrotransferência na ausência de SDS dão origem a uma única banda para o antígeno PI, que praticamente não penetra na malha do gel (Figura 10 A). Isto indica que o antígeno PI tem peso molecular muito alto, o que é compatível com sua origem cromatográfica (Figura 6). Observa-se ainda que, assim como se verificou para o antígeno isolado por diálise (Figura 2), apenas esta banda é reconhecida pelo soro de cão e de pacientes humanos infectados com a forma visceral da leishmaniose (Figura 10 B). Estes dados corroboram a hipótese de que os antígenos obtidos nas duas formas de fracionamento correspondem a mesma molécula e que ambos são formados por fenômenos de agregação molecular de pequenas moléculas.

Apesar das evidências de que PI e P8 não seriam agregados protéicos, os efeitos do 2-mercaptoetanol sobre os antígenos sugeriram que se confirmasse, por teste direto, a ausência de cisteína e de outros aminoácidos na sua composição.

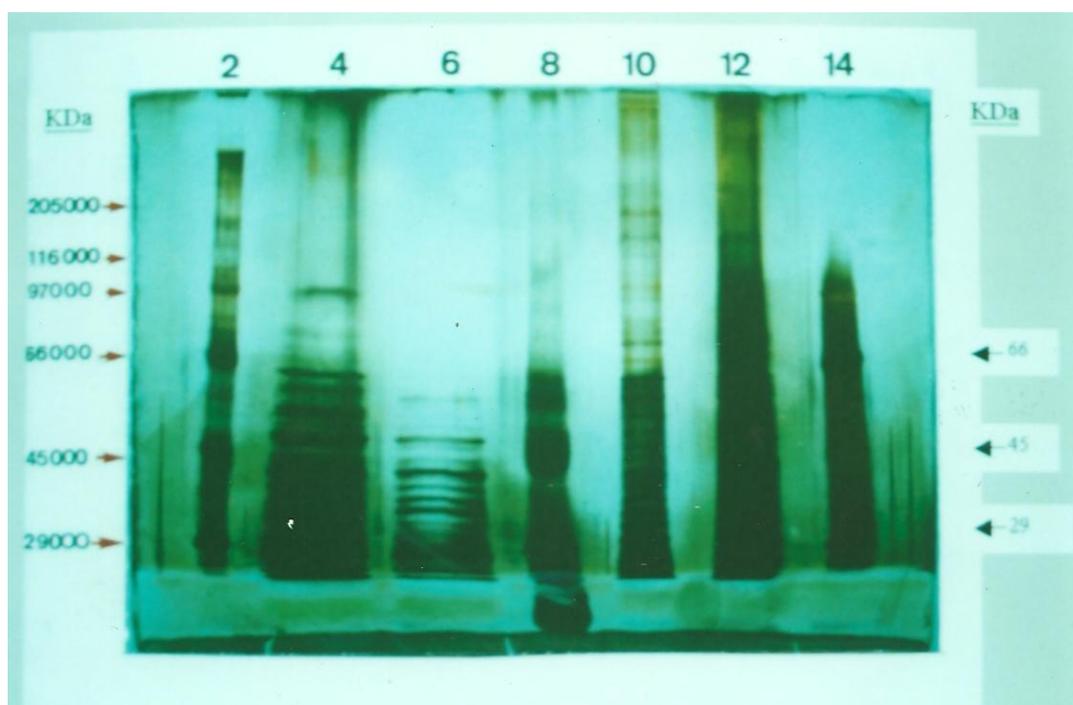


Figura 9. **SDS-PAGE dos antígenos PI e P8 em condições redutoras.** Padrão de peso molecular (**Canaleta 2**), antígeno P8 com e sem 2-mercaptoetanol (**canaletas 4 e 6**), padrão de baixo peso molecular pré corado com azul de “Coomassie” (**canaleta 8**), antígeno PI com e sem 2-mercaptoetanol (**canaletas 10 e 12**), padrão de peso molecular (**canaleta 14**). Foi aplicado o equivalente a 1,0 mL de cada antígeno por canaleta. Gel de 10% de acrilamida.

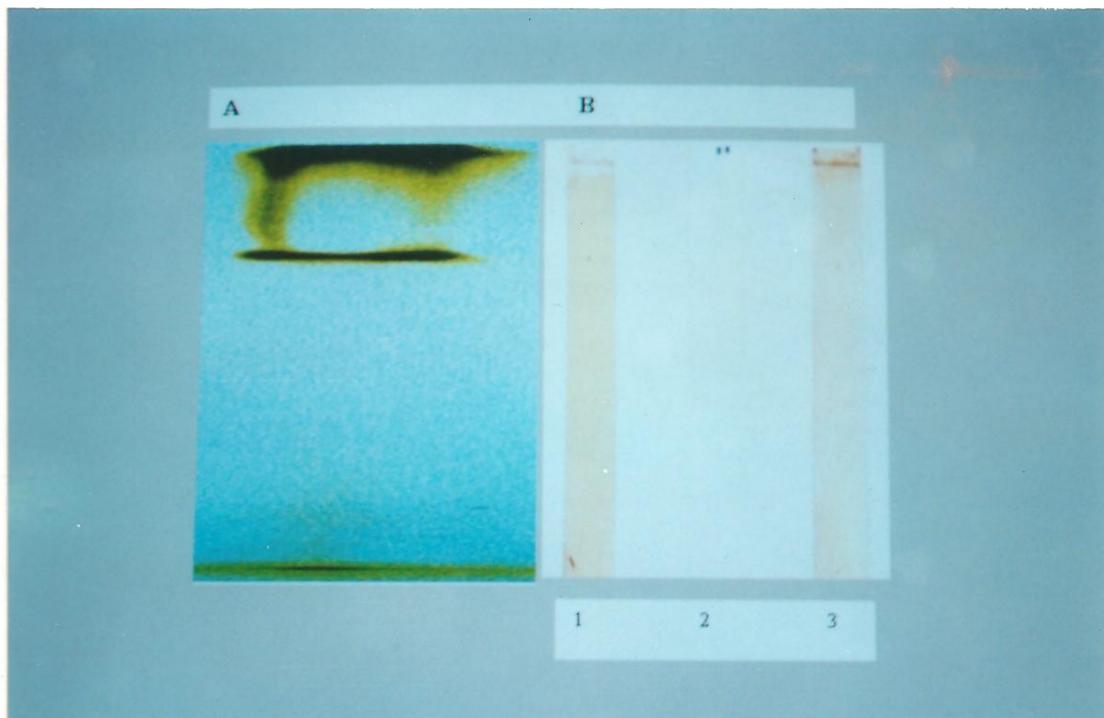


Figura 10. **Eletroforese e “western blotting” do antígeno PI em condições nativas.** Em (A): gel nativo de amostra de antígeno PI. Foram aplicados 12 μg de açúcar total em gel de canaleta única. O gel foi corado pela prata. Em (B): fita 1= reatividade do antígeno PI com soro de cão com leishmaniose visceral, fita 2 = reatividade do antígeno PI com soro normal humano, fita 3 = reatividade do antígeno PI com soro de humano com leishmaniose visceral. Todos os soros foram usados na diluição de 1 : 500. Para revelação as fitas foram incubadas com anti-IgG humana ou de cão conjugadas a peroxidase nas diluições de 1: 2000 e 1 : 4000 respectivamente. Em cada teste foi utilizado um grupo de cinco soros humanos ou de cães.

Nenhum sinal relativo a presença de proteína nos antígenos PI e P8 foi observado (Figuras 12 e 13). Também não foram detectados no antígeno PI resíduos de cisteína (Figura 11), apesar do 2-mercaptoetanol ser capaz de dissociar a estrutura dos antígenos em uma série de fragmentos de pesos moleculares variáveis. Tanto o mercaptoetanol quanto o SDS são agentes capazes de alterar estruturas protéicas, entretanto os antígenos PI e P8 não são proteínas apesar de corarem pela prata (Figuras 14A e 14B). Por se tratar de estruturas químicas de alto peso molecular e que são formadas por fenômenos de associação molecular, resolveu-se verificar se os antígenos PI e P8 pudessem ser ácidos nucleicos. Determinamos que estes antígenos não são ácidos nucleicos (Figura 14D, canaletas 2 e 3). Restaram então as hipóteses dos antígenos serem lipídeos ou polissacarídeos. Até aqui não podemos descartar a hipótese da presença de lipídeos ou de ácidos graxos na composição destes antígenos agregados, entretanto a hipótese da presença de carboidratos na sua composição foi confirmada (Figura 14C, canaletas 1 e 3). Estes carboidratos se mostram sensíveis a ação do SDS (Figura 14C, canaleta 1)

O SDS é um agente que tem tanto efeitos de carga quanto hidrofóbicos sobre as estruturas químicas com as quais interage, e nós supomos que é por um efeito de carga que o SDS dissocia os agregados PI e P8 em moléculas menores. O mercaptoetanol por sua vez é um agente que atua diretamente sobre ligações químicas, de forma que suspeitamos que sua ação provavelmente leve a uma perda da capacidade dos antígenos em serem reconhecidos pelos soros. Uma vez que demonstramos que PI e P8 apresentam carboidratos em sua composição, passamos a investigar qual a importância deste componente para a atividade destes antígenos. Como PI e P8 são antígenos de peso molecular acima de 300 KDa, passamos então a caracterizá-los utilizando coluna com faixa de separação acima deste valor.

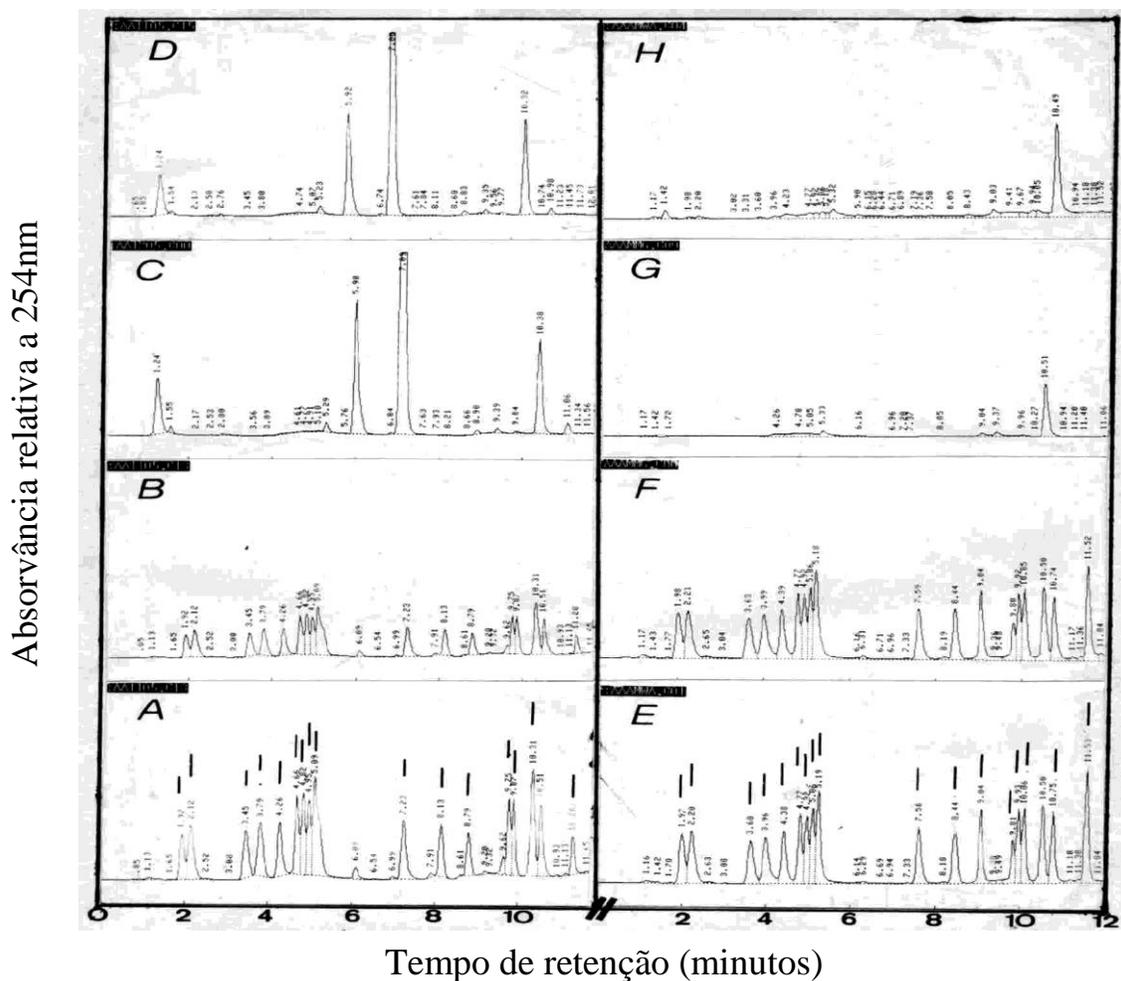


Figura 11. Cromatografias de fase-reversa dos hidrolisados antígeno PI. Padrão de aminoácidos não hidrolisado (A). Padrão de aminoácidos submetidos a hidrólise alcalina (B). Branco de hidrólise alcalina (C), Antígeno PI submetido a hidrólise alcalina (D). Padrão de aminoácidos não hidrolisado (E). Padrão de aminoácidos submetido a hidrólise ácida (F). Branco de hidrólise ácida (G). Antígeno PI submetido a hidrólise ácida (H). Para análise foi utilizada uma amostra de 20 μg do antígeno em peso e 250 μmoles de cada aminoácido padrão. Os traços verticais indicam os picos correspondentes aos aminoácidos, da esquerda para a direita, Asp, Glu, Ser, Gly, His, Arg, Thr, Ala, Pro, Tyr, Val, Met, Leu, Ile, Phe, Lys respectivamente.

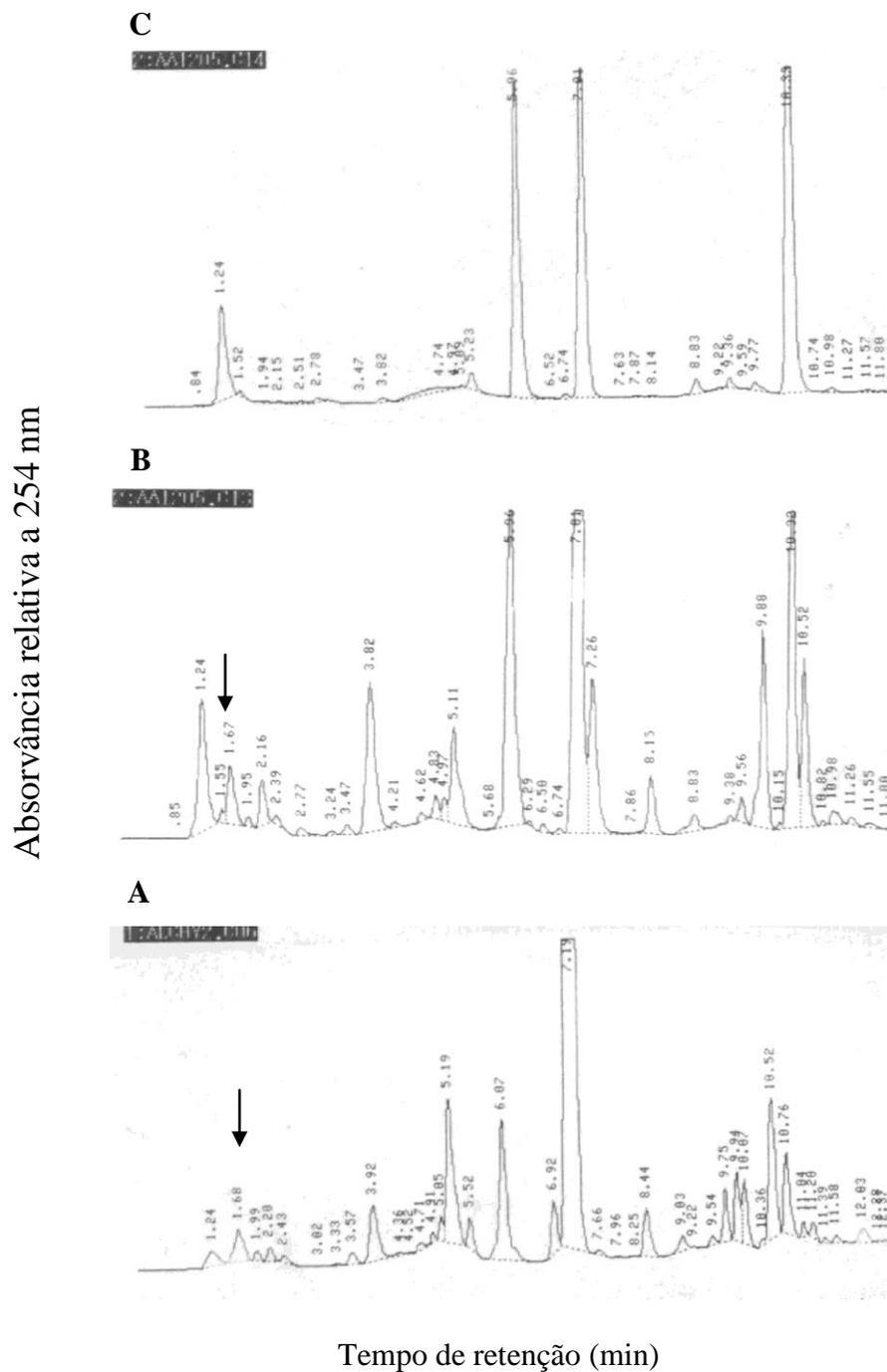


Figura 12. **Cromatografias de fase reversa de amostras hidrolisadas e oxidadas do antígeno PI.** Padrão de aminoácidos oxidado (A). Insulina humana oxidada (B). Antígeno PI oxidado (C). As setas indicam o pico relativo ao ácido cistéico proveniente da oxidação de cisteínas. Foram utilizados 10 μg de insulina humana e 20 μg do antígeno PI em peso. Foram utilizados 200 pmoles de cada aminoácido no padrão.

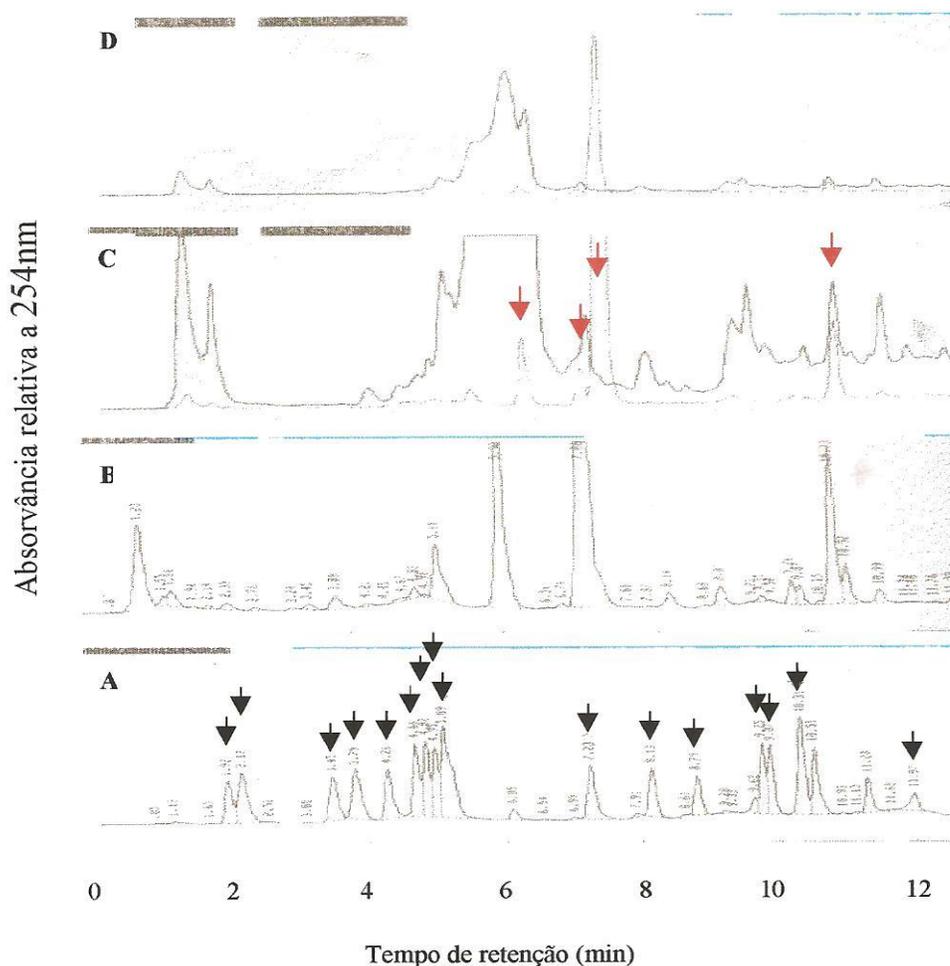


Figura 13. **Cromatografias de fase reversa dos hidrolisados do antígeno P8.** Padrão de aminoácidos não submetido a hidrólise alcalina (A). Padrão de aminoácidos hidrolisado (B). Antígeno P8 hidrolisado, 100 µg (C). Antígeno P8 hidrolisado, 20 µg (D). Foram utilizados 20 pmoles do padrão Tempo de retenção (min) e D as linhas pontilhadas correspondem ao perfil da amostra de antígeno menos o branco de hidrólise e as linhas contínuas correspondem ao perfil da amostra. As setas pretas correspondem aos picos referentes aos aminoácidos padrões, Asp, Glu, Ser, Gly, His, Arg, Thr, Ala, Pro, Tyr, Val, Met, Leu, Ile, Phe, Lys respectivamente. As setas vermelhas indicam picos não relacionados à aminoácidos.

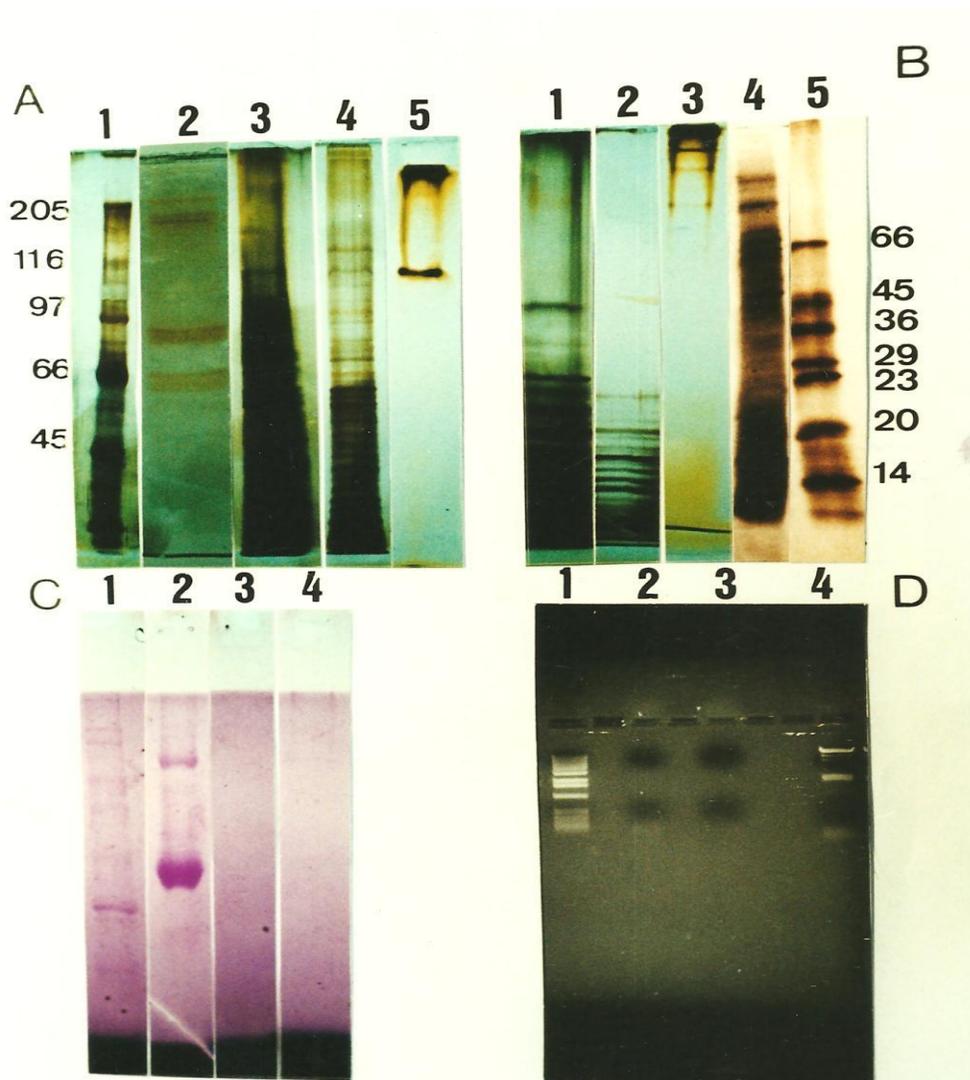


Figura 14. Eletroforese em gel de poliacrilamida e de agarose dos antígenos PI e P8. (A) PAGE de PI corado pela prata: A1 - padrões de peso molecular, A2 - fração solúvel pentavalente na presença de SDS, A3 - antígeno PI na presença de 2-mercaptoetanol, A4 - antígeno PI na presença de SDS, A5 - antígeno PI em condições nativas. (B) PAGE de P8 corado pela prata: B1 - antígeno P8 na presença de 2-mercaptoetanol, B2 - antígeno P8 na presença de SDS, B3 - antígeno P8 em condições nativas, B4 - fração solúvel da vacina monovalente PH8 na presença de SDS, B5 - padrões de peso molecular. (C) PAGE de PI corado pelo PAS: C1 - antígeno PI na presença de SDS, C2 - ovalbumina, C3 - tripsinogênio, C4 - antígeno PI em condições nativas. (D) AGE de PI e P8 corados por brometo de etídeo: D1 - marcador de DNA de 1,0 Kb, D2 - antígeno PI, D3 - antígeno P8, D4 - DNA de λ hyd. Géis de 10% de acrilamida e de 0,50% de agarose.

A propriedade dos antígenos PI e P8 serem reconhecidos pelos soros de cães e humanos infectados com leishmaniose visceral é marcadamente diminuída quando estes antígenos são tratados com 2-mercaptoetanol (Figura 15). Ao contrário do que se observa quando os antígenos são tratados com SDS, que dissocia os antígenos mas produz intermediários de peso molecular alto ainda reativos (Figura 8). Estes resultados em conjunto confirmam que os mecanismos de ação do SDS e do mercaptoetanol sobre a estrutura dos antígenos é distinta. Isto indica que estes reagentes agem sobre sítios diferentes na estrutura dos antígenos. Como se esperava, também a ação do ácido periódico sobre a capacidade de PI e P8 serem reconhecidos pelos soros testados é marcadamente reduzida quando os antígenos são tratados com ácido periódico (Figura 15). Este resultado confirma a presença de carboidratos na composição tanto de PI quanto de P8, e está em conformidade com o observado nos ensaios eletroforéticos (Figura 14 D, linhas 1 e 4). Há ainda uma ligeira redução da capacidade dos antígenos se ligarem ao soros testados após tratamento dos mesmos com Pronase, redução que pode ser devida a possível contaminação das preparações desta enzima, que não são isentas de contaminações.

Estes resultados indicam que os epitopos reativos dependem tanto do tamanho das formas agregadas dos antígenos quanto da sua massa molecular. Para isolar os produtos resultantes do tratamento dos antígenos com o 2-mercaptoetanol e caracterizar os monossacarídeos que os constituem, resolvemos fracionar, em coluna com faixa de separação mais ampla, tanto os antígenos não tratados como aqueles tratados com o redutor, para estabelecer qual o papel dos grupos reativos com este reagente para o processo de agregação e qual o peso molecular máximo dos antígenos.

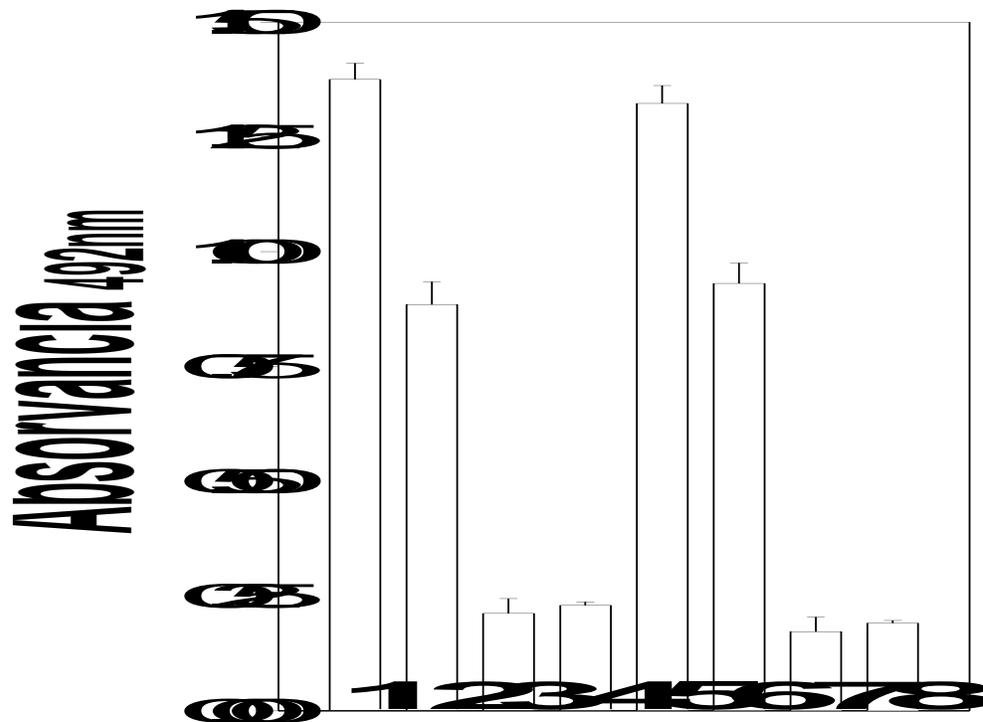


Figura 15. **Reatividade dos antígenos PI e P8 contra soros de cão com leishmaniose visceral, após tratamentos químicos e enzimático, em Elisa.** PI sem tratamento (1), PI tratado com pronase (2), PI tratado com 2-mercaptoetanol(3), PI tratado com ácido periódico(4), P8 não tratado(5), P8 tratado com pronase(6), P8 tratado com 2-mercaptoetol (7), P8 tratado com ácido periódico (8). Cada poço foi sensibilizado com 0,03 μ g de carboidrato total. Foi utilizado um grupo de cinco soros de cães com leishmaniose visceral para reação diluída 1 : 640. Como conjugado foi utilizada anti-IgG de cão conjugada a peroxidase. Os resultados correspondem a média de 3 determinações individuais.

Pode-se observar que a coluna de exclusão molecular Ultra Hydrogel Linear, que é utilizada para cromatografias em HPLC, apresenta uma faixa de separação bem ampla. Também é importante salientar que o volume de exclusão desta coluna é de $7,0 \times 10^6$ KDa, o que permite separar moléculas de faixas de peso variando de $7,0 \times 10^6$ a até 3,60 KDa (Figura 16). Após cromatografia na coluna Ultra Hydrogel Linear, surpreendemo-nos com o fato do antígeno PI eluir como dois picos distintos neste sistema, sendo que ainda foi observado um terceiro pico, bem menos evidente (Figura 17 A). Entretanto quando observamos a curva de calibração da coluna Ultra Hydrogel Linear (Figura 16), verificamos que os pico indicado como H2 e aquele que elui em seguida a este tem peso igual ou abaixo de 3,60 KDa, o que contrasta com origem cromatográfica do antígeno PI, que só deveria apresentar moléculas com pesos em torno de $3,0 \times 10^3$ KDa, pois ele pertence ao volume de exclusão da coluna Superose 12. Como a amostra aplicada de PI foi de 50 μ L, nós suspeitamos que após termos secado a amostra de 1,0 mL e suspenso-a num volume de 100 μ L do tampão fosfato 0,10 M, teríamos aumentado de tal forma a concentração de sal que a forma agregada de PI tivesse se dissociado em suas formas de peso molecular menor. Isto foi confirmado pelo fato de tanto o pico H1 quanto o pico denominado H2, que eluem em tempos distintos na cromatografia inicial (Figura 17 A), eluírem com tempo de retenção idênticos quando submetidos a cromatografia utilizando um tampão com maior força iônica. Note-se que ambos eluem com tempo de retenção, caracterizado por cromatografia (Figura 16), como correspondente ao tempo de retenção de moléculas de 3,60 KDa, um peso molecular muito menor que o do antígeno original (Figura 17 B e Figura 17 C).

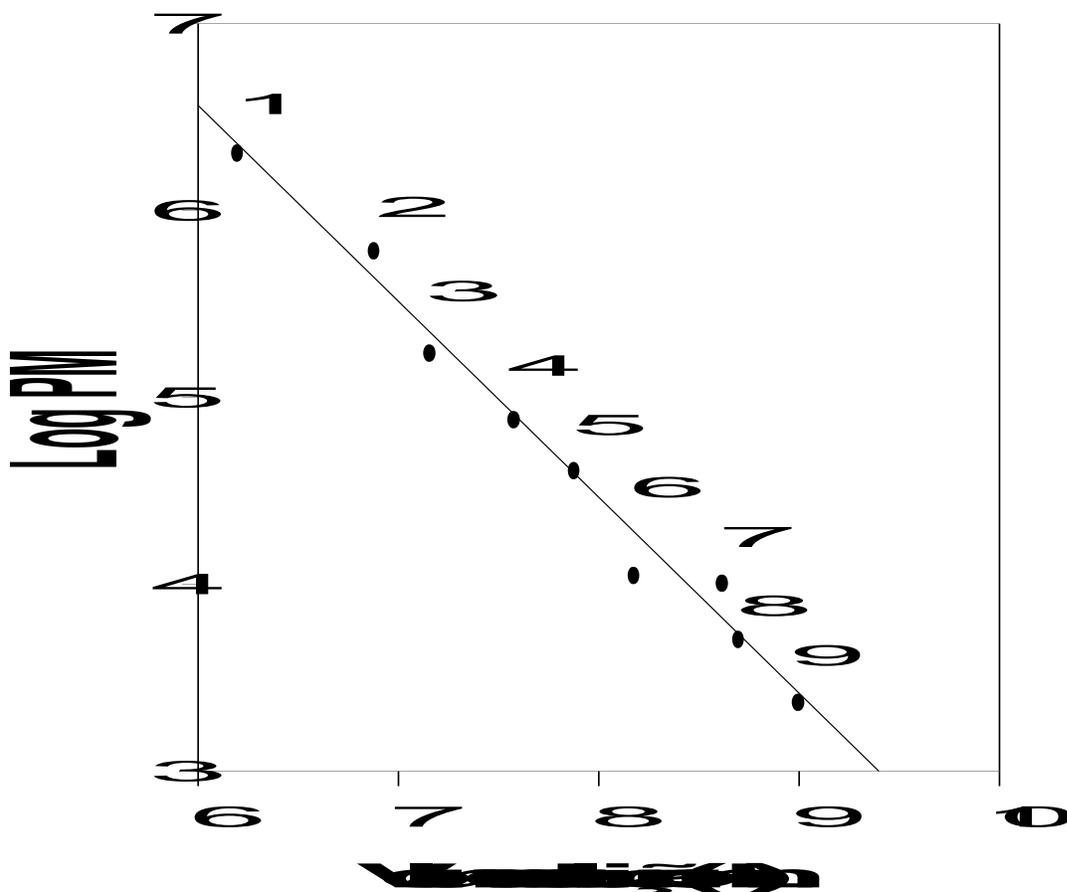


Figura 16. **Curva de calibração da coluna de exclusão molecular Ultra Hydrogel Linear.** Os números de 1 a 8 correspondem a Dextrans de pesos moleculares variando de $2,0 \times 10^6$ a $5,0 \times 10^3$ KDa. O número 9 corresponde a cadeia α da insulina humana ($2,30 \times 10^3$ KDa). As amostras foram eluídas com tampão fosfato de sódio 0,10 M pH 7,40 utilizando um fluxo de 0,80 mL / min.

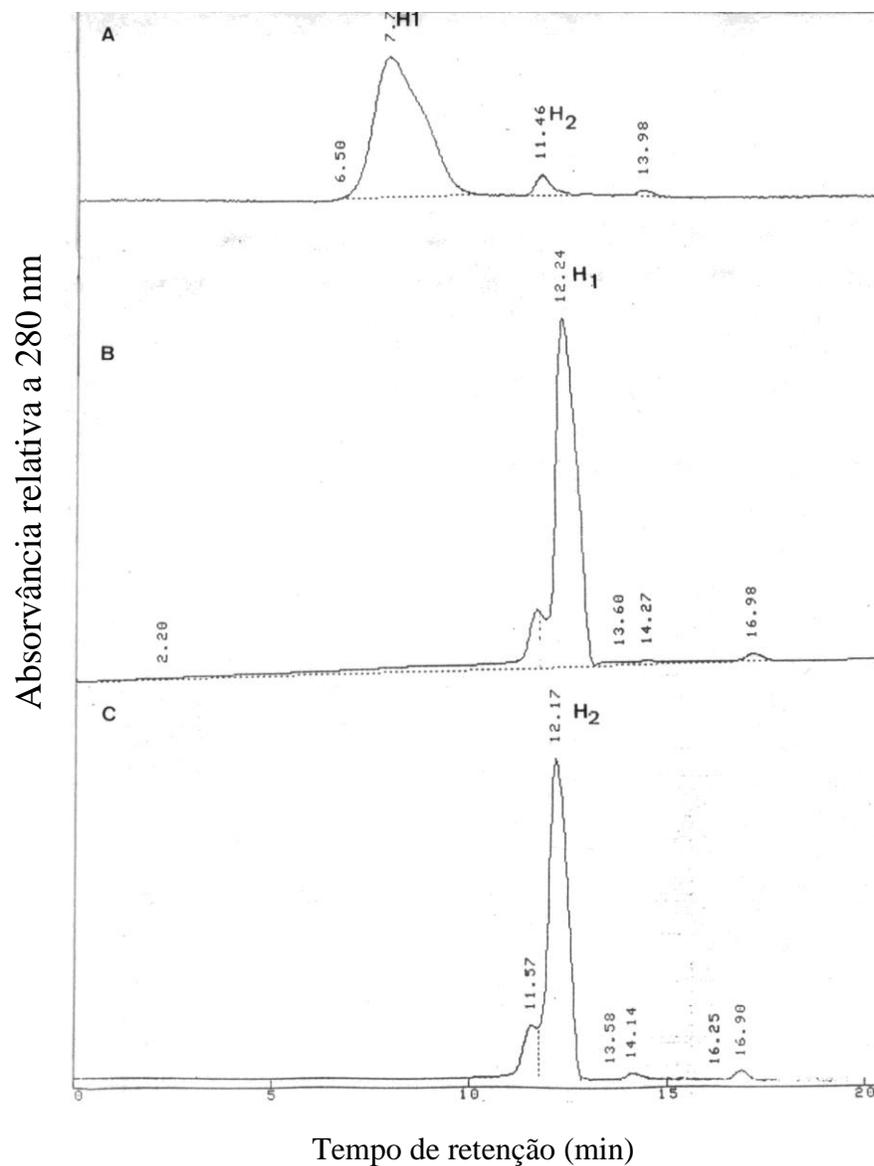


Figura 17. **Cromatografias de exclusão molecular do antígeno PI em coluna Ultra Hydrogel Linear, em HPLC.** Amostra de 50 μ L do antígeno PI em tampão fosfato de sódio 1,0 M, pH 7,40, eluída com tampão fosfato de sódio 0,10 M, pH 7,40 (A). Amostra de 50 μ L do pico H1 em tampão fosfato de sódio 1,0 M eluída com este mesmo tampão (B). Amostra de 50 μ L do pico H2 em tampão fosfato de sódio 1,0 M eluída com este mesmo tampão (C). Foi utilizado um fluxo de 0,80 mL / min.

Diferente do que acontece quando o antígeno PI é submetido a condição de alta força iônica, vários picos, com tempos de retenção distintos, são obtidos por cromatografia em HPLC de amostras do antígeno PI, previamente tratado com 2-mercaptoetanol (Figura 18 A e 18 B). O volume correspondente aos picos foi coletado, tendo sido as frações correspondentes a cada pico nomeadas de acordo com o seu tempo de retenção como 5R, 11R, 13R, 15R, 18R, 19R, 23R e 25R (Figura 18 B). Mais importante ainda é o fato destas frações eluírem em proporções distintas quando se troca o tampão de eluição (fosfato de sódio 0,10 M) por H₂O desionizada, havendo uma predominância, no material eluído com água, de frações de maior peso molecular (Figura 18 B, frações 5R e 11R). Este resultado demonstra que as frações provenientes do tratamento com o redutor ainda podem se associar, dependendo das condições de força iônica à qual são expostas.

Apesar destas frações se agregarem de maneira distinta na H₂O ou no tampão empregado, os resultados até aqui apresentados mostram que, após tratamento dos antígenos PI e P8 com o 2-mercaptoetanol, nenhuma reatividade das frações com soros infectados com a forma visceral da leishmaniose é observada, independente do peso molecular das frações (Figura 15).

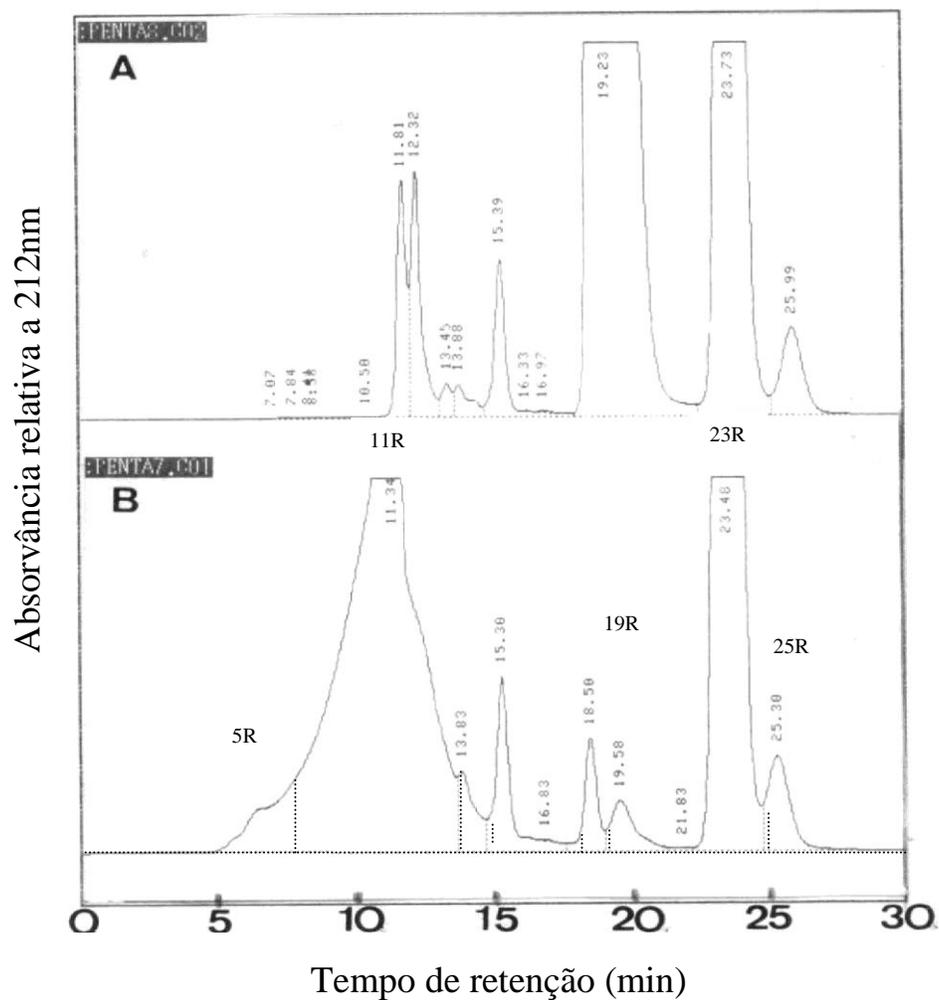


Figura 18. Comatografias de exclusão molecular em coluna Ultra Hydrogel Linear do antígeno PI tratado com 2-mercaptoetanol. Amostra de 16 μg PI eluída com tampão fosfato de sódio 0,10 M, pH 7,40 (A). Fluxo de 0,80 mL / min. Foram coletadas as frações correspondentes aos tempos de retenção de 5, 11, 13, 15, 18, 19, 23 e 25 minutos. amostra de 16 μg PI eluída com H₂O desionizada, pH 6,70 (B). Fluxo de 0,80 mL / min. Foram coletadas as frações correspondentes aos tempos de retenção de 5, 11, 13, 15, 18, 19, 23 e 25 minutos.

A hipótese de que o antígeno PI é formado por agregação de fragmentos moleculares menores é confirmada pelo fato de que, quaisquer dos fragmentos produzidos pela ação do 2-mercaptoetanol, independente do seu peso molecular, é capaz de gerar agregados de peso molecular superior, desde que a força iônica seja controlada (Figura 19). Observa-se ainda que, enquanto o aumento da força iônica produz intermediários de peso molecular em torno de 2,30 KDa (Figura 17 B e 17 C), a ação do 2-mercaptoetanol produz intermediários de pesos bem abaixo deste, como inferido dos tempos de retenção das frações coletadas neste caso (Figura 18 A e 18 B). Entretanto a fração que elui no final da cromatografia em H₂O, do material previamente tratado com o 2-mercaptoetanol, que elui aos 25 minutos, denominada 25R, é suficiente para produzir as demais frações observadas (Figura 19 A, 19 B, 19 C e 19 D). Notar que a associação de 25R forma inclusive frações de tempo de retenção semelhante àqueles de H1 e H2 (Figura 17 B e C), obtidas quando o antígeno original se dissocia em alta força iônica e na ausência de 2-mercaptoetanol. A fração 25R tem peso em torno de 0,60 KDa, estimado por cromatografia utilizando peptídeos comerciais como padrões.

Também o antígeno P8 é sensível a variações bruscas da força iônica do tampão de eluição, dando origem a frações semelhantes àquelas obtidas do antígeno PI nas mesmas condições (Figura 20). As frações obtidas para este antígeno tendem, assim como as frações de PI, a se reagregar de maneira distinta quando colocadas em H₂O ou em tampão de maior força iônica. Quando eluído com água frações com tempo de retenção igual ao do antígeno P8 original são observadas (Figura 21 B), entretanto em tampão fosfato 1,0 M praticamente todas as frações obtidas tem tempo de retenção inferior ao do antígeno original (Figura 21 A). Estes resultados reforçam a hipótese de que PI e P8 correspondem ao mesmo antígeno.

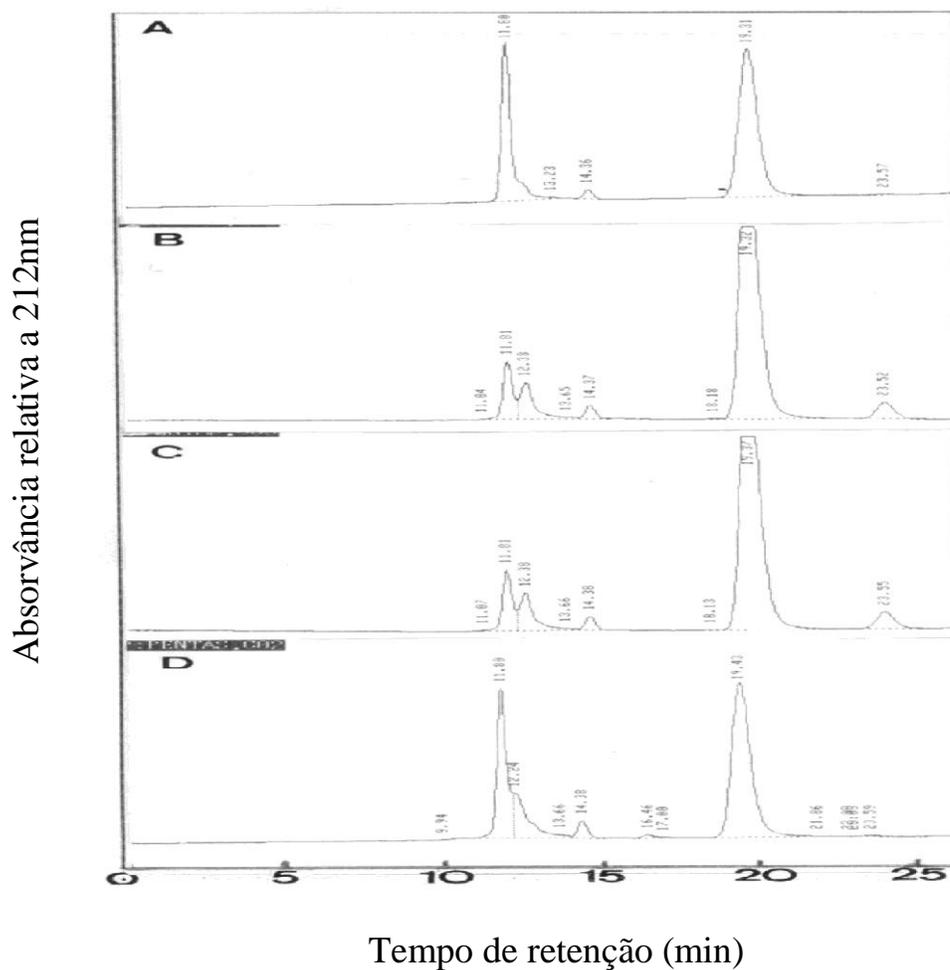


Figura 19. Cromatografias de exclusão molecular, em HPLC, das frações provenientes da cromatografia de exclusão molecular do antígeno PI tratado com 2-mercaptoetanol. Amostra de 50 μ L da fração 11R (A). Amostra de 50 μ L da fração 19R (B). Amostra de 50 μ L da fração 23R (C). Amostra de 50 μ L da fração 25R (D). Todas as amostras estavam em H₂O e foram eluídas com tampão fosfato 0,10 M , pH 7,40 utilizando fluxo de 0,80 mL / min.

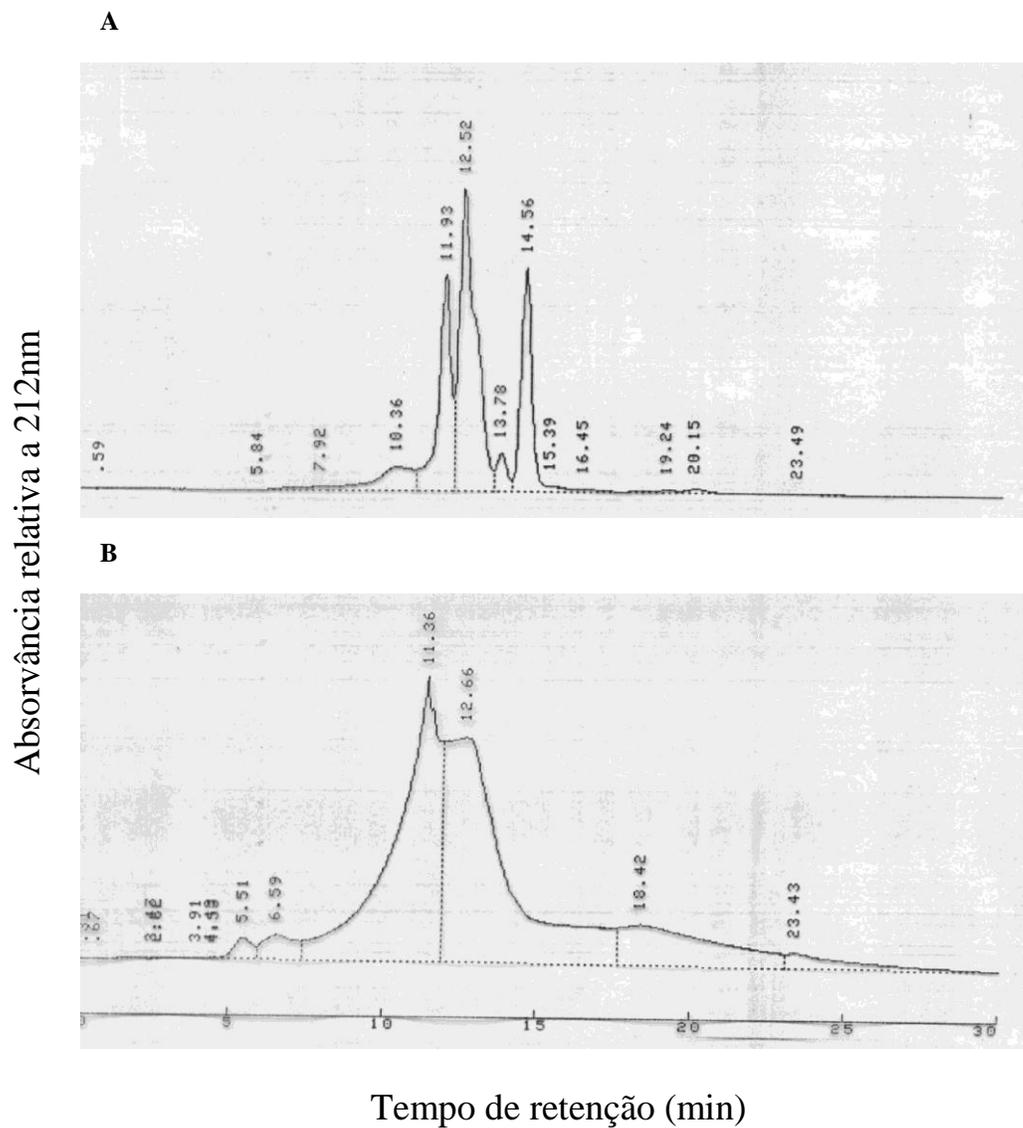


Figura 20. **Cromatografias de exclusão molecular do antígeno P8, em HPLC, utilizando coluna Ultra Hydrogel Linear.** Amostra de 20 μg do antígeno P8 em tampão fosfato de sódio 0,10 M, pH 7,4, eluída com tampão fosfato de sódio 1,0 M, pH 7,4 (**A**). Amostra de 20 μg do antígeno P8 em tampão fosfato de sódio 0,10 M, pH 7,40, eluída com H_2O desionizada (**B**). Em ambos os casos foi utilizado um fluxo de 0,80 mL / min.

O fato das diferentes frações provenientes do tratamento dos antígenos com o 2-mercaptoetanol se reassociarem lançou dúvidas se a iodoacetamida estaria realmente reagindo com a estrutura dos antígenos no passo seguinte do tratamento. Esta dúvida foi afastada pois o espectro dos antígenos no visível, após tratamento com os dois reagentes indica a incorporação da amida no material tratado. Pode-se inferir ainda que a mesma modificação química ocorre em todos os antígenos testados, independente da vacina da qual são isolados, indicando tratar-se em todos os casos da mesma molécula (Figura 21).

Para identificar os possíveis grupos responsáveis pelo fenômeno de agregação e / ou que fossem alvo para a ação do agente redutor foi feito o espectro do antígeno PI no infravermelho (Figura 22 B) Como se trata de um antígeno de carboidrato o espectro apresentou uma grande quantidade de sinais relativos a grupos hidroxila, região acima de 3000. Sinais característicos de ligações peptídicas na amostra do antígeno estavam ausentes como já era esperado, porém são abundantes na amostra de peptídeo C humano, um controle por nós utilizado (Figura 22 A) Este fato exclui também a possibilidade de termos resíduos de aminoácidos não aromáticos na estrutura dos antígenos. Os sinais mais importantes observados são aqueles observados na região entre 750 e 1250, comuns aos de monossacarídeos. Outro achado deste espectro são as vibrações entre 500 e 750, que podem ser resultantes de vibrações de monossacarídeos derivados contendo grupos sulfato ou grupos sulfonato.

Partimos então para análises por cromatografia de fase reversa no intuito de separar os diferentes estados dos antígenos agregados, ou mesmo de isolar as frações provenientes do antígeno tratado com 2-mercaptoetanol na sua forma de menor peso molecular.

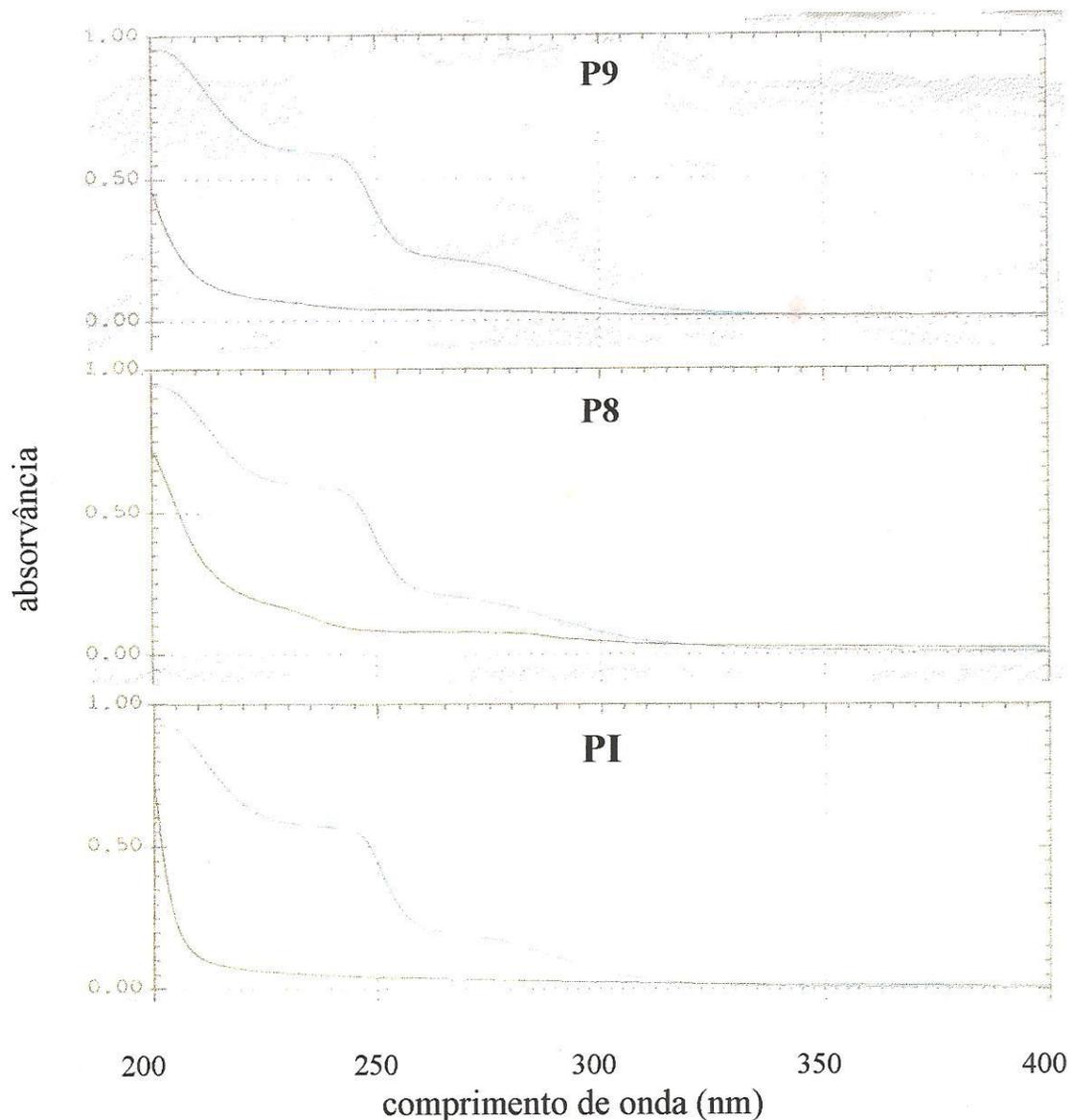


Figura 21. Espectros no visível dos antígenos PI, P8 e P9 após o tratamento químico com 2-mercaptoetanol. Espectro das amostras não tratadas (**linhas pretas**). Espectro das amostras após tratamento (**linhas azuis**). Foram tratados 20 μg de carboidrato total de cada antígeno. PI corresponde ao antígeno isolado de vacinas pentavalente; P8 e P9 aos antígenos isolados de vacinas monovalente das cepas PH8 e BH49 respectivamente.

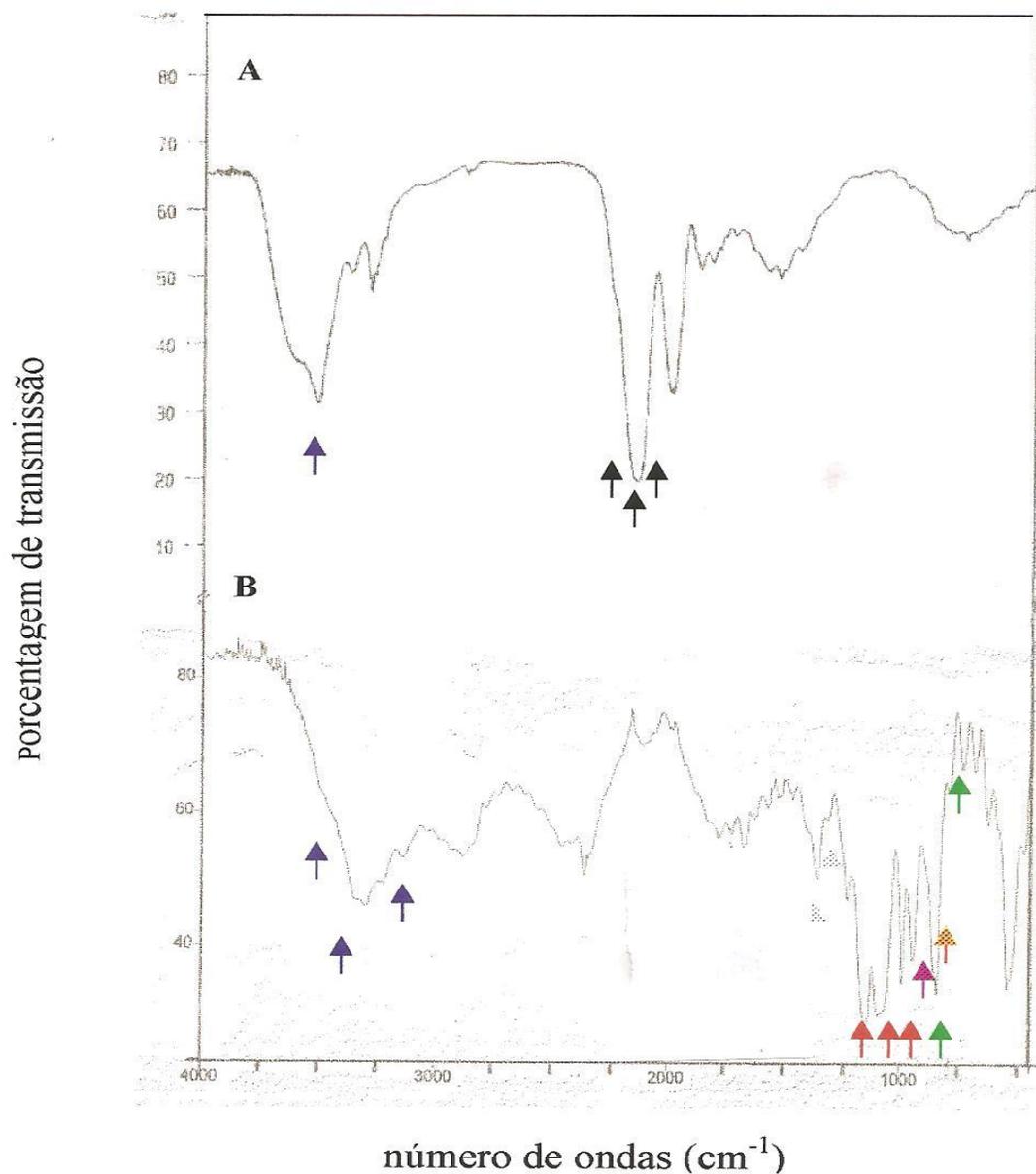


Figura 22. **Espectro no infravermelho do antígeno PI.** Espectro do peptídeo C humano (A). Espectro do antígeno PI (B). Para obtenção dos espectros foi utilizado 1,0 mg de cada amostra. O espectro do antígeno foi obtido a partir de 46 varreduras / min. Foram realizadas 2000 varreduras. Região de absorção de ligações peptídicas (**setas pretas**). Região de absorção de grupos hidroxilas (**setas azuis**). As demais setas indicam a presença monossacarídeos.

O antígeno PI elui no sistema de fase reversa como um único pico, indicando a presença de um único componente. Pelo seu tempo de retenção na coluna pode-se inferir que trata-se de uma molécula altamente polar (Figura 23 A). A amostra do antígeno previamente tratada com 2-mercaptoetanol, por sua vez, elui neste sistema como dois picos, indicando a presença de dois componentes distintos. Estes dois componentes eluem com tempos de retenção intermediários ao tempo de retenção do antígeno original, porém muito próximos, sugerindo que estes componentes são também muito polares (Figura 24 B).

Duas das frações obtidas por gel filtração do antígeno PI tratado com o 2-mercaptoetanol (Figura 18 B) foram também analisadas em cromatografia de fase reversa. Estas duas frações (25R e 19R) eluem no sistema de cromatografia de fase reversa exatamente com o mesmo tempo de retenção, confirmando que não existem diferenças de polaridade entre elas (Figura 24 A e 24 B). Mais importante ainda é o fato deste tempo de retenção ser idêntico àquele do pico do antígeno previamente tratado, quando aplicado na coluna de fase reversa sem fracionamento prévio por gel filtração. Este dado sugere que todas as frações resultantes do tratamento com o redutor só diferem entre si pelo peso molecular, mas não pela polaridade. Este resultado também sugere que a fração 25R é a unidade molecular alvo de modificação pelo 2-mercaptoetanol. Partimos então para análises dos antígenos e de suas formas quimicamente tratadas por cromatografias em camada delgada, concentrando o foco na identificação dos monossacarídeos que constituem os antígenos e nos grupos da sua estrutura alvos de modificação química.

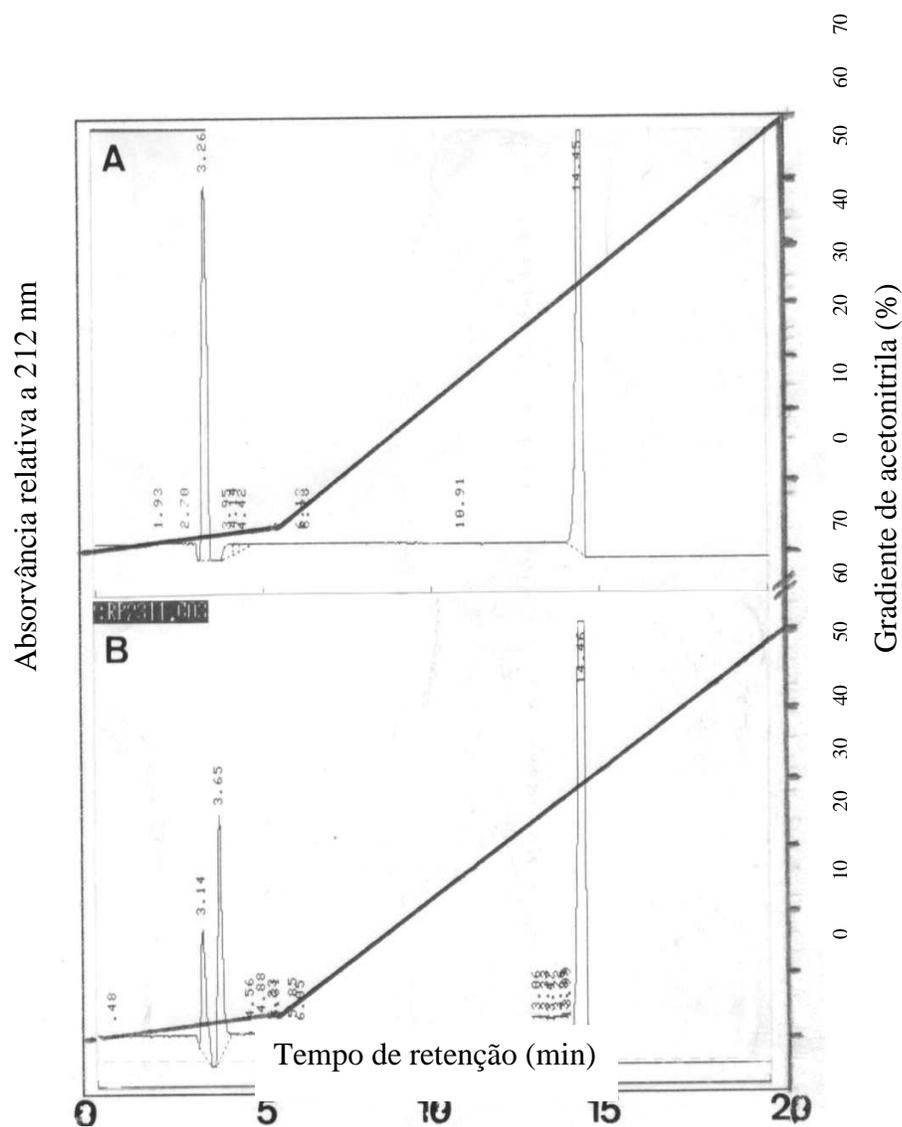


Figura 23. **Cromatografia de fase-reversa do antígeno PI tratado ou não com 2-mercaptoetanol.** Antígeno PI não tratado (A). Antígeno PI tratado (B). Foram aplicadas amostras de 20 μ g de carboidrato total suspensos em solução de TFA 0,020%. As amostras foram eluídas com solução de acetonitrila 70% em TFA 0,080% com fluxo de 1,50 mL / min. A linha vermelha corresponde ao gradiente de acetonitrila.

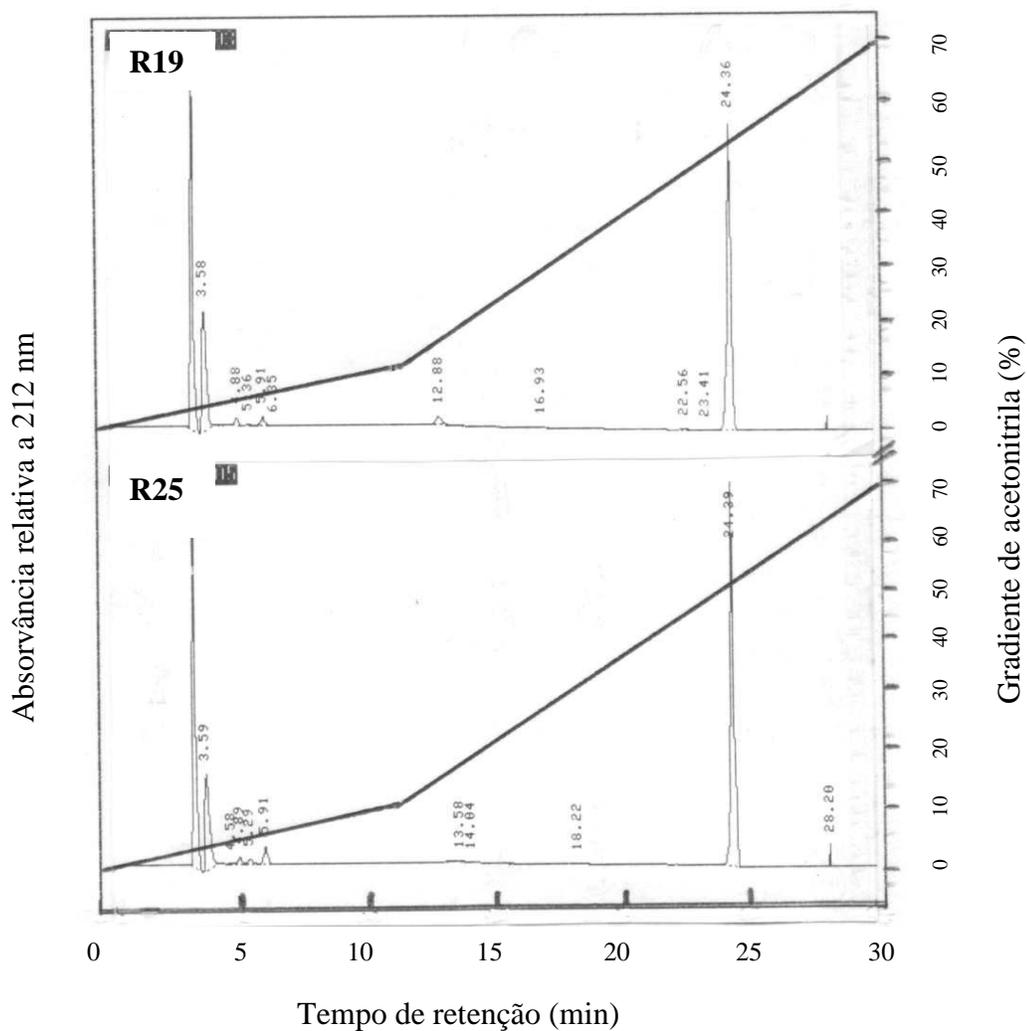


Figura 24. Cromatografias de fase-reversa das frações provenientes da cromatografia de exclusão molecular em HPLC, do antígeno PI tratado com 2-mercaptoetanol. Amostras de 50 µg em peso, suspensas em TFA 0,020%, foram aplicadas a coluna e eluídas com solução de acetonitrila 70% em TFA 0,080% com um fluxo de 1,5 mL / min.

Apesar dos antígenos serem efetivamente hidrolisados, a resolução dos monossacarídeos resultantes não foi suficiente nos ensaios de cromatografia em camada delgada. Hidrolisados ácidos submetidos a esta abordagem sugerem a presença de galactose como componente do antígeno PI, entretanto a hidrólise ácida nas condições que trabalhamos parece não ser completa (Figura 25 B). A hidrólise alcalina de PI mostrou-se mais eficiente que a hidrólise ácida, permitindo inferir que este antígeno apresenta ainda glicose e manose na sua composição, e sugere também a presença de galactose. Nesta mesma abordagem a presença de ácido siálico e de açúcares aminados e fosfatados é também sugerida (Figura 25 D). Apesar de sua ocorrência freqüente em polissacarídeos, não temos nenhum indício da presença de fucose neste antígeno (Figuras 25 A e 25 B). O antígeno não hidrolisado sequer deixa a origem de aplicação, entretanto sua formas tratadas com SDS ou 2-mercaptoetanol migram muito mais que todos os padrões de monossacarídeos testados (Figura 25 C).

A coloração observada para os diferentes monossarídeos no sistema de revelação que utilizamos é característica (Figura 26 A). As amostras de P8 tratadas com SDS coram em branco, enquanto as amostras tratadas com o redutor coram em azul (Figura 26 C). As amostras de PI submetidas a estes mesmos tratamentos também coram da mesma maneira (Figura 25 C). Um possível sítio de ação do SDS sobre açúcares poderia ser o amino grupo de açúcares aminados, entretanto amostras de padrões tratados com este agente não mostraram qualquer alteração no seu padrão de migração (Figura 26 B).

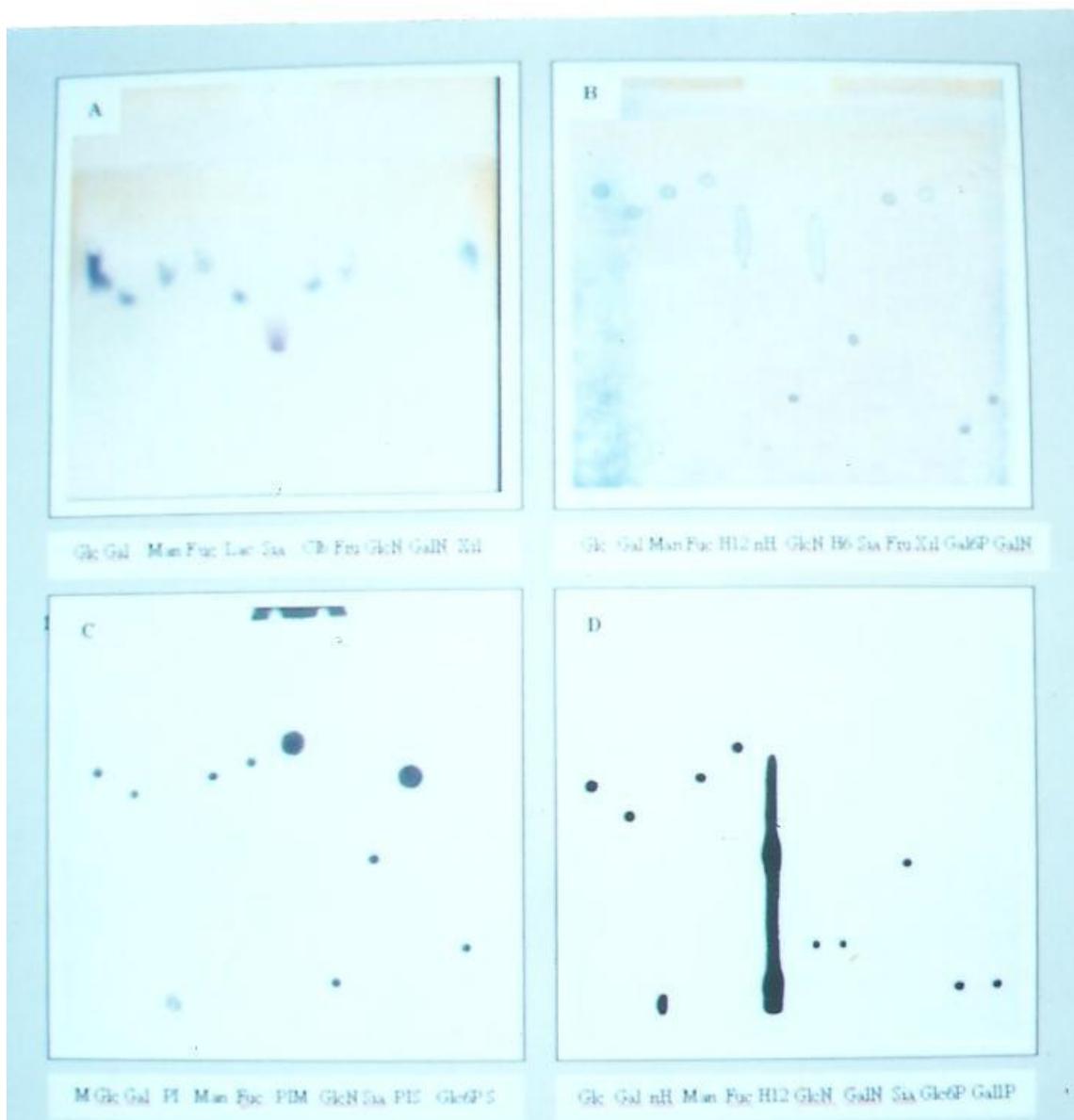


Figura 25. **Cromatografias do antígeno PI em camada delgada.** Em (A) padrões de monossacarídeos. Em (B) hidrolisados ácidos de 12 (H12) e de 6 horas (H6) do antígeno PI. nH corresponde ao controle não hidrolisado. Em (C) antígeno PI tratado com 2-mercaptoetanol (PIM) e com SDS (PIS). PI corresponde ao controle não tratado. Em (D) cromatografia de hidrolisado alcalino de 12 horas do antígeno PI (12h). nH corresponde ao controle não hidrolisado. Amostras de padrões = 2 µg. Amostras do antígeno = 20 µg. S e M correspondem aos reagentes. Fase móvel: butanol/ piridina/ H₂O. Todas as cromatografias foram reveladas com o sistema difenilamina/ anilina/ H₃PO₄.

A ação do 2-mercaptoetanol sobre oligossacarídeos e / ou monossacarídeos também foi explorada nesta abordagem cromatográfica. Observa-se que este reagente não é capaz de quebrar a ligação glicosídica dos diferentes dissacarídeos testados, uma vez que não se observa o aparecimento de manchas correspondentes aos valores de Rf dos monossacarídeos, após o tratamento (Figuras 26 A e 26 B). Entretanto o tratamento é capaz de alterar o padrão de migração de alguns destes dissacarídeos, como a lactulose e a sacarose (Figuras 26 A e 26 B). Note-se que estes dois dissacarídeos são formados pela ligação de resíduos de glicose e frutose, diferindo entre si apenas pelo tipo e posição da ligação entre os monossacarídeos. Esta observação é importante porque glicose e frutose isolados não são sensíveis a ação do 2-mercaptoetanol (Figura 26 D).

Como etapa final deste estudo verificou-se a eficiência de PI em discriminar a forma visceral da leishmaniose de outras doenças. Observa-se que PI é capaz de discriminar de forma significativa ($p < 0,01$) cães sadios daqueles infectados com leishmaniose visceral (Figura 27, grupos 10 e 11). No caso de humanos, PI é capaz de discriminar de forma significativa ($p < 0,01$) pessoas normais ou infectadas com calazar daquelas com outras formas clínicas da doença (Figura 27, grupos, 3, 4, 6 e 7). Também não se observa reatividade cruzada de PI com soros de pacientes infectados com doença de Chagas (Figura 27, grupos 6 e 8) e nem com pacientes com outras doenças (Figura 27, grupos 6 e 9). Soros de indivíduos normais que vivem em área endêmica, não vacinados e um ano após serem vacinados e, soro de indivíduos tratados e curados por imunoterapia com a vacina, não reagem de maneira significativamente diferente ($p > 0,01$) com PI (Figura 27, grupos 1, 2 e 3). Um dado curioso é que soros de indivíduos normais, de área endêmica para leishmaniose tegumentar ou de área não endêmica para leishmanioses, reagem de forma significativamente diferente ($p > 0,01$) com o antígeno PI (Figura 27, grupos 1 e 5).

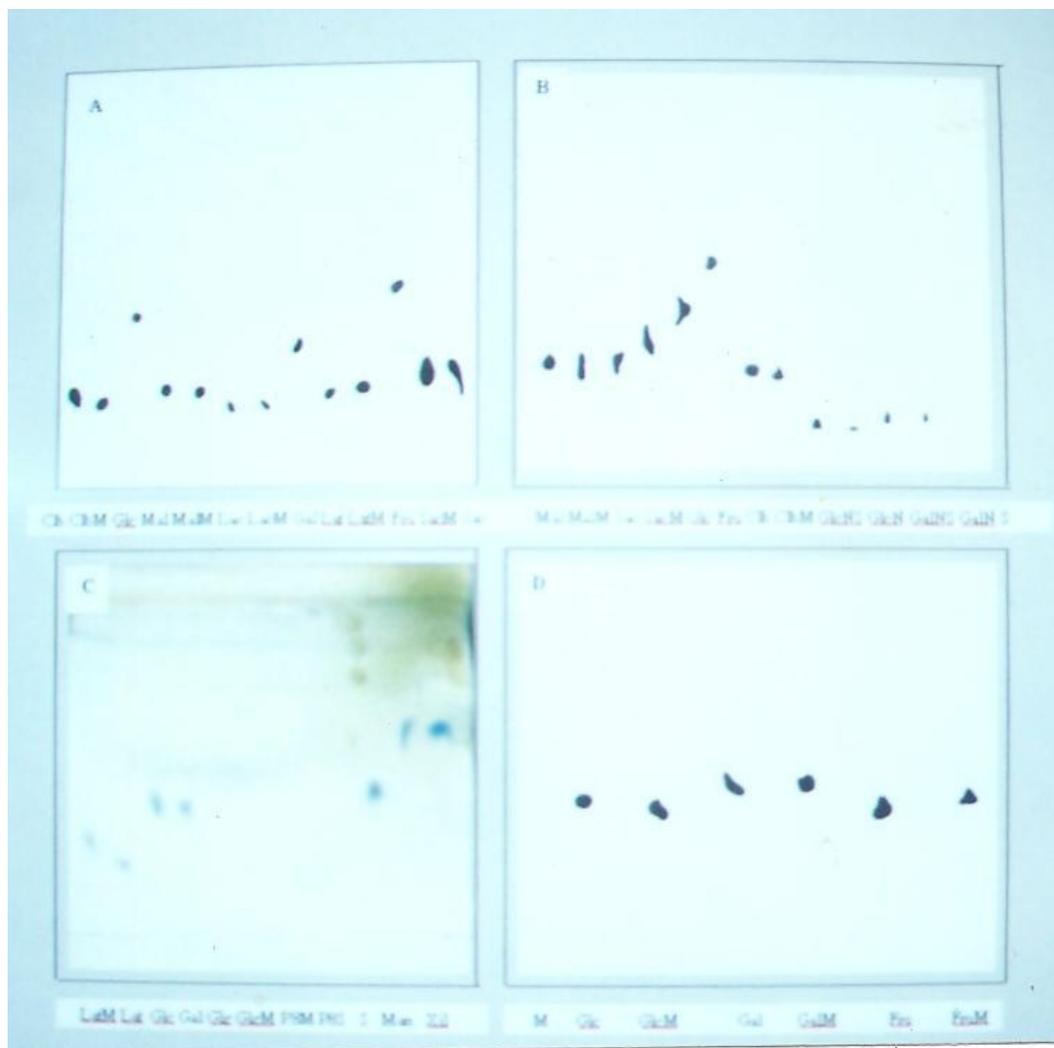


Figura 26. Cromatografias em camada delgada de monossacarídeos, dissacarídeos e do antígeno P8 tratados com SDS ou com 2-mercaptoetanol. Cromatografia de dissacarídeos tratados (A). Cromatografia de dissacarídeos tratados (B). Cromatografia de lactulose (Lat), glicogênio (Glg) e do antígeno P8 tratado (C). Cromatografia de monossacarídeos tratados (D). Os sufixos M e S indicam tratamento com 2-mercaptoetanol e SDS respectivamente. S e M correspondem a controles da cromatografia. Como fase móvel em todas as cromatografias foi utilizada uma solução de acetonitrila 85%. Todas as cromatografias foram reveladas com o sistema difenilamina/ anilina/ H_3PO_4 . Amostras de dissacarídeos = 2,0 μg . De monossacarídeos = 2,0 μg . Do antígeno = 20 μg .

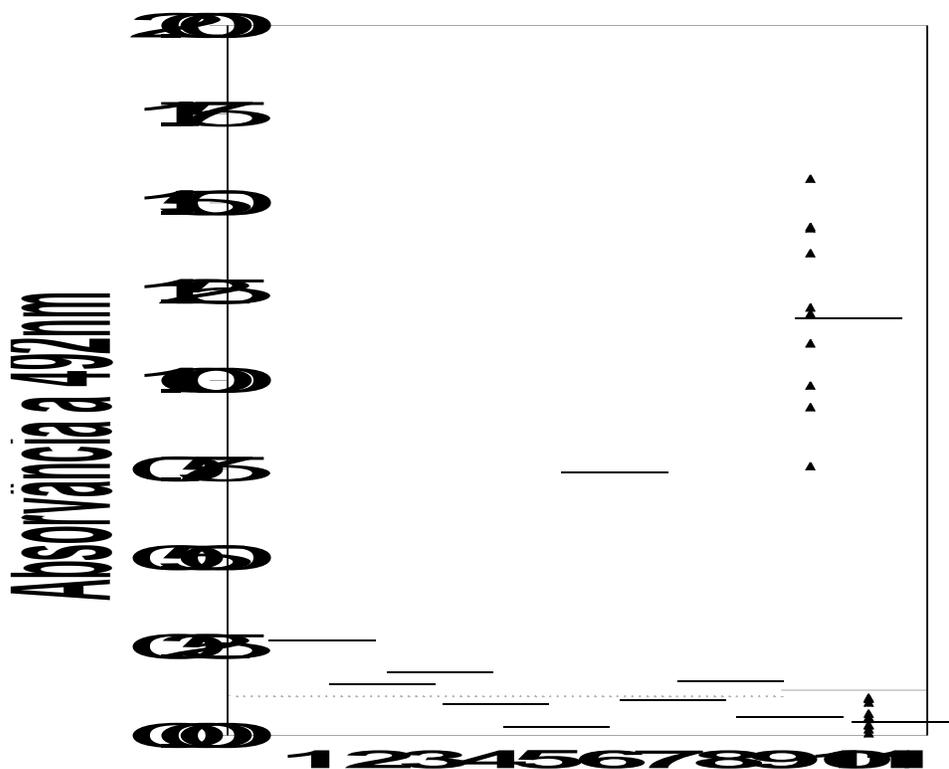


Figura 27. **Reatividade do antígeno PI contra soros humanos e de cães em Elisa.** (1) indivíduos humanos normais de área endêmica (LTA), (2) os mesmos indivíduos humanos, de área endêmica para LTA, 1 ano após terem sido vacinados. (3) pacientes com LTA tratados e curados por imunoterapia utilizando a vacina. (4) pacientes com LTA. (5) indivíduos humanos normais de área não endêmica para LTA. (6) pacientes com LVA. (7) pacientes com leishmaniose mucocutânea ativa. (8) pacientes com doença de Chagas. (9) pacientes com tuberculose. (10) cães com LVA. (11) cães normais. Em cada grupo foram testados 10 soros. Cada poço foi sensibilizado com 0,030 μg de carboidrato total. Os soros humanos foram usados na diluição de 1 : 100. O conjugado utilizado foi anti-IgG humana conjugada a peroxidase na diluição de 1 : 5000. Os soros de cães foram utilizados na diluição de 1 : 320 e como conjugado foi utilizada anti-IgG de cão conjugada a peroxidase na diluição de 1 : 10000. Os traços horizontais correspondem ao valor médio da reação para cada grupo. A linha pontilhada corresponde ao valor de corte para os soros humanos normais mais 3 desvios padrão. A linha cheia corresponde ao valor de corte para os soros de cão mais 3 desvios padrão.

DISCUSSÃO.

No combate as leishmanioses têm sido utilizado o isolamento e a caracterização de diferentes moléculas capazes de permitir não só um rápido e preciso diagnóstico da doença nas suas diferentes formas, mas também em induzir proteção prévia contra a infecção, na forma de vacinas (SHEPPARD & DWYER 1986, BLAXTER *et al.* 1988, REED *et al.* 1990, BURNS *et al.* 1993). Moléculas com estas propriedades têm sido isoladas tanto na sua forma intacta como fragmentada. Estas moléculas compreendem proteínas, lipídeos e polissacarídeos, ou moléculas híbridas constituídas por estas três classes de macromoléculas. Já é sabido que nem todas as moléculas provenientes do parasito são capazes de induzir proteção, mais importante ainda, sabe-se que trechos da seqüência primária de proteínas podem ser tanto protetores como indutores da leishmaniose. O mesmo é válido para moléculas de natureza não protéica, como polissacarídeos e lipídeos, ou híbridos destes três tipos de moléculas (BEVERLEY & TURCO 1998, HEWITT & SEEBERGER 2001).

Moléculas descritas como possíveis candidatas ao diagnóstico das leishmanioses também apresentam restrições quanto a sua eficiência para ensaios diagnósticos. Tais restrições podem estar ligadas a fatores relacionadas ao ensaio diagnóstico no qual elas são utilizadas, a forma do parasito do qual são isolados, ou mesmo, em se tratando de fragmentos de moléculas, de qual porção da molécula estes são obtidos. Fatores ligados a espécie do parasito do qual tais moléculas são isoladas também limitam sua utilização para diagnóstico preciso das doenças, além da reatividade cruzada observada para antígenos isolados de parasitos filogeneticamente relacionados (RAJASEKARIAH *et al.* 2001).

Neste estudo foram isoladas em duas abordagens distintas, moléculas de vacinas contra Leishmaniose Tegumentar Americana capazes de discriminar soros de pacientes e de cães infectados com a forma visceral da leishmaniose, daqueles infectados com forma

tegumentar da doença e de doenças relacionadas a leishmaniose. A reatividade é observada tanto em ensaios de “western blot” quanto em ensaios de Elisa (Figuras 2, 8 e 27). Antígenos reativos em “western blot” contra soros de pacientes com leishmaniose visceral foram descritos na literatura. Estes antígenos foram isolados de cepas de *L. infantum* e apresentam peso molecular entre 14 e 40 KDa (MARY *et al.* 1992). Estes antígenos são glicoprotéicos sendo que sua porção de carboidratos é responsável pela reatividade cruzada com soros de pacientes humanos infectados com doença de Chagas. Foi ainda demonstrado que a reatividade contra estes antígenos desaparece com a cura da doença, após tratamento utilizando antimoniais (CARDENOSA *et al.* 1995).

Alguns autores têm correlacionado a expressão de diferentes subclasses e subtipos de imunoglobulinas com as diferentes fases de desenvolvimento das leishmanioses. ANAN *et al.* (1999) demonstraram que o processo de cura por quimioterapia em pacientes com leishmaniose visceral está relacionado com redução nos níveis de IgG, IgE e IgM contra antígenos de membrana de *L. donovani*. Também mostraram que a resistência de pacientes a droga (estibogluconato de sódio) correlaciona-se com altos níveis do subtipo IgG1 e a manutenção dos níveis de IgG4 e IgG2, com predomínio de IgG1 na fase aguda da doença. Para a classe IgG foi demonstrado que realmente, em humanos, há um predomínio de IgG1 ao longo do curso da doença, em relação aos demais isotipos de IgG, tanto contra a proteína intacta rKMP-11 de *L. panamenis*, quanto ao extrato total deste parasito. Como esta proteína é extremamente conservada entre as diferentes espécies de *Leishmania* (99% de homologia), a reação contra segmentos peptídicos desta proteína também foram exploradas. Foi demonstrado que, enquanto a proteína completa é reconhecida preferencialmente por soros de pacientes com leishmaniose, peptídeos derivados de sua seqüência são reconhecidos preferencialmente por soros de pacientes com doença de Chagas, indicando

que soros de pacientes com leishmaniose reagem principalmente com antígenos conformacionais (TRUJILLO *et al.* 1999, THOMAS & LONGOBARDO 2001).

No presente estudo a reatividade de IgG total contra o antígeno PI foi analisada. Observa-se que o soro de indivíduos normais e de pacientes infectados com leishmaniose tegumentar, provenientes de uma mesma área endêmica, apresentam diferenças significativas ($p = 0,005$) nos níveis desta classe de imunoglobulinas (Figura 27, grupos 1 e 4). Observa-se ainda que soros dos indivíduos normais de área endêmica, antes e um ano após terem sido vacinados com a vacina pentavalente, não apresentam diferenças significativas ($p = 0,479$) de reatividade contra PI, (Figura 28, grupos 1 e 2). Estes dois grupos também não apresentam diferenças significativas ($p = 0,234$) de reatividade contra PI quando comparados com aqueles tratados e curados por imunoterapia utilizando a vacina (Figura 27, grupos 1, 2 e 3). Estes resultados mostram que independente de utilizarem a vacina ou de contraírem ou não a leishmaniose, indivíduos vivendo em área endêmica já apresentam um nível basal de IgG contra o antígeno PI. Estes dados sugerem que o contato prévio com antígenos do parasito pode ser importante para o estabelecimento da capacidade do sistema imune em responder à infecção.

Apesar de curados por imunoterapia, indivíduos tratados, indivíduos não infectados da mesma área endêmica e indivíduos infectados com leishmaniose tegumentar respondem igualmente ao antígeno PI (Figura 27, grupos 1, 2, e 3), mas a reação é significativamente diferente ($p < 0,01$) daquela observada para o soro de indivíduos normais de área não endêmica (Figura 27, grupo 5). Estes resultados contrastam com aqueles observados por CARDENOSA *et al.* (1995), uma vez que a reatividade de PI contra o soro de pacientes curados por imunoterapia não é diferente daquela de indivíduos normais da mesma área endêmica (Figura 27, grupos 2 e 3), pelo menos em níveis

quantitativos. Apesar de PI e P8 serem antígenos polissacarídicos (Figura 14 C, canaletas 1 e 3 e Figura 15), não se verifica reatividade de PI com soros de pacientes com doença de Chagas (Figura 27, grupo 8) e nem com soros de pacientes com tuberculose (Figura 27, grupo 9), quando comparados aos indivíduos com a forma visceral da leishmaniose (Figura 27, grupo 6). Nossos resultados contrastam também com aqueles descritos para o antígeno fucose-manose (FML), um antígeno de carboidrato (Palatnik *et al.* 1989). Soros de indivíduos normais, de área não endêmica para LTA (Figura 27, grupo 5), reagem significativamente diferentes com o antígeno PI ($p = 0,0001$), quando comparado aos soros de indivíduos normais de área endêmica para LTA (Figura 27, grupo 1). A reatividade do antígeno FMN com soros de indivíduos normais de área endêmica para LVA e com soros de indivíduos normais de área não endêmica para esta doença é a mesma, em termos quantitativos. Por sua vez, após cura da LVA por quimioterapia, a reatividade do soro dos pacientes contra antígeno FML torna-se significativamente diferente (menor) que aquela observada antes do tratamento (PALATNIK-de-SOUZA *et al.* 1995).

As leishmanioses caracterizam-se por desencadear uma resposta imune do tipo Th2, sendo que uma das características desta resposta é uma intensa produção de anticorpos. No caso da forma visceral da doença o título de anticorpos é em geral extremamente alto, sobretudo em cães. As diferenças de reatividade observadas quando se compara os antígenos PI, FML e aqueles descrito por CARDENOSA *et al.* (1995) sugerem que o contato de indivíduos e de cães com antígenos do parasito pode estimular a produção de anticorpos nestes indivíduos sem que eles necessariamente desenvolvam a infecção. Considerando o antígeno PI, pode-se deduzir a partir dos resultados apresentados que, a presença de anticorpos contra este antígeno não está relacionada com a manutenção da

LTA nos pacientes testados, dado que não existe diferenças significativas ($p > 0,01$) nos níveis de anticorpos nos diferentes grupos testados (Figura 27, grupos 1, 2, 3 e 4).

O antígeno PI reage significativamente diferente com soros de pacientes com leishmaniose visceral ($p < 0,01$), quando comparado com todos os demais soros humanos testados. A reatividade do soro de pacientes com leishmaniose visceral é significativamente diferente ($p = 0,0016$) daquela observada com o soro de indivíduos normais (Figura 27, grupos 5 e 6). Estes resultados indicam que este antígeno pode ser utilizado em ensaios de Elisa ou de “western blot” para o diagnóstico de leishmaniose visceral, mesmo em áreas onde esta doença coexista com a doença de Chagas ou outras formas da leishmaniose. Tanto o antígeno PI quanto P8 não apresentam reatividade contra soro de pacientes com leishmaniose tegumentar, o que é inesperado, uma vez que as vacinas de onde estes antígenos foram isolados são constituídas de cepas dermatrópicas do parasito (Figura 8, canaletas 6 e 7) e (Figura 27, grupo 4).

Em ensaios de Elisa PI e P8 reagem com soros de cães infectados com leishmaniose visceral (Figura 5). É sabido que cães infectados com leishmaniose visceral apresentam uma reação imune do tipo humoral intensa, com altos títulos de anticorpos dirigidos contra antígenos do parasito, principalmente do isotipo IgG. Esta reatividade têm sido explorada no sentido de se desenvolver ensaios de imunodiagnóstico das leishmanioses nestes animais, uma vez que este hospedeiro é principal propagador da forma visceral da doença para a população humana (GRADONI *et al.* 2001). Tanto o antígeno PI quanto o antígeno P8 são capazes de discriminar soros de cães infectados com leishmaniose visceral do soro de animais normais em “western blot” (Figura 8, canaletas 8, 9, 10 e 11). Ainda nesta figura pode-se ver que a reatividade destes antígenos ocorre apenas com moléculas de peso molecular acima de 90 KDa. Também o antígeno FML, um antígeno

glicoproteico que apresenta bandas em SDS-PAGE numa faixa de PM entre 9,0 e 90 KDa está relacionado à infecção por *Leishmania* (PALATNIK *et al.* 1989). Este antígeno é também capaz de discriminar soros de cães infectados com leishmaniose visceral de soros de cães sadios (CABRERA *et al.* 1999), entretanto este antígeno está numa faixa de PM abaixo daquela de PI e de P8. Como observado para soros humanos, soros de cães infectados com leishmaniose visceral reagem significativamente diferente com PI ($p = 0,0001$) quando comparados com soros de cães sadios (Figura 27, grupos 10 e 11). Antígenos com reatividade contra soros de cães com leishmaniose, semelhantes a PI e P8, também foram isolados por métodos de diálise de outras vacinas monovalentes preparadas com as cepas que constituem a vacina pentavalente. Nota-se que das cepas presentes na vacina pentavalente, apenas a cepa BH06 (*Leishmania (L.) mexicana*) não apresenta antígenos com as propriedades antigênicas de PI e de P8 como componentes do seu dialisado (Figura 5). Estes resultados indicam que PI e P8 podem ser usados também para o diagnóstico de leishmaniose visceral em cães, seja em “western blot” ou em ELISA.

É crescente o número de antígenos capazes de discriminar soros de pacientes e de cães com leishmaniose visceral de soros normais. A grande maioria destes antígenos é de natureza protéica, sendo obtidos tanto por fracionamento como por clonagem. Estes antígenos tem sido obtidos de linhagens causadoras de leishmaniose visceral como *L. chagasi* (BADARÓ *et al.* 1993, MARTIN *et al.* 1998), *L. infantum* (MARY *et al.* 1992, CARDENOSA *et al.* 1995) e de *L. donovani* (RAJASEKARIAH *et al.* (2001). Antígenos com estas propriedades também estão presentes em linhagens causadoras de leishmaniose tegumentar como *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis*, e em linhagens de *Leishmania major*-like, as linhagens BH49 e BH121 (SILVA *et al.* 1994), como demonstrado no presente estudo. Esta reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania*, causadoras de

diferentes formas clínicas da doença justifica o fato da vacina pentavalente conferir proteção em humanos, em áreas onde a leishmaniose tegumentar americana é causada principalmente por parasitos de espécies diferentes daquelas utilizadas nos ensaios de vacinação com esta vacina (MAYRINK *et al.* 1979, ANTUNES *et al.* 1986, NASCIMENTO *et al.* 1990, GENARO *et al.* 1996)). Neste mesmo contexto, vacinas preparadas com promastigotas mortos de *L. major* tem promovido proteção eficiente em ensaios de vacinação no Sudão, em áreas onde a doença é causada principalmente por parasitos da espécie *L. donovani* (KALIL *et al.* 2000).

Os antígenos aqui estudados, tanto isolados por métodos de diálise quanto por métodos cromatográficos, não apresentam material protéico em sua composição (Figuras 11, 12, 13 e Figura 22). Após sensibilizar-se a placa com a mesma quantidade de proteína proveniente do dialisado de vacina pentavalente ou da fração não dialisável da mesma vacina, a reatividade da fração não dialisada é duas vezes maior que a da fração dialisada (Figura 1A e 1B). Observa-se ainda que o(s) antígeno(s) presente(s) no dialisado apresentam peso molecular muito acima do corte imposto pela membrana de diálise (Figura 2 A), o que indica que este(s) antígeno(s) devem ser produto de agregação de moléculas pequenas que atravessam a membrana de diálise (cujo corte é de 12 a 14 KDa). Estes eventos de agregação são sugeridos também pelo observado na figura 3 A, onde se verifica que, nas primeiras horas de diálise, a grande maioria das moléculas presentes no dialisado tem peso molecular em torno de 24 KDa, entretanto elas não são reativas com quaisquer dos soros testados (Figura 2 A e 2 B). O resultado apresentado na figura 3 B indica que este antígeno origina-se de um fenômeno de agregação de moléculas que cruzam a membrana ao longo do processo de diálise, pois a membrana restringe a passagem de moléculas acima de 14 KDa. Isto é confirmado pela baixa atividade enzimática de tripsina,

cujo peso molecular é de 24 KDa, observada no dialisado de solução desta enzima. Este resultado confirma que moléculas com peso igual ou acima de 24 KDa não cruzam a membrana de diálise numa taxa significativa e que o antígeno dialisado é formado por fenômenos de agregação de moléculas de PM menores que 24 KDa.

O fenômeno de agregação, no caso dos antígenos obtidos por diálise, dá origem a moléculas de peso molecular tão alto que ocorre a precipitação delas ao longo da diálise. Entretanto verifica-se que tanto a fração que precipita quanto aquela que fica solúvel são originárias de uma mesma molécula, uma vez que apresentam um padrão de bandas muito semelhante em SDS-PAGE, na presença ou não de 2-mercaptoetanol (Figura 4). Os antígenos PI e P8, obtidos por métodos cromatográficos, também são formados pela agregação de pequenas moléculas, pois bandas reativas com soros de humanos e de cães com leishmaniose visceral são observadas numa faixa de PM entre 90 KDa ou mais de 200 KDa (Figura 8). Estes pesos são incompatíveis com o esperado para moléculas que eluem no volume em que os antígenos são coletados durante o fracionamento, que corresponde ao volume da exclusão da coluna, que deve conter moléculas em torno de 300 KDa ou acima deste valor (Figura 6 e inserção da mesma figura). A desagregação dos antígenos PI e P8 gera moléculas de pesos que variam desde 29 KDa a mais que 200 KDa. Estas moléculas aparentemente surgem de efeitos de dissociação, provavelmente induzidos pelo SDS e pelo 2-mercaptoetanol, sobre uma molécula originalmente de peso maior (Figura 9, canaletas 4, 6, 10 e 12). PI é realmente uma molécula de alto peso molecular, como evidenciado na figura 10 A, sendo sua dissociação em moléculas de menor peso molecular promovida pelo SDS (Figura 14 A, canaleta 4 e Figura 14 C, canaleta 1).

Tanto os antígenos PI e P8 quanto os antígenos isolados por diálise apresentam várias propriedades em comum: **(a)** praticamente não penetram nos géis em condições

nativas e coram como banda única muito superior a 200 KDa (Figura 2 A, 10 A e Figura 10 B canaletas 1 e 3), **(b)** eles só reagem em ELISA ou em western blot com soros de pacientes ou de cães com leishmaniose visceral, mas não com soro de pacientes com a forma tegumentar da doença (Figuras 1 B e 1 A, Figura 8 e Figura 27, grupos 6 e 4), **(c)** eles dissociam em uma série de moléculas menores sob ação do 2-mercaptoetanol (Figura 4, Figura 9 e Figura 14 A, canaleta 3 e Figura 14 B, canaleta 1), nesta condição ocorrendo perda da reatividade como antígeno (Figura 15), **(d)** eles dissociam também na presença de SDS, sem haver entretanto perda da reatividade como antígenos (Figura 2 A, Figura 4 e Figura 8) e finalmente, **(e)** ambos são isolados das mesmas amostras de vacina. Todas estas propriedades sugerem que estes antígenos parecem ser a mesma molécula. Esta suspeita é reforçada pela perda da capacidade de PI e de P8 serem reconhecidos pelo soro de cães com leishmaniose visceral após serem tratados com ácido periódico (Figura 15), além de PI e P8 corresponderem as mesmas frações cromatográficas, com padrão de absorção a 280nm e reatividade semelhante em “western blot”, na presença de SDS (Figura 6 e Figura 8).

Moléculas antigênicas de alto peso molecular, formadas por fenômenos de agregação molecular de moléculas menores foram descritas na literatura, tendo sido sua formação e composição química objeto de discussão. El-ON *et al.* (1979) descreveram um antígeno sacarídico isolado de meios de cultura de *L. tropica* e *L. donovani*, o qual denominaram EF (excreted factor). Entre as propriedades descritas para este antígeno, chama a atenção o fato deles não absorverem na região do espectro entre 220 e 750 nm, o que contrasta com os antígenos PI e P8, cujas bandas de absorção no espectro se localizam exatamente entre 250 e 220 nm (Figura 21, linha preta). O EF não apresenta em sua composição ácidos nucléicos, uma característica comum entre o EF e os antígenos PI e P8 (Figura 14 D, canaletas 2 e 3). Entre as propriedades físico-químicas descritas para o EF,

mostrou-se que este antígeno não é sensível a agentes como HCl 10%, H₂SO₄ 5%, altas concentrações de acetona ou NaCl, altas variações de pH ou de temperatura e tratamento com pronase. PI e P8, assim como os antígenos isolados por diálise, precipitam quando dialisados extensivamente contra água, sendo que estas formas precipitadas dos antígenos apresentam propriedades físico-químicas semelhantes às daquelas do EF. Apesar das formas precipitadas de PI e P8 apresentarem as mesmas propriedades antigênicas das suas formas solúveis, uma das propriedades físico-químicas dos antígenos na sua forma solúvel difere daquela observada para o EF. Em condições de força iônica alta, PI e P8 se dissociam em componentes de menor peso molecular que o antígeno original (Figuras 17 B e 17 C e Figura 20 A). Outra característica marcante dos antígenos PI e P8 é que, após a completa retirada do sal das amostras e liofilização, os antígenos só são solúveis em meio ácido, o que sugere que estes antígenos são moléculas ácidas. É interessante salientar que os antígenos PI e P8 são isolados da fração solúvel das vacinas enquanto que o EF corresponde a um antígeno solúvel que é excretado no meio de cultivo por formas promastigotas da *Leishmania*.

Outro antígeno com características semelhantes às de PI e P8 é o PRA (polysaccharide-rich antigen), isolado de meio de cultura de promastigotas de *L. donovani*. Este é também um antígeno formado por fenômenos de agregação molecular. Este antígeno, apesar de ser predominantemente composto por carboidratos (80%), contém material de natureza protéica (RAY & GHOOSE 1985), o que contrasta com os antígenos PI e P8, que são essencialmente constituídos por carboidratos (Figura 14 C, canaletas 1 e 4, Figuras 11 e 13). O antígeno PRA não é também reconhecido pelo soro de pacientes com a forma visceral de leishmaniose, o que é diferente do observado para os antígenos PI e P8 (Figura 8 canaletas 2 e 3 e Figura 27, grupo 6). Este resultado é surpreendente uma vez que

PRA é reconhecido por soro de coelho imunizado com formas promastigotas de *L. donovani*. PRA apresenta uma grande heterogeneidade de bandas em SDS-PAGE, assim como os antígenos PI e P8 (Figura 9), sendo que as formas mais reativas de PRA com o antisoro de coelho são aquelas que apresentam peso molecular até 45 KDa. Diferentemente do antígeno PRA, PI e P8 reconhecem apenas moléculas de PM igual ou acima de 90 KDa. Apesar de serem fortemente reconhecidos por soro de pacientes e de cães infectados com leishmaniose visceral, tentativas de se obter anticorpos contra PI e P8 falharam, quando utilizou-se o modelo de camundongos BALBc injetados por via subcutânea com 10 µg destes antígenos por animal (não mostrado). Experimentos preliminares sugerem que PI, entretanto, é capaz de induzir a síntese de interferon- γ por macrófagos peritoniais infectados com *L. amazonensis*, quando estimulados com 5 a 10 µg do antígeno, sendo que se observa forte inibição desta resposta quando as células são estimuladas com 50 µg de antígeno (não mostrado). O fato de não termos induzido a síntese de anticorpos contra PI e P8 em camundongos pode ser devido a diversos fatores, entre outros a quantidade de antígeno utilizado na imunização, a forma de injeção ou mesmo o adjuvante utilizado nestes ensaios, o hidróxido de alumínio.

As características de PI e P8 indicam que eles são moléculas resultantes de alterações físico-químicas que ocorrem nas vacinas originais. Mudanças nas propriedades físico-químicas de moléculas, resultantes da ação de agentes químicos, ou de componentes presentes nos meios onde estas moléculas são estocadas ou isoladas foram bem estudadas por SEMPRE-VIVO & HONIGBERG (1980). Estes autores demonstraram que os antígenos AAGP (Antigenically Active Glycoprotein) (DECKER-JACKSON & HONIGBERG 1978) e o EF (excreted Factor) (EL-ON *et al.* 1979) isolados de meio de

cultura de *L. donovani* correspondem a diferentes estados moleculares de uma mesma molécula. No contexto do componente principal a partir do qual o EF e o AAGP se formam, foi sugerido que as propriedades destes antígenos se assemelham muito a compostos descritos na literatura por LIGTH & SMITH (1963), compostos estes formados pela condensação de triptofano com carboidratos (SEMPRE-VIVO & HONIGBERG 1980). Apesar das características comuns com os antígenos EF, AAGP e PRA, os antígenos PI e P8 aqui descritos são distintos destes antígenos em muitos aspectos.

A ação do 2-mercaptoetanol sobre a estrutura dos antígenos PI e P8 não só desagrega a estrutura destes antígenos em vários fragmentos, como também abole a reconhecimento dos mesmos por soros humanos e de cães infectados com leishmaniose visceral (Figura 15). Os antígenos com propriedades semelhantes às de PI e P8, apresentam algum conteúdo protéico em sua estrutura, mas não foram analisados quanto a ação do 2-mercaptoetanol (DECKER-JACKSON & HONIGBERG 1978, EL-ON *et al.* 1979, RAY & GHOSE 1985, PALATNIK *et al.* 1989). As alterações nestes antígenos poderiam ser explicadas pela presença de proteínas ou peptídeos na sua composição, entretanto para PI e P8 isto não é válido, uma vez que eles não apresentam cisteína na sua estrutura (Figura 12 C e Figura 13). Assim como já se tinha observado várias bandas em ensaios de eletroforese, após o tratamento do antígeno PI com 2-mercaptoetanol (Figura 9, Figuras 14 A, canaleta 3 e 14 C, canaleta 1), uma série de frações foram obtidas em ensaios de cromatografia de exclusão molecular após tratamento do antígeno com 2-mercaptoetanol (Figura 18 A e B). Observa-se ainda que, apesar do tratamento com o 2-mercaptoetanol gerar pelo menos dez frações de tempos de retenção distintos, quando a amostra tratada é eluída em H₂O ou em tampão fosfato a distribuição destas frações é diferente, predominando frações de alto peso molecular na eluição com água (Figura 18 B) em comparação com a amostra eluída com o

tampão fosfato (Figura 18 A). Apesar do tratamento com o 2-mercaptoetanol dissociar o antígeno em diversas frações de peso molecular variável, moléculas com PM igual àquela do antígeno original ainda são observadas (Figura 18 B, fração 5R). Quando estas frações são analisadas individualmente quanto a sua reatividade em ELISA, inclusive 5R, nenhuma delas é reconhecida pelo soro de cães infectados com leishmaniose visceral como o antígeno original (não mostrado), confirmando o resultado anteriormente mostrado (Figura 15). Foi também observado que toda a reatividade das vacinas totais com soros humanos e de cães com leishmaniose visceral é devida aos antígenos PI ou P8 (não mostrado).

Os resultados até aqui apresentados indicam que o 2-mercaptoetanol altera quimicamente o antígeno, enquanto o SDS age apenas dissociando-o, sem introduzir alterações químicas do tipo covalente. Qualquer das frações obtidas por cromatografia de exclusão molecular do antígeno PI após tratamento com o 2-mercaptoetanol é capaz de se associar em frações de peso molecular superior ao da fração original (Figura 19), entretanto nenhuma destas formas agregadas apresenta a reatividade do antígeno original, como era esperado. Este resultado indica que o fenômeno de agregação é provavelmente resultante de interações iônicas, hidrofóbicas ou mesmo do tipo pontes de hidrogênio, entre grupos químicos presentes nas unidades de menor peso molecular que se associam. Assim como PI, o antígeno P8 também desagrega em frações de pesos moleculares menores que as do antígeno original quando submetido a alta força iônica (Figuras 20 A e 20 B), tendendo a apresentar formas de agregação de peso molecular mais alto, se submetido a condições de força iônica menores (Figura 20 B). Estes resultados mostram que também a formação de P8 envolve associações não covalentes de moléculas durante o fenômeno de agregação.

Os resultados observados na Figura 18 mostram que a ação do 2-mercaptoetanol sobre PI dá origem a várias frações de pesos moleculares bem abaixo daquele do antígeno

original, entretanto a simples manipulação da força iônica a que estas frações são submetidos é suficiente para induzir a reagregação dos fragmentos menores em formas de maior peso molecular (Figura 19). Quaisquer daquelas frações vistas na figura 19 se submetidas a esta condição dá origem a uma espécie intermediária de tempo de retenção semelhante às frações H1 e H2, obtidas pela dissociação do antígeno original (não tratado com 2-mercaptoetanol) pelo aumento da força iônica (Figuras 17 B e 17 C). É importante salientar, entretanto, que as novas espécies obtidas por reagregação das frações oriundas da ação do 2-mercaptoetanol (Figura 19) não apresentam as mesmas propriedades antigênicas do antígeno original. Estes resultados demonstram que a associação da(s) unidade(s) básica(s) que se agregam independentemente do(s) grupo(s) químico(s) alterados pelo 2-mercaptoetanol, mas a reatividade com os soros depende da estrutura topológica dos agregados formados. Isto indica que os antígenos PI e P8 são antígenos conformacionais. Estudos recentes têm mostrado que anticorpos de pacientes com leishmanioses reconheceriam preferencialmente antígenos conformacionais, enquanto anticorpos de pacientes chagásicos reconheceriam preferencialmente epitopos lineares (DURANTI *et al.* 1999, TRUJILO *et al.* 1999, LONGOBARDO *et al.* 2001). Nossos resultados concordam com aqueles apresentados por estes autores uma vez que PI, apesar de ser um antígeno de carboidrato, não é reconhecido por soros de pacientes chagásicos (Figura 27, grupo 8), mas é fortemente reconhecido por soros de pacientes com leishmaniose visceral (Figura 27, grupo 6). Ainda neste contexto, nenhum dos grupos de frações apresentadas na figura 7, provenientes de vacinas armazenadas (símbolos preto e vermelhos), são reconhecidas por soros de pacientes com LTA (não mostrado). Isto concorda com o fato destas vacinas apresentarem alto grau de degradação e, portanto, apresentarem a maior parte dos seus

componentes como fragmentos de moléculas sem a conformação das moléculas das quais se originaram.

Após a cromatografia na coluna Ultra Hydrogel Linear utilizando alguns marcadores peptídicos, de pesos numa faixa entre 0,6 KDa e 2,30 KDa, foi estimado que o peso das moléculas que eluem com tempo de retenção igual ao da fração 11R (Fig. 18 B) é de 2,30 KDa e da fração 25R (Fig. 18 B) é em torno de 0,60 KDa (não mostrado). A variação de peso molecular das bandas presentes em SDS-PAGE do antígeno PI (calculada a partir da Figura 9, canaleta 10) foi estimada ser em torno de 2,50 KDa (+/- 0,50 KDa) para as bandas de pesos moleculares até cerca de 66,0 KDa. Acima deste valor as bandas aumentam em peso como múltiplos de 2,50 KDa ou como somas deste valor, com variações de peso muito mais altas de uma banda para outra. Note-se que em SDS o antígeno se dissocia como na presença de altas concentrações de sal, e esta variação de 2,50 KDa é compatível com o peso estimado por cromatografia para as frações H1 e H2 (2,3 KDa), provenientes da desagregação do antígeno PI por ação do tampão fosfato 1,0 M (Figuras 17 B e 17 C). Analisados em conjunto estes resultados indicam que a menor unidade a partir da qual o antígeno PI se forma tem peso molecular em torno de 2,50 KDa, sendo as frações produzidas pela ação do 2-mercaptoetanol produtos de alterações covalentes introduzidas nesta unidade básica de 2,50 KDa. Este peso molecular é diferente daquele descrito para as unidades formadoras dos antígenos agregados PRA e ESA (excreted saccharide antigen) descritos por RAY & GHOSE (1985), cujo peso molecular mínimo foi descrito como 20 KDa, e com o peso molecular descrito para o EF que é de 33,0 KDa (El-ON *et al.* 1979). O antígeno FMN por sua vez, que corresponde a uma fração glicoprotéica, é composto por moléculas cujo peso molecular varia entre 9,0 a 95 KDa

(PALATNIK *et al.* 1989). Estes resultados confirmam que PI e P8 são antígenos diferentes dos descritos por estes autores.

O fato dos antígenos PI e P8 reagirem com 2-mercaptoetanol e a ausência de cisteína na composição destes antígenos surpreende, uma vez que após o tratamento dos antígenos com este reagente, a iodoacetamida, um agente químico capaz de alquilar tióis livres ainda reage com os antígenos PI, P8. Observa-se que o espectro do antígeno original muda consideravelmente após a etapa de reação com a iodoacetamida, havendo o aparecimento de bandas de absorção típicas de grupo amida no espectro dos antígenos tratados (Figura 21, linha preta). Outro fato importante é que após o tratamento dos antígenos com 2-mercaptoetanol ainda é possível dosar o teor de carboidrato da amostra, entretanto após a etapa de bloqueio dos tióis com a iodoacetamida esta dosagem já não é mais possível. A cor alaranjada característica da formação de furfurais, após a adição do H_2SO_4 à solução a ser dosada, é alterada por uma coloração púrpura intensa, se o antígeno for previamente tratado com 2-mercaptoetanol e em seguida com iodoacetamida.

A estrutura de PI não apresenta quaisquer sinais relativos a presença ligações peptídicas em seu espectro no infravermelho, confirmando a ausência de estruturas protéicas neste antígeno. A presença de resíduos de aminoácidos não aromáticos na estrutura de PI é também descartada, uma vez que não se observa sinais relativos à vibração de ligações peptídicas (Figura 22 B), enquanto estes sinais são abundantes no controle utilizado, o peptídeo C humano (Figura 22 A, setas pretas). Estes resultados estão em acordo com aqueles observados na análise de aminoácidos, que descartaram a presença de proteína nas estruturas de PI e de P8 (Figuras 11 D e 11 H e Figura 12 D). Como esperado, sinais relativos a presença de hidroxilas são abundantes no espectro do antígeno PI (Figura 22 B, setas azuis), o que é uma característica típica de polissacarídeos. Os picos na região

entre 1250 e 1450 cm^{-1} podem refletir a presença na estrutura de PI de ligações do tipo C-O-H (Figura 22 B, setas cinzas). O espectro do antígeno PI apresenta ainda sinais intensos entre 800 e 1250 cm^{-1} , que são indicativos da presença de monossacarídeos (Figura 22, setas vermelhas), sendo que sinais na região entre 850 cm^{-1} e 900 cm^{-1} são associados a vibrações e estiramento de ligações do tipo C-O-H. Estes picos estão associados a presença de ligações glicosídicas, sendo os picos entre 890 e 900 cm^{-1} , mais precisamente em 897 cm^{-1} (Figura 22 B, seta púrpura), típico de ligações β -glicosídicas (PAPPAS *et al.* 2001). Observa-se ainda alguns picos entre 775 e 825 cm^{-1} (Figura 22, setas verdes). Sinais nesta região do espectro tem sido atribuídos ao estiramento e a deformações de ligações do tipo C-O-S (TOIDA *et al.* 1999), sendo que picos exatamente em 800 cm^{-1} (Figura 22, seta marron) tem sido associados a vibrações destas ligações em grupos sulfonato de resíduos de monossacarídeos ácidos, como aqueles do ácido glucurônico (SANDERSON *et al.* 1987).

A caracterização de antígenos de carboidrato ou de glicoconjugados têm crescido nos últimos anos, baseado no fato de que estes antígenos, assim como algumas proteínas ou peptídeos derivados deles, serem tão eficientes em induzir proteção em modelos experimentais, em humanos e em cães, como vacinas de composição quimicamente definida (PAPADOPOU *et al.* 1998, SPITZER *et al.* 1999, DA-SILVA *et al.* 2001, HEWITT & SEEBERGER 2001). Resolvemos então identificar o número de componentes dos antígenos PI e P8 por cromatografia de fase reversa e também tentar identificar os monossacarídeos destes antígenos por cromatografia em camada delgada. A análise dos componentes de PI por cromatografias de fase reversa sugere que o antígeno é composto por componentes altamente polares pois ele elui como pico único em torno 2,5% de acetonitrila, que praticamente não se ligam a coluna (Figura 23 A). O segundo pico

observado na figura (que elui por volta de 45% de acetonitrila) corresponde a contaminantes presentes no sistema eluente, pois ele é também visto quando se corre uma amostra do branco (20 μ L de solução de TFA 0,02 %). Os resultados observados nas Figuras 23 A e B permitem-nos descartar por completo a presença de ácido graxos e de lipídeos na composição de PI, uma vez que não se observa nenhum material eluindo em concentrações mais altas de acetonitrila. Amostras do antígeno PI tratado com 2-mercaptoetanol por sua vez eluem como dois picos neste sistema de fracionamento (Figura 23 B). Os dois picos apresentam tempos de retenção intermediários quando comparados ao tempo de retenção do pico observado para o antígeno não tratado. Este resultado contrasta com aquele observado para a cromatografia de exclusão deste mesmo material eluído com água (Figura 18 B), onde são observados pelo menos 8 frações distintas, o que sugere que as várias frações obtidas pelo tratamento de PI com 2-mercaptoetanol, de peso molecular aparente distintos, são homogêneas quanto a sua polaridade. As frações provenientes da cromatografia de exclusão molecular do antígeno tratado (Figura 18 B) foram também submetidas a análise por cromatografia de fase reversa. Tanto a fração 19R quanto a fração 25R eluem como dois picos na cromatografia de fase reversa (Figura 24 A e B), exatamente com mesmo tempo de retenção observado para o antígeno PI após ser tratado (Figura 23 B).

Analisando os resultados em conjunto podemos sugerir que os antígenos PI e P8 são formados por no mínimo dois componentes, que por filtração molecular apresentam PM em torno de 2,50 KDa. Um componente que elui naquele sistema com tempo de retenção de cerca 11,6 min e outro de tempo de retenção de cerca de 12,2 min Estes componentes apresentam a mesma polaridade pois eluem na cromatografia de fase reversa como um único pico, com tempo de retenção de 3,3 min (Figura 23 A). Após o tratamento

com o 2-mercaptoetanol estes dois componentes sofrem alterações químicas, levando a um ligeiro aumento na polaridade de um dos componentes, que elui em 3,1 min, e a uma redução na polaridade do outro, que elui com 3,6 min (Figura 23 B). A presença de dois componentes distintos é reforçada pelo fato de quaisquer das frações mostradas na figura 18 darem origem a dois componentes, sempre com tempos de retenção de 3,1 e 3,6 min, quando aquelas frações são eluídas separadamente no sistema de fase reversa. Este resultado indica que todas as frações mostradas na figura 18, a princípio de PM aparente distintos, são resultantes do fenômeno de associação dos mesmos dois componentes de PM em torno de 2,50 KDa, quando colocados na condição de baixa força iônica. É importante observar que PI e provavelmente P8 são constituídos por formas agregadas em equilíbrio, sendo que no tampão original da vacina do qual são isolados (fosfato de sódio 0,10 M, pH 7,4) predominam as formas de PM muito alto (Figura 17 A, H1), enquanto em condições de maior força iônica predominam as formas de menor PM, a partir das quais os antígenos se formam (Figura 17 A, H2). A distribuição das várias formas agregadas em H₂O ou em tampão fosfato de diferente força iônica pode refletir a presença de dois componentes de associação distintos, um hidrofóbico que seria favorecido em H₂O e um outro iônico, que seria favorecido em função da força iônica ou pH do meio (Figuras 17, 18, 19 e 20).

Apesar da baixa resolução observada nos experimentos de cromatografia dos antígenos em camada delgada (Figura 25), algumas considerações importantes podem ser inferidas destes experimentos. A técnica de TLC é capaz de detectar até 2,0 µg de monossacarídeos, sendo que cada monossacarídeo cora com uma cor característica (Figura 25 A). Após ser submetido a até 12 horas de hidrólise em condições ácidas, o antígeno PI aparentemente não é totalmente hidrolisado, uma vez que o hidrolisado não migra até a

região onde a maior parte dos açúcares neutros migra, na fase móvel utilizada (Figura 25 B, H6 e H12). Apesar da baixa resolução, a presença de Galactose na estrutura do antígeno pode ser inferida deste resultado. Apesar da sua alta polaridade (Figura 23 A), PI não hidrolisado sequer deixa o ponto de aplicação da amostra em TLC (Figura 25 B, nH e Figura 25 C, PI), o que é provavelmente uma consequência do seu alto peso molecular. Isto pode também explicar a não migração do Glicogênio (Glg), ou de Glg tratado com 2-mercaptoetanol (Figura 26 C, Glg e GlgM). Enquanto PI na sua forma nativa PI sequer deixa o ponto de aplicação da amostra, o antígeno tratado com 2-mercaptoetanol migra muito mais que todos os padrões de monossacarídeos utilizados (Figura 25 C, PIM), mas cora de maneira distinta daquela amostra do antígeno tratada com SDS, que também migra consideravelmente (Figura 25 C, PIS). Na presença de mercaptoetanol PI cora como uma mancha totalmente branca, enquanto que em SDS ele cora como uma mancha totalmente azul, confirmando a ação química distinta dos reagentes sobre a estrutura dos antígenos. Também chama a atenção o fato do antígeno PI tratado com 2-mercaptoetanol migrar mais que fucose, o monossacarídeo neutro que mais migra na fase móvel empregada. Os produtos do tratamento dos antígenos com 2-mercaptoetanol são tão polares quanto o antígeno não tratado, o que está de acordo com resultados anteriores (Figuras 23 B e Figuras 24 A e B). A migração aumentada em TLC dos antígenos após tratamento com SDS e 2-mercaptoetanol, em comparação aos antígenos não tratados, é compatível com os resultados apresentados (Figura 9, canaletas 4, 6, 10 e 12 e Figuras 18 A e B) que mostram que, nestas condições, as frações resultantes dos tratamentos tem peso molecular aparente de 2,50 KDa ou menos, principalmente os produtos do tratamento com 2-mercaptoetanol. Neste caso não só há indícios de aumento de polaridade nos componentes que se agregam mas também de possíveis quebras de ligações químicas gerando fragmentos de PMs muito

abaixo de 2,50 KDa e mais polares que os monossacarídeos neutros testados (Figuras 18 A e 18 B, Figura 19, Figuras 23 e 24 e Figuras 25 C e 26 C).

A hidrólise alcalina do antígeno PI é mais eficiente que a hidrólise ácida. Nessa abordagem pode-se inferir que PI apresenta na sua composição açúcares neutros como a glicose, galactose e a manose. Não se observa mancha na área correspondente ao Rf de resíduos de fucose, confirmando a ausência deste açúcar neutro na composição de PI (Figura 25 D, H12 e Figura 25 B, H6 e H12). A presença de ácido siálico é sugerida, em função da presença de uma mancha na região de Rf deste açúcar ácido (Figura 25 D, H12 e Sia). A presença de açúcares fosfatados é também sugerida pois é observada uma mancha nítida na região de Rf destes monossacarídeos (Figura 25 D, H12, Glc6P e Gal1P). Os resultados obtidos em TLC não permitem descartar a presença de açúcares aminados na composição de PI e P8. Os resultados da análise de aminoácidos não apresentaram nenhum pico relativo a presença de açúcares aminados em PI ou P8, que também seriam alvo de derivatização com o PITC naquela abordagem, a menos que estivessem com os amino grupos bloqueados (Figura 11 D e 11 H). Alguns picos foram observados quando trabalhou-se com a hidrólise alcalina de uma amostra maior (100 µg) de P8 seguida da derivatização com o PITC, cujos tempos de retenção não correspondem a aminoácidos e nem aos aminoaçúcares comuns (Figura 13 C, setas vermelhas), com tempos de retenção característicos de material consideravelmente hidrofóbico. Ensaio preliminares utilizando a análise de monossacarídeos por espectrometria de massa combinada com ensaios de ressonância magnética nuclear confirmaram a ausência de fucose em PI e em P8. Nestes ensaios a presença de glicose (10 %), galactose (60%) e manose (30%) como os açúcares neutros presentes na composição dos antígenos vem sendo confirmada (não mostrado). A

identificação de monossacarídeos carregados bem como de derivados de monossacarídeos em PI e P8 vem sendo estudada nesta abordagem.

Numa tentativa de verificar como o mercaptoetanol atua sobre a estrutura dos antígenos PI e P8 submetemos amostras de monossacarídeos, dissacarídeos e trissacarídeos ao mesmo tratamento. A hipótese de que o 2-mercaptoetanol aja por quebra de ligações glicosídicas pode ser descartada. Os dissacarídeos maltose, celobiose, lactose, lactulose e sacarose não apresentaram manchas em TLC correspondentes aos valores de Rf dos monossacarídeos que os constituem, após o tratamento com 2-mercaptoetanol (Figura 26 A, Glc, Gal, Fru), sugerindo que não há quebras de ligações glicosídicas. Este resultado entretanto não descarta a possibilidade de que outra ligação covalente, que não a glicosídica, seja o alvo do 2-mercaptoetanol nas estruturas de PI e P8. Além disto, lactulose e sacarose apresentam um aumento nos seus valores de Rf após o tratamento (Figura 26 A, Lat e LatM e Sac e SacM), indicando um aumento da polaridade destes dissacarídeos. A maior migração da sacarose tratada com 2-mercaptoetanol comparada ao controle não tratado foi confirmada em um segundo experimento (Figura 26 B, Sac e SacM), bem como o da lactulose tratada (Figura 26 D, Lat e LatM). A ausência de quebra de ligações glicosídicas também é confirmada, uma vez que não se observa manchas correspondentes aos valores de Rf de Glicose e de frutose na linha de corrida dos dissacarídeos tratados (Figuras 26 A, B e C). Neste experimento foi também descartada uma possível ação do SDS sobre açúcares aminados como a glicosamina ou a galactosamina, uma vez que estes monossacarídeos não tem seu perfil de deslocamento alterado pela presença deste reagente (Figura 26 B, GlcN e GlcNS e GalN e GalNS).

Assim como o antígeno PI, também P8 na presença de 2-mercaptoetanol e SDS migra muito mais que todos os monossacarídeos testados (Figura 26 C, P8M e P8S). Nessa

figura pode ser vista a coloração branca da mancha correspondendo ao Rf do antígeno após tratamento com 2-mercaptoetanol e a mancha azul correspondente ao Rf do antígeno tratado com SDS. Observa ainda que a lactulose tratada com 2-mercaptoetanol, assim como a sacarose tratada nas mesmas condições, migram mais durante a cromatografia em camada delgada que o controle não tratado (Figura 26 B Sac e SacM) e (Figura 26 C, Lat e LatM). Nota-se ainda que amostras de glicogênio tratadas ou não com 2-mercaptoetanol permanecem no ponto de aplicação das amostras (Figura 26 C, Glg e GlgM). Isto sugere que não há alterações nos resíduos deste polímero, razão pela qual provavelmente eles permanecem na origem de aplicação, além de serem polímeros de alto peso molecular. Tanto a lactulose quanto a sacarose, que se mostraram sensíveis ao 2-mercaptoetanol, são dissacarídeos formados pela ligação de glicose com frutose, diferindo apenas na posição e no tipo de ligação que une os dois monossacarídeos. Interessante ainda é o fato de ambos reagirem com o 2-mercaptoetanol, apesar de sacarose não ser um açúcar redutor mas da lactulose ser. Também é relevante o fato dos dissacarídeos formados apenas por glicose não serem afetados pelo 2-mercaptoetanol (Figura 26 A, Clb e ClbM, Mal e MalM e Lac e LacM), além do glicogênio, que também é formado só por resíduos de glicose (Figura 26 C, Glg e GlgM). Como a frutose é um glicofuranosídeo e glicose um glicopiranosídeo, suspeitamos que a frutose pudesse ser o resíduo alterado pelo 2-mercaptoetanol e isto poderia explicar a migração alterada da lactulose e da sacarose tratadas pelo 2-mercaptoetanol. Como era esperado, a glicose e a galactose tratadas com 2-mercaptoetanol não tem o seu valor de Rf alterado quando comparadas aos controles não tratados, para nossa surpresa, entretanto, também a frutose aparentemente não tem o seu valor de Rf alterado, migrando exatamente igual ao seu controle não tratado (Figura 26 D, Glc e GlcM, Gal e GalM e Fru e FruM). Apesar destes resultados, a ação do 2-mercaptoetanol sobre a

estrutura de PI e P8 sugere que a estrutura de carboidratos é de alguma forma passível de sofrer alterações químicas promovidas por este reagente, resultando em fragmentos mais polares inclusive, que os monossacarídeos testados.

Relatos na literatura sobre a reação de 2-mercaptoetanol com carboidratos são escassos, entretanto é sabido que este reagente é capaz de alterar a cinética de interação de drogas como as enediinas com DNAs. Sabe-se que estas drogas agem sobre o terminal 4' do DNA produzindo, por mecanismos que envolvem radicais livres, radicais livres de desoxiribose que são estabilizados pelo 2-mercaptoetanol. O mecanismo proposto para esta atividade envolve a transferência de átomos de H da hidroxila do tiól para os radicais da droga e para o radical desoxiribose (LOPEZ-LARRAZA *et al.* 2001). Outro mecanismo de ação do 2-mercaptoetanol envolve a incorporação simultânea de átomos de hidrogênio e de uma molécula do reagente 2-mercaptoetanol durante a quebra de ligações do tipo C-S-C (TSIKAS *et al.* 1999), presentes em vasodilatadores fisiológicos humanos inibidores da agregação de plaquetas. No presente estudo temos evidências de que a reação do 2-mercaptoetanol envolve ou um ataque aos antígenos via hidroxila do reagente, deixando o grupo tiól livre para a incorporação da iodoacetamida, já que este reagente reage após a etapa de tratamento do antígenos com 2-mercaptoetanol (Figura 21) ou, outro mecanismo que resulte na manutenção de grupos tíóis livres na estrutura dos antígenos. Um mecanismo de ação como o proposto por TSIKAS *et al.* (1999) responderia pelo observado para a reação dos antígenos PI e P8 com o 2-mercaptoetanol, uma vez que o produto de quebra de ligações do tipo C-O-S, que podem estar presentes em PI e P8 (Figura 22, setas verdes), resultariam em produtos com tíóis livres para o ataque pela iodoacetamida. Nossos resultados entretanto não são suficientes para confirmar isto. Como observado nos estudos de espectroscopia no infravermelho, muitas são as possibilidades de reação dos antígenos

PI e P8 com o 2-mercaptoetanol, sendo que a determinação precisa da composição e as quantidades relativas de cada monossacarídeo são necessárias para se vislumbrar um modelo completo de como estes antígenos são formados por agregação e como o 2-mercaptoetanol altera estes complexos agregados.

O fato de termos determinado a presença de glicose, galactose e manose na estrutura dos antígenos PI e P8 não é incomum, uma vez que estes monossacarídeos são freqüentes em polissacarídeos de *Leishmania*. El-ON *et al.* (1979) não caracterizaram as hexoses presentes no EF e relataram a ausência de ácido siálico, de aminoaçúcares e de frutose, assim como a presença de ácido urônico neste antígeno. Os resultados aqui apresentados sugerem que PI e P8 podem apresentar ácido siálico em sua estrutura, assim como fosfoaçúcares. Os resultados também apontam para a presença de monossacarídeos derivados modificados com grupos sulfato e/ou sulfonato. RAY & GHOSE (1985) identificaram galactose como monossacarídeo presente nos antígenos PRA e ESA e observaram um outro componente em TLC, mas não o identificaram. Em comparação ao antígeno FMN descrito por PALATNIK *et al.* (1989), nossos resultados descartam a presença de fucose como constituinte dos antígenos PI e P8, bem como de aminoácidos. Como se trata de antígenos obtidos de amostras de vacinas de longos períodos de estocagem, PI e P8 podem ser formados por agregação de fragmentos de qualquer molécula presente nas cepas de *Leishmania* a partir das quais a vacina é produzida. Neste contexto é relevante salientar que partes da molécula do lipofosfoglicano (LPG) são encontradas como constituintes de uma série de moléculas isoladas de *Leishmanias*, como a fosfatase ácida, o próprio EF, nas âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPIs), em glicosilinositolfosfolípides (GIPLs) e em glicoproteínas (MENDONÇA *et al.* 1991, KELLEHER *et al.* 1992, BEVERLEY & TURCO 1998), o que sugere que porções isoladas desta molécula

desempenham papel crucial no processo de infecção pelo parasito, sendo portanto alvos potenciais nos estudos voltados para o desenvolvimento de vacinas. Antígenos predominantemente de carboidrato têm sido testados quanto ao seu papel como vacinas. O antígeno FMN encontra-se em fase III de testes como vacina contra leishmaniose visceral em cães (DA-SILVA *et al.* 2001). PATEL & LINDHORST (2001) têm estabelecido estratégias de síntese química para obter vacinas constituídas por porções de moléculas de carboidrato relevantes no processo de infecção por *Leishmania*. HEWITT & SEEBERGER (2001) produziram por síntese química um antígeno correspondente ao tetrasacarídeo do “core” do LPG de *L. donovani*, que está em fase de testes para uso como vacina contra leishmaniose visceral em humanos. PI e P8 são moléculas de carboidrato que fazem parte da vacina contra Leishmaniose Tegumentar Americana produzida por MAYRINK *et al.* (1979). O papel destes antígenos na proteção induzida pela vacinação em humanos pode ser importante no contexto da vacina como um todo, permanecendo este papel como uma perspectiva futura de estudo.

CONCLUSÕES.

i. Antígenos foram isolados tanto de amostras de vacinas compostas por cinco cepas de parasitos do gênero *Leishmania*, quanto de amostras de vacinas produzidas a partir de quatro das cinco cepas presentes na vacina polivalente;

ii. Os antígenos isolados destas vacinas são fortemente reconhecidos pelos soros de indivíduos humanos e de cães infectado com a forma visceral da leishmaniose, mas não pelo soro de indivíduos humanos infectados com outras formas da leishmaniose, sendo capazes de permitir o diagnóstico diferencial destas doenças;

iii. Os antígenos isolados destas vacinas são fortemente reconhecidos pelos soros de indivíduos humanos e de cães infectado com a forma visceral da leishmaniose, mas não pelo soro de indivíduos humanos normais, sendo capazes de permitir o diagnóstico de leishmaniose visceral em humanos e em cães;

iv. Os antígenos isolados destas vacinas não dão reatividade cruzada com soro de indivíduos humanos infectados com doenças relacionadas com a leishmaniose visceral e nem com soro de indivíduos humanos infectados com outra doenças;

v. Os antígenos isolados da vacina polivalente, antígeno PI e o antígeno isolado de vacina monovalente, antígeno P8, reconhecidos especificamente pelo soro de humanos e de cães com leishmaniose visceral, são antígenos de carboidrato;

vi. As vacinas contra Leishmaniose Tegumentar Americana utilizadas neste estudo sofrem mudanças na sua composição molecular, principalmente devido a fenômenos de agregação molecular, dando origem a moléculas de alto peso molecular, antigenicamente reativas;

vii. Os fenômenos agregação molecular que dão origem a estes agregados antigênicos ocorrem independentemente do tempo de estocagem das vacinas, sendo estes agregados isolados mesmo de vacinas recém preparadas;

viii. Os antígenos PI e P8 isolados neste estudo são formados por fenômenos de agregação molecular, e correspondem a agregados moleculares de alto peso molecular, em torno $7,0 \times 10^6$ KDa;

ix. Os antígenos PI e P8 são sensíveis a ação dos reagentes SDS e 2-mercaptoetanol, dissociando-se em seus constituintes de menor peso molecular por ação destes agentes químicos;

x. Os produtos de dissociação dos antígenos PI e P8 pela ação do SDS não perdem a capacidade de serem reconhecidos pelo soro de humanos e de cães infectados com leishmaniose visceral, sobretudo os intermediários de pesos moleculares acima de cerca 90 KDa;

xi. Os produtos de dissociação dos antígenos PI e P8 pela ação do 2-mercaptoetanol perdem completamente a capacidade de serem reconhecidos pelo soro de humanos e de cães infectados com leishmaniose visceral;

xii. A desagregação dos antígeno PI e P8 pela ação do SDS é mediada por efeitos iônicos enquanto a desagregação dos antígenos PI e P8 por ação do 2-mercaptoetanol envolve alterações covalentes na estrutura química dos antígenos;

xiii. O antígenos PI e P8 são constituídos por glicose, galactose, manose, e possivelmente por ácido siálico e/ou ácido glucorônico, açúcares fosfatados e açúcares sulfatados e/ou sulfonatados;

xiv. Os epitopos reativos dos antígenos PI e P8 são de carboidratos e são os antígenos PI e P8 antígenos conformacionais;

RESUMO.

Este trabalho baseou-se na idéia de se isolar antígenos de vacinas contra Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), armazenadas por longos períodos, (Leishvacin[®]). Estas vacinas apresentam alto grau de degradação em função dos anos de armazenamento, mas são ainda capazes de induzir proteção contra a leishmaniose tegumentar em humanos, apesar de terem sido estocadas por períodos acima de cinco anos.

Antígenos foram isolados de amostras de vacina polivalente, constituídas por cinco diferentes linhagens dermatrópicas de *Leishmania*, e de amostras de vacina monovalente constituída pela linhagem do parasito *Leishmania amazonensis*, por dois diferentes métodos de fracionamento (diálise e cromatografia). Pelo método de diálise foram isolados antígenos de quatro das cinco linhagens de *Leishmania* presentes na vacina polivalente (*Leishmania (L) amazonensis*, *Leishmania (L) mexicana*, e duas linhagens de *Leishmania major*-like). Estes antígenos são capazes de discriminar soros de indivíduos americanos e de cães infectados com a forma visceral da doença (LVA) de soros de indivíduos infectados com a forma tegumentar da doença (LTA), ou de indivíduos saudáveis. Estes antígenos foram também isolados de amostras de vacina fresca constituída por *L. amazonensis*, indicando que sua formação é independente do tempo de estocagem das vacinas. Tais antígenos são formados por fenômenos complexos de agregação molecular de pequenas moléculas, apresentando peso molecular na faixa de 10^6 KDa, tendo sido obtidos tanto no dialisado das vacinas quanto na fração não dialisada.

Por cromatografias de exclusão molecular foram isolados antígenos da fração solúvel da vacina polivalente (antígeno PI) e de vacina monovalente da linhagem

Leishmania (L) amazonensis, cepa PH8 do parasito (antígeno P8). Assim como os antígenos obtidos no dialisado e na fração não dialisável destas vacinas, PI e P8 são também antígenos formados por fenômenos de agregação molecular de pequenas moléculas, independente do tempo de armazenamento das vacinas. Estes antígenos são também especificamente reconhecidos pelo soro de humanos e de cães com LVA, mas não pelo soro de indivíduos normais ou infectados com outras formas da leishmaniose ou com outras doenças. Não há reatividade cruzada destes antígenos com soro de indivíduos com doença de Chagas, seja em ensaios de Elisa ou em ensaios de “western blot”. PI e P8 são moléculas de peso molecular na faixa de 10^6 KDa, assim como os antígenos obtidos pelo fracionamento da vacina por métodos de diálise.

Análises dos antígenos PI e P8 por métodos químicos e físicos indicam que estes antígenos não apresentam material de natureza protéica ou ácidos nucleicos na sua composição. A análise direta por métodos quantitativos confirmam a ausência de proteínas na composição dos antígenos. Por outro lado, tanto a análise por métodos químicos quanto a análise por métodos de análise quantitativos confirmam que PI e P8 são antígenos de carboidrato. PI e P8 são sensíveis ao tratamento por agentes químicos como o dodecil sulfato de sódio (SDS), 2-mercaptoetanol e o ácido periódico, sendo que os dois últimos agentes são capazes de abolir por completo a reatividade destes antígenos com o soro de humanos e de cães com LVA. Nossos estudos indicam que os três reagentes agem na estrutura destes antígenos dissociando-os em seus componentes de menor peso molecular, porém a desagregação ocorre por mecanismos distintos de acordo com o reagente utilizado. Os resultados indicam que o SDS age desestabilizando interações iônicas na estrutura dos antígenos, enquanto o 2-mercaptoetanol age, provavelmente, rompendo ligações químicas intra ou intermoleculares nos antígenos. Os resultados também indicam que o 2-

mercaptoetanol não promove o rompimento de ligações glicosídicas, sendo que a perda da capacidade dos antígenos de reagirem com os soros de indivíduos com LVA envolve alterações na conformação dos antígenos, sendo estes antígenos PI e P8 provavelmente formados por epitopos conformacionais.

Análises em eletroforese e por cromatografia de fase reversa indicam que PI e P8 são formados pela agregação de moléculas de peso molecular (PM) em torno de 2,50 KDa. Os resultados obtidos por fase reversa descartam a presença de ácidos graxos ou de lipídeos na composição química dos antígenos. Finalmente, análises por métodos de cromatografia em camada delgada confirmam que PI e P8 são antígenos de carboidrato. PI e P8 são constituídos por glicose, galactose, manose e, possivelmente, apresentam na sua composição derivados de açúcares como fosfoaçúcares, aminoaçúcares e sulfoaçúcares.

Os resultados aqui apresentados indicam que as vacinas, objeto deste estudo, sofrem alterações consideráveis em sua composição química sendo as mais relevantes: i) o alto grau de degradação de moléculas gerando moléculas de menor PM, ii) formação de antígenos de alto PM por fenômenos de agregação molecular, ii) o reconhecimento destes antígenos por soro de indivíduos com LVA mas não por soro de indivíduos com LTA, iv) o fato destes antígenos agregados serem essencialmente constituídos de carboidrato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ADLER, S., *Leishmania*. In: Daves B. (Ed.): **ADVANCES IN PARASITOLOGY**. New York. Academic Press, 2: 35 (1964).

AFONSO, L. C., TAVARES, C. A. P., RUNJANECK, F. D., MARES-GUIA, M. L., COSTA, C. A., MICHALICK, M. S., MELO, M. N., MAYRINK, W. Utilization of protein fractions from a vaccine against leishmaniasis in the vaccination of C57BL/10 mice. **MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ**, 80: 138 (1986).

AFONSO, L. C. & SCOTT, P., Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **INFECTION AND IMMUNITY** 61(7): 2952 (1993).

ALEXANDER, J., ABHAY, R. S. RUSSE, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **JOURNAL OF CELL SCIENCE** 112: 2993-3002 (1999).

AMBROISE-THOMAS, P. Parasitic diseases and immunodeficiencies. **PARASITOLOGY** 122 Suppl: S65-S71 (2001).

ANAN, K., FARHAR, A., DWIJADAS, B., NETAI, P., SUBHASIS, K. G., RAMA, G. P., SHIBEN, S. K., ALI, N., Differential Decline in *Leishmania* Membrane Antigen-Specific Immunoglobulin G (IgG), IgM, IgE, and Subclass Antibodies in Indian Kala-Azar Patients after Chemotherapy. **INFECTION AND IMMUNITY** 67(12): 6663-6669 (1999).

ANTUNES, C. M. F., MAYRINK, W., MAGALHÃES, P. A., COSTA, C. A., MELO, M. N., DIAS, M., MICHALICK, M. S. M., WILLIANS, P., LIMA, A. O., VIEIRA, J. B. F., SCHETTINI, A. P. F. Controlled field trials of a vaccine against New World Cutaneous Leishmaniasis. **INTERNATIONAL JOURNAL OF EPIDEMIOLOGY** 15(4): 572 (1986).

ARAÚJO, F. G. & MAYRINK, W. Fluorescent antibody test in visceral leishmaniasis. II. Studies on the specificity of the test. **REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO** 10(1): 41-45 (1968).

ATTAR, J. Z., CHANCE, M. L., EL-SAFI, S., CARNEY, J., AZAZY, A., EL-HADI, M., DOURADO, C., HEMMEL, M. Latex agglutination test for detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. **ACTA TROPICA** 78: 11-16 (2001).

BADARÓ, R., BENSON, D., EULÁLIO, M. C., FREIRE, M., CUNHA, S., NETO, E. M., PEDRAL-SAMPAIO, D., MADUREIRA, C., BURNS, J. M., HOUGHTON, R. L., DAVID, J. R., REED, S. D. rK39: A cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES** 173: 758-763 (1996).

BADARÓ, R., FALCOFF, F., BADARÓ, F. S., CARVALHO, E. M., PEDRAL-SAMPAIO, D., CARVALHO, J. S., BARRAL-NETO, M., BRANDELY, M., SILVA, L., BINA, J. C., TEIXEIRA, R., FALCOFF, R., ROCHA, H., HO, J. L., JOHNSON, W. D. Jr. Treatment of visceral leishmaniasis with pentavalente antimony and interferon gamma. **NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE** 322 (1): 16-21 (1990).

BALDELLI, B., Serological diagnosis of human leishmaniasis by ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). **PARASSITOLOGIA** 20(1-3): 91-99 (1978).

BARRECA, G. S., MATERA, G., DE-MAJO, MASSIMO., LAMBERTI, A., LIBERTO, M. C., FOCÁ, A. early detection of *Leishmania* promastigotes in dog bone marrow culture by acridine orange. **DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES** 37: 247-251 (2001).

BERMAN, J. D. Chemotherapy for Leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. **REVIEWS OF INFECTIOUS DISEASES** 10(3): 560-585 (1988).

BEVERLEY, M. S. & TURCO, J. S., Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite *Leishmania*. **TRENDS IN MICROBIOLOGY** 6(1): 35-40 (1998).

- BLAXTER, M. L., MILLES, M. A., KELLY, J. M. Specific serodiagnosis of visceral leishmaniasis using a *Leishmania donovani* antigen identified by expression cloning. **MOLECULAR BIOCHEMICAL PARASITOLOGY** 30(3): (1998).
- BOURREAU, E., PREVOT, G., PRADINAUD, R., LAUNOIS, P. Unresponsiveness of specific T cells to IL-12 associated with active cutaneous leishmaniasis owing to *Leishmania guyanensis*. **SCANDINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY** 54(3): 335-339 (2001).
- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY** 72: 248 (1976).
- BRAY, R. S. & LAINSON, R. The immunology and serology of leishmaniasis. I. The fluorescent antibody staining technique. **TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE** 5: 535-544. (1965).
- BRENIER-PINCHART, M. P., PELLOUX, H., DEROUICH-GREGOUR, D., AMBROISE-THOMAS, P. Chemokines in host-protozoan-parasite infections. **TRENDS IN PARASITOLOGY** 17(6): 292-296 (2001).

BRITO, M. E. F., MENDONÇA, M. G., GOMES, Y. M., JARDIM, M. L. ABATH, F. G.

C. Identification of potentially diagnostic *Leishmania brasiliensis* antigens in Human Cutaneous Leishmaniasis immunoblot assays. **CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY** 7(2): 318-321 (2000).

BURNS, J. M., SHREFFLER, W. G., BENSON, D. R., GHALIB, H. W., BADARÓ, R.,

REED, S. G. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody of African and American visceral leishmaniasis. **PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY SCIENCES (USA)** 90: 775-779 (1993).

CABRERA, G. P. B., DA-SILVA, V. O., DA-COSTA, T. R., REIS, A. B., MAYRINK,

W., GENARO, O., PALATNIK-DE SOUZA, C. B. The fucose-mannose ligand-Elisa in the diagnosis and prognosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. **AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE** 61(5): 296-301 (1999).

CARDENOSA, N., RIERA, C., CORTÉS, P., MARCH, F., MUNHOZ, C., PORTÚS, M.,

PRATS, G., Detection and characterization by immunoblot analysis of potentially diagnostic *Leishmania infantum* polypeptides in human visceral leishmaniasis. **PARASITE IMMUNOLOGY** 17: 509 (1995).

CARVALHO, E. M., BADARÓ, R., REED, S. G., JOHNSON, W. D., JONES, T. C.

Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. **JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION** 76: 2066 (1985).

CARVALHO, P. B., ARRIBAS, M. A. C., FERREIRA, E. I. Leishmaniasis. What do we now about its chemotherapy. **REVISTA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS** 36(1): 79-96 (2000).

CHATELAIN, R., VARKILA, K., COFFMAM, R. L. IL-4 induces a Th2 responses in *Leishmania major* infected mice. **JOURNAL OF IMMUNOLOGY** 148: 1182 (1992)

COHEN, S. A. & STRYDON D. J. Amino acid analysis utilizing phenylisothiocyanate derivatives. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY** 174 (1) 1-16 1988.

CONVIT, J., PINARDI, M. E., RANDON, A. Diffuse cutaneous leishmaniasis: A disease due to an immunological defect of the host. **TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE**. 66: 603 (1972).

COSTA. C. A., AFONSO, L. C. C., TOLEDO, V. P. C. P., GUIMARÃES, T. M. P. D., NASCIMENTO, E., TAVARES, C. A. P. MAYRINK. W. Immune responses and protection induced in mice by an industrialized vaccine against American cutaneous leishmaniasis. **PARASSITOLOGIA** 34: 45 (1992).

COSTA, C. A., TOLEDO, V. P. C. P., GENARO, O., WILLIANS, P., MAYRINK, W. Montenegro Skin Test- evaluation of the composition and stability of the antigen preparation. **MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ** 91: 193-194 (1996).

COUTINHO, S. C., PRIMEZ, C., MENDONÇA, S. C. F. CONCEIÇÃO-SILVA, F.,
DOREA, R. C. Pathogenesis and immunopathology of leishmaniasis. **MEMÓRIAS
DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ** 82: 214.

DA-SILVA, O. V., BORJA-CABRERA, G. P., PONTES, N. N. C., DE-SOUZA, E. P.,
LUZ, K. G., PALATNIK, M., PALATNIK-DE-SOUZA, C. B. A phase III trial of
efficacy of the FML-vaccine against canine Kala-Azar in a endemic area of Brazil (São
Gonçalo do Amaranto, RN). **VACCINE** 19: 1082-1092 (2001)

DA-SILVA, R & SACKS, D. L., Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania*
promastigotes virulence and attenuation. **INFECTIOUS IMMUNOLOGY** 55: 2802
(1987).

DAVIDSON, R. N. Practical guide for the treatment of Leishmaniasis. **DRUGS** 56: 1009-
1018 (1998).

DECKER-JACKSON, J. E. & HONIGBERG, B. N., Glycoproteins released by *Leishmania*
donovani: Immunological relationships with host and bacterial antigens and
preliminary biochemical analysis. **JOURNAL OF PROTOZOOLOGY**. 25: 514-525
(1978).

DEL REY, C. J. Study of the indirect Immunofluorescence test in leishmaniasis.
REVISTA DE CLÍNICA ESPANHOLA 102(5): 365-370 (1966).

DESJEUX, P., Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. **WORLD HEALTH STAT. QUARTELY** 45(2-3): 267 (1992).

DORAN, T. I. & HERMAN, R. Characterization of populations of promastigotes of *Leishmania donovani*. **JOURNAL OF PROTOZOLOGY** 28: 245 (1981).

DUBBOIS, M., GILLES, K. A., REBERS, P. A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **ANALYTICAL CHEMISTRY** 28: 350 (1956).

DURANTI, M. A., FRANZONI, L., SARTOR, G., BENEDETTI, A., IWAI, L. K., GRUBER, A., ZINGALES, B., GUZMAN, F., KALIL, J., SPISNI, A., CUNHANETO, E. *Trypanosoma cruzi*: conformational preferences of antigenic peptides bearing the immunodominant epitope of the B13 antigen. **EXPERIMENTAL PARASITOLOGY** 93: 38-44 1999.

EDRISSIAN, G. H., & DARABIAN, P., A comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescence antibody test in the sero-diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis in Iran. **TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE** 73(3): 289 (1979).

EL ON, J., SCHNUR, L. F. Purification and preliminary characterization of leishmanial excreted factor (EF). **ISRAELY JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES** 8: 932 (1972).

EL ON, J., SCHNUR, L. F., GREENBLAT, C. L. *Leishmania donovani*: Physiochemical, immunological and biological characterization of excreted factor from promastigotes.

EXPERIMENTAL PARASITOLOGY 47: 254-269 (1979).

ENGWERDA, C., MURHY, M. L., COTTERELL, S. E., SMELT, S. C., KAYE, P. E.

Neutralization of IL-12 demonstrates the existence of discrete organ-specific phases in the control of *Leishmania donovani*. **EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY**

28(2): 669 (1998).

FAIRBANKS, G., STECK, T. L., WALLACH, D. F. H. Electrophoretic analysis of the

major polypeptides of the human erythrocyte membrane. **BIOCHEMISTRY** 10(13):

2606-2617 (1971).

FERNANDES, A. P., CARVALHO, F. A. A., TAVARES, C. A. P., SANTIAGO, H. C.,

CASTRO, G. A., TAFURI, W. L., FERREIRA, L. A. M., GAZZINELLI, R. T.

Combined interleukin-12 and topical chemotherapy for established leishmaniasis drastically reduces tissue parasitism and relapses in susceptible mice. **THE**

JOURNAL INFECTIOUS DISEASES 183: 1646-1652 (2001)

FRANKE, G. D., MCGREEVY, P. B., KATZ, S. P., SACKS, D. L. Growth cycle

dependent generation of complement resistant *Leishmania* promastigotes. **JOURNAL**

OF IMMUNOLOGY 134: 2713 (1985).

- FRANKENBURG, S., AXELROD, K. S., GREENBLAT, C. L., KLAUS, S. N., PIRAK, E. A., MCMASTER, R., LOWEL, G. H. Effective immunization of mice against cutaneous leishmaniasis using intrinsically adjuvanted synthetic lipopeptide vaccine. **VACCINE** 14(9): 923 (1996).
- GABAGLIA, C. R., PEDERSEN, B., HITT, M., BURDIN, N., SERCARZ, E. E., GRAHAN, F. L., GAUDIE, J., BRACIAK, T. A. A single intramuscular injection with adenovirus-expressing IL-12 protects BALB/c mice against *Leishmania major* infection, while treatment with an IL-4-expressing vector increases disease susceptibility in B10.D2 mice. **JOURNAL OF IMMUNOLOGY** 162(2): 753 (1999).
- GARCIA-MISS, M. R., NARVAEZ, F. J., ESQUIVEL-VINAS, R. E., SIMMONDS-DIAS, E. B., CANTO-LARA, S. B., CRUZ-RUIZ, A. L. Localized cutaneous leishmaniasis (chiclero's-ulcer) in Mexico: sensitivity and specificity of ELISA for IgG antibodies) to *Leishmania mexicana mexicana*. **TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE** 84(3): 356 (1990).
- GENARO, O, TOLEDO, V. P. C. P., COSTA, C. A., HERMETO, M. V., AFONSO, L. C. C., MAYRINK, W. Vaccine for prophylaxis and immunotherapy, Brazil. **CLINICS IN DERMATOLOGY** 14: 503-512 (1996).
- GORAK, P. M. A., ENGWERDA, C. R., KAYE, P. M. Dendritic cells, but not macrophage, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. **EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY** 28: 687-695 (1998).

- GRADONI L. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. **VETERINARY PARASITOLOGY** 100: 87-103 (2001).
- GHALIB, H. W., WHITTLE, J. A., KUBIN, M., HASHIN, F. A., EL-HASSAN, A. M., TRINCHIERI, G., REED, S. G. IL-12 enhances Th1 type responses in human *Leishmania donovani* infections. **JOURNAL OF IMMUNOLOGY** 154: 4623 (1995).
- GREEN, S. J., CRAWFORD, R. M., HOCKMEYER, J. T., MELTZER, M. S., NACY, C. A. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulate macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. **JOURNAL OF IMMUNOLOGY** 145: 4290 (1990).
- GROGL, L., FRANKE, E. D., MCGREEVY, P. B., KHUN, R. E. *Leishmania brasiliensis*: Protein, carbohydrate and antigen differences between log-phase and stationary-phase promastigotes in vitro. **EXPERIMENTAL PARASITOLOGY** 63: 352 (1987).
- GUIMARÃES, T. M. P. D., TOLEDO, V. P. C. P., COSTA, C. A., COSTA, R. T., GENARO, O., WILLIAMS, P., MAYRINK, W. Assessment of immunity induced in mice by glycoproteins derived from different strains and species of *Leishmania*. **MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ** 91(1): 63 (1996).
- GURUNATHAN, S., PRUSSIAN, C. SEDER, R. A. Vaccine requirements for sustained cellular immunity to an intracellular parasitic infection. **NATURE MEDICINE** 4(12): 1409 (1998).

HANDMAN, E., MITCHEL, G. F., GODING, J. W. *Leishmania major*: a very sensitive dot-blot ELISA for detection of parasites in cutaneous lesions. **MOLECULAR AND BIOLOGICAL MEDICINE** 4(6): 377 (1987).

HERMAN, R. Fluorescent antibody studies on the intracellular form of *Leishmania donovani* grown in cell culture. **EXPERIMENTAL PARASITOLOGY** 17(2): 218-228 (1965).

HEWITT, M. C. & SEEBERGER, P. H. Solution and solid-support synthesis of a potential *Leishmaniasis* carbohydrate vaccine. **JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY** 66: 4233-4243 (2001).

HOWARD, G., HALE, C., LIEW, F. Y. Immunological regulation of experimental leishmaniasis. III. Nature and significance of specific suppression of cell-mediated immunity in mice highly susceptible to *Leishmania tropica*. **JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE** 152: 594 (1980).

HOWARD, G., HALE, C., LIEW, F. Y. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis IV: Prophylactic effect of sublethal irradiation as a result of abrogation of T cell generation in mice genetically susceptible to *Leishmania tropica*. **JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE** 153(3): 557 (1981).

HOWARD, M. K., SAYERS, G., MILLES, M. A. *Leishmania donovani* metacyclic promastigotes : Transformation in vitro , lecithin agglutination, complement resistance in infectivity. **EXPERIMENTAL PARASITOLOGY** 64: 147 (1987).

HEINZEL, F. P., SADICK, M. D., MUTHA, S. S., LOCKSLEY, R. M. Production of interferon gamma, interleukin-2, interleukin-4 and interleukin-10 by CD4+ lymphocytes in vivo during healing and progressive leishmaniasis. **PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY SCIENCES (USA)** 88: 7011 (1991).

HOMMANS, S. W., MELHERT, A., TURCO, S. Solution structure of lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*. **BIOCHEMISTRY** 31:654 (1992).

ILG, T., CRAYK, D., CURRIE, G., MURTHAULP, G., BACIC, A. Stage-specific proteophosphoglycan from *Leishmania mexicana* amastigotes. Structural characterization of novel mono-, di- and triphosphorylated phosphodiester-linked oligosaccharides. **JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY** 273(22): 13509-13523 (1998).

ILG, T., ETGES, R., OVERATH, P., MCCONVILLE, M. J., THOMAS-OATES, J., THOMAS, J., HOMMANS, S. W., FERGUSON, M. A. Structure of *Leishmania mexicana*. **JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY** 267(5): 6834 (1992).

JAFFE, C. L. & GREENBLAT, C. L. Vaccine development against the intracellular parasite *Leishmania*. In: Vaccines and Immunotherapy. Stanley J. Crys Jr (Ed). Director Research and Production Swiss Serum and Vaccine Institute. Berne. Switzerland. Pergamon Press (1991).

JAFFE, C. L., RACHAMIN, N., SARFSTEIN, R. Characterization of two proteins from *Leishmania donovani* and their use for vaccination against visceral leishmaniasis **JOURNAL OF IMMUNOLOGY** 144(2): 699 (1990).

JARDIM, A., TOLSON, D. L., TURCO, S. J., PEARSON, T. W., OLAFSON, R. W. The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan T lymphocyte-reactive component is a tightly associated protein complex. **JOURNAL OF IMMUNOLOGY** 147(10): 3538 (1991).

JAMES, S. L., & NACY, C. Effector functions of activated macrophages against parasites. **CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY** 5(4): 518 (1993).

JENSEN, A. T., GASIN, S., ISMAIL, A., GAAFAR, A., KURTZHALS, J. A., KEMP, M., EL HASSAM, A. M., KHARASMI, A. THEANDER, T. G. humoral and cellular immune responses to synthetic peptides of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11. **SCANDINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY** 48(1): 103 (1998).

KALTER, D. C. Laboratory tests for the diagnosis and evaluation of leishmaniasis.

DERMATOLOGY CLINICAL 12(1): 37-50 (1994).

KAMHAWI, S., BELKAID, Y., MODI, G., ROWTON, E., SACKS, D. Protection against

cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. **SCIENCE**

290(17): 1351-1354 (2000).

KELLEHER, M., BACIC, A., HANDMAN, E. Identification of a macrophage binding on

lipophosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes **PROCEEDINGS OF THE**

NATIONAL ACADEMY SCIENCES (USA) 89(1): 6 (1992).

KEMP, M., THEANDER, T. G., HANDMAN, E., HEY, A. S., KURTZHALS, J. A.,

HVIID, L., SORENSEN, A. L., WERE, J. O., KOECH, D. K., KHARASMI, A.

Activation of human lymphocytes by lipophosphoglycan **SCANDINAVIAN**

JOURNAL OF IMMUNOLOGY 33(2): 219 (1991).

KHALIL, E. A. G., ZIJLSTRA, E. E., MUKTAR, M. M., GHALIB, H. W., MUSA, B.,

IBRAHIN, M. E., KAMIL, A. A., ELSHEIKH, M., BABIKER, A., MODABBER, F.

Autoclaved *Leishmania major* vaccine for prevention of visceral leishmaniasis: a

randomized, double-blind, BCG-controlled trial in Sudan. **LANCET** 356: 1565-1569

(2000).

KING, D. D. L., CHANG, Y. D., TURCO, S. J. Cell surface lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*. **MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY** 24: 47 (1987).

KOOP, D. R., MORGAN, E. T., TARR, G. E., COON, M. J. Purification and characterization of a unique isozyme of cytochrome P-450 from liver microsomes of ethanol-treated rabbits **JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY** 257: 25 (1982).

LAEMLY, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. **NATURE** 227: 680 (1970).

LAINSON, R., & DIXON-STRANGWAYS, J. *Leishmania mexicana*: The epidemiology of dermal leishmaniasis in British Honduras. **TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICIN AND HYGIENE** 57: 242 (1963).

LIEW, F. Y., HALE, C., HOWARD, J. G. Immunologic regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. V. Characterization of effector and specific suppressor T cells. **JOURNAL OF IMMUNOLOGY** 128: 1917 (1982).

LIEW, F. Y. & O'DONNELL, C. A. Immunology of leishmaniasis. **ADVANCES IN PARASITOLOGY** 32:161 (1993).

- LOCKSLEY, R. M. & SCOTT, P. Helper T cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function **IMMUNOPARASITOLOGY TODAY** 12(3): A54 (1991).
- LOPES-LARRAZA, D. M., JR, K. M., DEDON, P. C. Thiols alter partitioning of calicheamicin-induced deoxyribose 4'-oxidation reactions in the absence of DNA radical pair. **CHEMICAL RESEARCH IN TOXICOLOGY** 14: 528-535 (2001).
- LOPEZ-VELEZ, R., TURIENTES, M. C., GOMEZ-MANPAZO, E. Serologic cross-reactions to *Leishmania infantum* using indirect Immunofluorescence in HIV⁺ and HIV⁻ patients with active tuberculosis. **ENFERMIDAD INFECCIOZA Y MICROBIOLOGIA CLINICA** 16(3): 130-131 (1998).
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N., FARR, A. L., RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent **JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY** 193: 265 (1951).
- LUZZIO, A. J., MCROBERTS, M. J. EULISS, N. H. Quantitative estimation of leishmanial titers by enzyme-linked immunosorbent assay. **JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES**. 140(3): (1979).
- LYNDEN, J. R., HANDMAN, E., FOOTE, S. J. Science, medicine and future. Leishmaniasis. **BIOMOLECULAR JOURNAL** 321: 804 (2000).

MARTIN, S. K., THUITA-HARUN, L., ADOYO-ADOYO, M., WASUNNA, K. M. A diagnostic ELISA for visceral leishmaniasis, based on antigen from media conditioned by *Leishmania donovani* promastigotes **ANNALS OF TROPICAL MEDICINE AND PARASITOLOGY**. 92(5) 571-577 (1998).

MAYRINK, W., ANTUNES, C. F., COSTA, C. A., MELO, M. N., DIAS, M., MICHALICK, M. S. M., OLIVEIRA-LIMA, A., WILLIANS, P. Further trials of a vaccine against American Cutaneous leishmaniasis. **TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE** 80:1001 (1986).

MAYRINK, W., ARAÚJO, F. G., MAGALHÃES, P. A. Fluorescent antibody test in visceral leishmaniasis. I. Sensitivity of the test. **REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA DE SÃO PAULO** 9(3): 172-174 1967).

MAYRINK, W., COSTA, C. A., MAGALHÃES, A. P., MELO, M. N., DIAS, M., OLIVEIRA-LIMA, A., MICHALICK, M. S. M., WILLIANS, P. A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis. **TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE** 73: 385 (1979).

MAYRINK, W., MAGALHÃES, A. P., DIAS, M., COSTA, C. A., MELO, M. N., OLIVEIRA-LIMA, A., Responses to Montenegro antigen after immunization with killed *Leishmania* promastigotes. **TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE** 72: 676 (1978).

MAYRINK, W., MAGALHÃES, A. P., MICHALICK, M. S. M., COSTA, C. A., OLIVEIRA-LIMA, A., MELO, M. N., TOLEDO, V. P. C. P., NASCIMENTO, E., DIAS, M., HERMETO, M. V., WILLIANS, P. Immunotherapy as a treatment of American Cutaneous Leishmaniasis: Preliminary studies in Brazil. **PARASSITOLOGIA**, 34: 159-165 (1992).

MAYRINK, W., MAGALHÃES, A. P., RESENDE, F. S., COSTA, C. A., MELO, M. N., MICHALICK, M. S. M., WILLIANS, P., OLIVEIRA-LIMA, A., NASCIMENTO, E., GENARO, O., TOLEDO, V. P. C. P., SILVEIRA, F. T., HERMETO, M. V. Prophylactic vaccination against Cutaneous Leishmaniasis in Brazil. Meeting on Vaccines Against Leishmaniasis, Belo Horizonte, MG. pp 45 (1990).

MAYRINK, W., SILVEIRA, F. T., COSTA, A., GENARO, O., TOLEDO, V. P. C. P., HERMETO, M. V., MICHALICK, M. S. M., DIAS, M. N., MELO, M. N. Immunotherapy for patients with Diffuse Cutaneous Leishmaniasis. **MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ** 87: 188 (1992).

MAYRINK, W, MICHALICK, M. S. M., MELO, M. N. MAGALHÃES, A. P., COSTA, C. A., OLIVEIRA-LIMA, A., TOLEDO, V. P. C. P., NASCIMENTO, E., DIAS, M., HERMETO, M. V., WILLIANS, P. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana utilizando vacina. **ANAIS BRASILEIROS DE DERMATOLOGIA** 66: 65-69 (1991).

MAYRINK, W., WILLIAMS, P., COSTA, C. A., MAGALHÃES, A. P., MELO, M. N., DIAS, M., OLIVEIRA-LIMA, A., MICHALICK, M. S. M., FERREIRA-CARVALHO, E., BARROS, G C., SESSA, P. A., ALENCAR, J. T. An experimental vaccine against American dermal leishmaniasis: experiences in the State of Espírito Santo, Brazil. **ANNALS OF TROPICAL MEDICINE AND PARASITOLOGY** 79(3): 259 (1985).

MCCONVILLE, M. J., THOMAS-OATES, J. E., FERGUSON, M. A. J., HOMANS, S. W. Structure of the lipophosphoglycan from *Leishmania major*. **JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY** 265: 19611 (1990).

MELANDER, M & VUORINEM T. Determination of the degree of polymerization of carboxymethylcellulose by size exclusion chromatography. **CARBOHYDRATE POLYMERS** 46: 227-233 (2001).

MENDONÇA, S. C., DE-LUCA, P. M., OLAFSON, R. W., JARDIM, A., COUTINHO, S. G. Does lipophosphoglycan enhance the T cell-stimulatory activity of lipophosphoglycan-associated proteins. **BRAZILIAN JOURNAL OF MEDICAL AND BIOLOGY RESEARCH** 27(2): 553 (1994).

MENDONÇA, S. C., RUSSEL, D. G., COUTINHO, S. G. Analysis of the human T cell responsiveness to purified antigens of *Leishmania*: lipophosphoglycan (LPG) and glycoprotein 63 (gp63). **CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE** 83(3): 472 (1991).

MENGELING, B. J. & TURCO, S. G. Microbial Glycoconjugates. **CURRENT OPINION IN STRUCTURAL BIOLOGY** 8(5): (1998).

MILON, G., TITUS, R. G., CEROTTINE, J. C., MARCHAL, G., LOUIS, G. A. Higher frequency of *Leishmania major*-specific L3T4+ T cells in susceptible mouse BALB/c mice as compared of CBA mice. **JOURNAL OF IMMUNOLOGY** 136(4): 1467 (1986).

MITCHEL, G. F., CURTIS, J. M., HANDMAN, E., MACKENZIE, I. F. C. Cutaneous leishmaniasis in mice: disease pattern in reconstituted nude mice of several genotypes infected with *Leishmania tropica*. **AUSTRALIAN JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICAL SCIENCES** 58: 521 (1980).

MITCHEL, G. F., & HANDMAN, E. The glycoconjugate derived from a *Leishmania major* receptor for macrophages is a suppressogenic, disease-promoting antigen in murine cutaneous leishmaniasis. **PARASITE IMMUNOLOGY** 8: 255 (1986).

MISRA, A., DUBE, A., SRIVASTAVA, B., SHARMA, P., SRIVASTAVA, J. K., KATIYAR, J. C., NAIK, S. Successful vaccination against *Leishmania donovani* infection in Indian langur using alum-precipitated autoclaved *Leishmania major* with BCG. **VACCINE** 19: 3485-3492 (2001).

MODDABER, F. Development of vaccines against leishmaniasis. **SCANDINAVIAN JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES SUPPL.** 76: 72 (1990).

MOHAMMED, E. A., WRIGHT, E. P., KAGER, P. A., LAARMAN, J.J., PONDMAM, K.

W. ELISA using intact promastigotes for immunodiagnosis of Kala-Azar.

TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE 79(3): 344 (1985).

MOLL, H. & SCOLLAY, R. L3T4+ T cells promoting susceptibility to murine cutaneous

leishmaniasis express the surface marker LY-24 (Pgp-1). **EUROPEAN JOURNAL**

OF IMMUNOLOGY 19(2): 307 (1989).

MONJOUR, L., MONJOUR, E., VOULDOUKIS, I., OGUNKOLADE, B. W.,

FROMMEL, D. Protective immunity against cutaneous leishmaniasis achieved by

partly purified vaccine in a volunteer. **LANCET** 8496: 1490 (1986 a).

MONJOUR, L., OGUNKOLADE, B. W., VOULDOUKIS, I., BERNEMAN, A.,

FROMMEL, D. Immunoprophylaxis against *Leishmania* infections with semi-purified antigen. **TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL**

MEDICINE AND HYGIENE 80(6): (1986 b).

MONJOUR, L., SILVA, O. A., VOULDOUKIS, I., NEOGY, A. B., BRITO, M. E.,

FILHO, S. P., JARDIM, M. L. Immunoprophylaxis in cutaneous leishmaniasis.

LANCET 340(8827): (1992).

MONTOYA, Y., LEON, C., TALLEDO, M., NOLASCO, O., PADILHA, C., MUNHOZ-NAJAR, U., BAKER, D. C. Recombinant antigens for specific and sensitive serodiagnosis of Latin American Tegumentary Leishmaniasis. **TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE** 91(6): 674-676 (1997).

MOORE, K. W., O'GARRA, A., WALL MALEFYT, R., VIEIRA, P., MOSMANN, T. R. Interleukin 10. **ANNALS OF VETERINARY AND IMMUNOLOGY** 11:165 (1993).

MOSMAN, T. R. & COFFMAN, R. L. Th1 and th2 cells: different patterns of lymphokines secretion lead to different functional properties. **ANNALS OF VETERINARY AND IMMUNOLOGY** 7:145 (1989).

MOSSER, D. M. & ROSENTHAL, L. A. Leishmania-macrophage interaction: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. **SEMINARY OF CELLULAR BIOLOGY** 4(5): 315 (1993).

MURRAY, H. W., RUBIN, B. Y., ROTHERMEL, T. D. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon gamma is the activating lymphokine. **JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION** 72:1506 (1983).

MURRAY, H. W., STEIN, J., WELT, K. Experimental visceral leishmaniasis: production of interleukin-2 and gamma interferon **JOURNAL OF IMMUNOLOGY** 1348: 2290 (1987).

NASCIMENTO, E., MAYRINK, W., COSTA, C. A., MICHALICK, M. S. M., MELO, M. N., BARROS, G. C., DIAS, M., ANTUNES, C. M. F., LIMA, M. S., TABOADA, D. C., LIU, T. Y., Vaccination of Humans against Cutaneous Leishmaniasis: Cellular and Humoral Response. **INFECTION AND IMMUNITY** 58(7): 2198 (1990).

NISHIKOMORI, R., GURUNATHAN, S., NISHIKOMORI, K., STROBER, W., BALB/c mice bearing a transgenic IL-12 receptor b gene exhibit a nonhealing phenotype to *Leishmania major* infection despite intact IL-12 signaling. **JOURNAL OF IMMUNOLOGY** 166(11): 6776-6783 (2001).

NOORMOHAMADI, A. H., HOCHREIN, H., CURTIS, J. M., BALDWIN, T. M., HANDMAN, E. Paradoxical effects of IL-12 in leishmaniasis in the presence and absence of vaccinating antigen. **VACCINE** 19: 4043-4052 (2001).

O'GARRA, A. & MURPHY, K. Role cytokines in determining T lymphocyte function. **CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY** 6(3): 1458 (1994).

OKLAY, B. R., KIRSCH, D. R., MORRIS, N. R. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY** 105: 361-363 (1980).

ORLANDI, P. A. & TURCO, S. J. Structure of the lipid moiety of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. **JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY** 262: 10384 (1987).

PALATNIK, C. B., BOROJEVIC, R., PREVIATO, J. O., MENDONÇA-PREVIATO, L. Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote internalization into murine macrophages by chemically defined parasite glycoconjugate ligands. **INFECTION AND IMMUNITY** 57(3): 754-763 (1989).

PALATNIK-DE-SOUZA, C. B., GOMES, E. M., PARAGUAI-DE-SOUZA, E., PALATNIK, M., LUZ, K., BOROJEVIC, R. *Leishmania donovani*: titration of antibodies to the fucose-mannose ligand as an aid in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. **TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE** 89: 390-393 (1995).

PAPADOPOULOU, G., KARAGOUNI, E., DOTSIKA, E. ISCOMs vaccine against experimental leishmaniasis. **VACCINE** 16(9-10): 885 (1998).

PAPPAS, C., TARANTILIS, P. A., DALIANI, I., MAVROMOUSTAKOS, T., POLISSIOU, M. Comparison of classical and ultrasound-assisted isolation procedures of cellulose from kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) and (*Eucalyptus rodustrus* Sm.). **ULTRASONICS SONOCHEMISTRY** 9: 19-23 (2002).

PATEL, A. & LINDHORST, T. K. A modular approach for the synthesis of oligosaccharide mimetics. **JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY** 66: 2674-2680 (2001).

PEARSON, R. D., WHEELER, D. A., HARRISON, L. W., KAY, H. D. The immunology of leishmaniasis. **INFECTIOUS DISEASES**. 5: 907 (1983).

PESSÔA, S. B. & PESTANA, B. R. Ensaio sobre vacinação preventiva na leishmaniose tegumentar americana, com gérmens mortos. **REVISTA DE BIOLOGIA E HIGIENE** 10: 112 (1940).

PETERS, W. & KIILICK-KENDRICK, R. (Eds.): The Leishmaniasis in Biology and Medicine. London. Academic Press. Vols. 1, 2. pp 941 (1987).

PETIT, M. C., ORLEWSKI, P. TSIKARIS, V. SAKARELLOS-DAITSIOTIS, M., SAKARELLOS, C., TZINIA, A., KONIDOU, G., SOTERIADOU, K. P., MARRAUD, M., CUNG, M. T. Solution structures of the fibronectin-like *Leishmania* gp63 SRYD-containing sequence in free and antibody-bound states-transferred NOE and molecular dynamics studies. **EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY** 253(1): 184 (1998).

PIARROUX, R., GAMBARELLI, F., DUMON, H., FONTES, M., DUNAN, S., MARY, C., TOGA, B., QUILICI, M. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompromised patients. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY** 32(3): 746 (1994).

PIMENTA, P. F. P., SARAIVA, E. E. B., SACKS, D. L. The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. **EXPERIMENTAL PARASITOLOGY** 72: 191 (1991).

PINTADO, V., MARTÍN-RABADÁN, P., RIVERA, M. L., MORENO, S., BOUZA, E. Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected patients. **MEDICINE** 80: 54-73 (2001).

PRICE, S. M. & SILVERS, D. N. New World leishmaniasis. Serological aids to diagnosis. **ARCHIVES OF DERMATOLOGY** 113(10): 1415 (1977).

PUENTES, F., GUAMÁN, F., MARÍN, V., ALONSO, C., PATARROYO, M. E., MORENO, A. *Leishmania*: fine mapping of the leishmanolysin molecule's conserved core domains involved in binding and internalization. **EXPERIMENTAL PARASITOLOGY** 93: 7-22 (1999).

PUENTES, S. M., SACKS, D. L., JOINER, K. A. Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. **JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE** 167: 887 (1988).

RAY, R & GHOSE, A. C. Somatic and excretory polysaccharide antigens of *Leishmania donovani*. **AUSTRALIAN JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICAL SCIENCES** 63(4): 441-422 (1985).

QUILICI, M., DUNAN, S., RANQUE, J. Immunofluorescence technique in leishmaniasis. Comparison with complement fixation tests. **MEDICINE TROPICAL** (Mars) 28(1): 37-43 (1968).

REED, S. G., WHREFFLER, W. G., BURNS, J. M., SCOTT, J.M., ORGE, M. G., GHALIB, H. W., SIDDIG, M., BADARÓ, R. An improved serodiagnostic procedure for visceral leishmaniasis. **AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE** 43(6): 632 (1990).

QUINONES, M., AHUJA, K. S., MELBY, P. C., PATE, L. REDDICK, R. L., AHUJA, S. S. Preformed membrane-associated stores of interleukin (IL)-12 are a previously unrecognized source of bioactive IL-12 that is mobilized within minutes of contact with intracellular parasite. **JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE** 192(4): 507-515 (2000).

RAJASEKARIAH, G. H. R., RYAN, J. R., HILLIER, S. R. YI, L. P., STITELER, J. M., CUI, L., SMITHYMAN, A. M., MARTIN, S. K. Optimization of an ELISA for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis using in vitro derived promastigote antigens. **JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS** 252: 105-119 (2001).

REED, S. G., BARRAL-NETO, M., INVERSO, J. A. Treatment of experimental visceral leishmaniasis with lymphokines encapsulated in liposomes **JOURNAL OF IMMUNOLOGY** 132(6): 3116 (1984).

REED, S. G. & SCOTT, P. T cell and cytokine responses in leishmaniasis. **CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY** 5(4): 524 (1993).

REZAI, H. R., BEHFOROZ, N., AMIRHAKIMI, G. H., KOHANTEB, J. Immunofluorescence and counter immunoelectrophoresis in the diagnostic of Kala-Azar. **TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE** 71(2): 149 (1977).

REGALADO, A. M., COSTA, C. A. DA., MAYRINK, W. Vaccination of C57BL / 10 mice against cutaneous leishmaniasis by semi-purified antigens from *L. (L) amazonensis*. **MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ** 87(1): 181 (1992).

ROCKEN, M., HUNT, L. A., WEBSTER, R. G. A common precursor for CD4⁺ T cells producing Il-2 or Il-4. **JOURNAL OF IMMUNOLOGY** 148(4): 1031 (1992).

ROMERO, G. A. S., GUERRA, M. V. F., PAES, M. G., CUPOLILLO, E., TOALDO, C. B., MACÊDO, O. V., FERNANDES, O. Sensitivity of the polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) guyanensis*. **ACTA TROPICA** 79: 225-229 (2001).

RUDD, M. P., ELLIOT, T., CRESSWELL, P., WILSON, I A., DWEK, R. A. Glycosilation and the Immune System. **SCIENCE** 291: 2370-2376 (2001).

SACKS, D. L. The structure and function of the surface lipophosphoglycan on different stages of *Leishmania* promastigotes. **INFECTIOUS AGENTS DISEASES** 1(4):200 (1992).

SACKS, D. L., HIENI, S., SHER, A. Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between non-infective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. **JOURNAL OF IMMUNOLOGY** 135: 564 (1985).

SACKS, D. L. & PERKINS, P. V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **SCIENCE** 223: 1417 (1984).

SACKS, D. L. & PERKINS, P. V. Development of infective stage of *Leishmania* stages within phlebotomine sand flies. **AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE** 34: 456 (1985).

SADICK, M. D., HEINZEL, F. P., HOLADAY, B. J., PU, R. T., DAWKINS, R. S., LOCSLEY, R. M. Cure of murine leishmaniasis with interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon-gamma independent mechanism. **JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE** 171: 115 (1990).

SALLES-GOMES, L. A intra-dermo reação de Montenegro na Leishmaniose e outras pesquisas afins. **BRASIL-MÉDICO** 53: 1079 (1939).

SALOTRA, P., SREENIVAS, G., POGUE, G. P., LEE, N., NAKHASI, H. L., RAMESH, V., NEGI, N. S. Development of a specie-specific PCR assay for detection of *Leishmania donovani* in clinical samples from patients with Kala-Azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY** 39(3): 849-854 (2001).

SANDERSON, P. N., HUCKERBY, T. N., NIEDUSZYNSKI, I. A. Conformational equilibria of α -L-iduronate residues in disaccharides derived from heparin. **BIOCHEMICAL JOURNAL** 243: 175-181 (1987).

SANTOS, G. C., TOLEDO, V. P. C. P. MAYRINK, W. Characterization of immune responses induced by different components of a vaccine against American cutaneous leishmaniasis. **MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ** 89(1): 170 (1994)

SARAVIA, N. V. Identification of *Leishmania*: Criteria and State of the Art. In Walton B. C., Wijeyaratne, P. M., Moddaber. F. (Eds.): Research on Control Strategies for the Leishmaniasis. Ottawa, Canada, International Research and development Centre. Manuscript Report 184E, pp 264 (1998).

SCHARTON-KERSTEN, T. M., AFONSO, L. C. C., WISOCKA, M., TRINCHIERI, G., SCOTT, P. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. **JOURNAL OF IMMUNOLOGY** 154: 5312 (1995).

SCHARTON, T. M. & SCOTT, P. Natural killer cells is a source of interferon-gamma that drives differentiation of CD4⁺ T cell subset and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. **JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE** 178: 567 (1993).

SCHLAGENHAUF, E., ETGES, R., METCALF, P. The crystal structure of the *Leishmania major* surface proteinase leishmanolysin (gp63). **STRUCTURE** 6(8): 1035 (1998).

SCHNUR, L. F., ZUCKERMAN, A., GREENBLAT, C. L. Leishmanial serotypes distinguished by the gel diffusion of factors excreted in vitro and in vivo. **ISRAELY JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES** 8: 932 (1972).

SCOTT, P. IFN- γ modulates the early development of Th1 and Th2 responses in murine model of cutaneous leishmaniasis. **JOURNAL OF IMMUNOLOGY** 147: 3149 (1991).

SEMPREVIVO, L. H. Exometabolites of *Leishmania donovani* promastigotes I. Isolation and initial characterization. **PROCEEDINGS OF THE SOCIETY EXPERIMENTAL OF BIOLOGY AND MEDICINE** 159: 105 (1978).

SEMPREVIVO, L. H & HONIGBERG, B. M. Exometabolites of *Leishmania donovani* promastigotes. **ZEITSCHRIFT FUR PARASITENKUNDE** 62: 201-211 (1980).

SHEEPARD, W. & DWYER, D. M. Cloning of *Leishmania donovani* genes encoding antigens recognized during human visceral leishmaniasis. **MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY** 19(1): 35 (1986).

SHUIKINA, E. E. Use of the fluorescent antibody technique in studies of cutaneous leishmaniasis **MEDIKAL PARAZITOLOGY** (Mosk) 34(5): 576-582 (1965).

SHIMIZU, Y., NAKATA, M., KURODA, Y., TISUTSUMI, N. K., MIZUOKI, T. Rapid and simple preparation of N-linked oligosaccharides by cellulose-column chromatography. **CARBOHYDRATE RESEACH** 332: 381-388 (2001).

SINGH, S., GIMAN-SACKS, A., CHANG, K. P., REED, S. G. Diagnostic and prognostic value of K39 recombinant antigen in Indian leishmaniasis. **JOURNAL OF PARASITOLOGY** 81(6): 1000 (1995).

SJOLANDER, A., BALDWIN, T. M., CURTIS, J. M., BENGTSSON, K. L., HANDMAN, E. Vaccination with recombinant parasite surface antigen 2 from *Leishmania major* induces a Th1 type of immune response but does not protect against infection. **VACCINE** 16(20): 2077 (1998).

SILVA, S. O., MACEDO, A. M., MELO, M. N. Identification and characterization of *Leishmania major* LIKE STRAINS. **MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ**. 89(1): 124 (1994).

SOARES, L. R., SERCARZ, E. E., MILLER, A. Vaccination of the *Leishmania major* susceptible BALC/c mouse. I. The precise selection of peptide determinant influences CD 4⁺ T cell subset expression. **INTERNATIONAL IMMUNOLOGY**. 6: 785 (1994).

SOLANO-GALEGO, L., RIERA, C., ROURA, X., INIESTA, L., GALEGO, M., VALLADARES, J. E., FISA, R., CASTILLEJO,S., ALBEROLA, J., FERRER, L., ARBOIX, M., PORTÚS, M. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1, and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. **VETERINARY PARASITOLOGY** 96: 265-276 (2001).

SOTERIADOU, K. P., TZINIA, A. K., PANOU-PAMONIS, E., TSIKARIS, V., SAKARELLOS-DAITSIOTIS, M., SAKARELLOS, C., PAPADOPOULOU, Y., MATSAS, R. Antigenicity and conformational analysis of the Zn (2+)-binding sites of two Zn (2+)-metalloproteases: *Leishmania* gp63 and mammalian endopeptidase-24.11. **BIOCHEMICAL JOURNAL** 313(2): 455 (1996).

SOTO, M., REQUENA, J. M., QUIJADA, L., ALONSO, C. Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY** 36(1): 58 (1998).

SOTO, M., REQUENA, J. M., QUIJADA, L., GOMEZ, L. C., GUZMAN, F., PATARROYO, M. E., ALONSO, C. Characterization of the antigenic determinants of the *Leishmania infantum* histone H3 recognized by antibodies elicited during canine visceral leishmaniasis. **CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY** 106(3): 454 (1996).

SPITZER, A., JARDIM, A., LIPPERT, D., OLAFSON, R. W. Long-term protection of mice against *Leishmania major* infection with a synthetic peptide vaccine. **VACCINE** 17: 1298-1300 (1999).

TAVARES, C. A., COSTA, C. A., AFONSO, L. C. C., NASCIMENTO, A., GUIMARÃES, T. M. P. D., MELO, M. N., MICHALICK, M. S. M., MARES-GUIA, M. L. MAYRINK, W. Identification, characterization and isolation of antigens from a vaccine against New World cutaneous Leishmaniasis. Meeting on Vaccine Against Leishmaniasis. Univ. Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. Belo Horizonte. Brasil. 10 – 11 September (1990).

TAVARES, C. A. P., DE ROSSI, R., PAYARES, G., SIMPSON, A. J. G., MCLAREM, D. J., SMITHERS, S. R. A monoclonal antibody raised against adult *Schistosoma mansoni* which recognizes a surface antigen on Schistosomula. **ZEITSCHRIFT FUR PARASITENKUNDE** 70: 189-197 (1984).

THOMAS, M. C., LONGOBARDO, M. V., CARMELO, E., MARANÓN, C., PLANELLES, L., PATARROYO, M. E., ALONSO, C., LÓPEZ, M. C. Mapping of the antigenic determinants of the *T. cruzi* kinetoplastide membrane protein-11. Identification of a linear epitope specifically recognized by human Chagasic sera. **CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY** 123: 465-471 (2001)

THOIDA, T., MARUYAMA, T., OGITA, Y., SUZUKI, A., TOYODA, H., IMANARI, T., LINHARD, R. J. Preparation and anticoagulant activity of fully *O*-sulphonated glycosaminoglycans. **INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES** (26: 233-241 (1999).

TITUS, R. G., CEREDIG, R., CEROTTINI, J. C., LOUIS, J. A. Therapeutic effect of anti-L3T4 monoclonal antibody GK1.5 on cutaneous leishmaniasis in genetically susceptible BALB/c mice. **JOURNAL OF IMMUNOLOGY** 135(3): 2108 (1985).

TOLEDO, V. P. C. P., MAYRINK, W., GOLLOB, K. J., OLIVEIRA, M. A. P., COSTA, C. A., GENARO, O., PINTO, J. A., AFONSO, L. C. Immunochemotherapy in American Cutaneous Leishmaniasis: immunological aspects before and after treatment. **MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ** 96(1): 89-98 (2001).

TOWBIN, H., STAEGELIN, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY SCIENCES (USA)** 76: 4350-4354 (1979),

TRUJILLO, C., RAMIREZ, R., VÁLEZ, I. D., BERBERICH, C. The humoral immune response to the kinetoplast membrane protein-11 in patients with American Leishmaniasis and Chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping epitopes. **IMMUNOLOGY LETTERS** 70: 203-209 (1999).

TSIKARIS, V., SAKARELLOS, C., SAKARELLOS-DAITSIOTIS, M., CUNG, M. T., MARRAUD, M., KONIDOU, G., TZINIA, A., SOTERIADOU, K. P. Use of sequential oligopeptide carriers (SOCn) in the design of potent *Leishmania* gp63 immunogenic peptides. **PEPTIDE RESEARCH** 9(5): 240 (1996)

TSIKAS, D., SANDMAN, J., HOLZBERG, D., PANTAZIS, P., RAIDA, M., FROLICH, C. Determination of S-nitrosoglutathione in human and rat plasma by High Performance Liquid Chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection after precolumn derivatization with O-phthalaldehyde. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY** 273: 32-40 (1999).

TURCO, S. J. & DESCOTEUX, A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. **ANNUAL REVIEW OF MICROBIOLOGY** 46: 65-94 (1992).

VALENZUELA, J. G., BELKAID, Y., GARFIELD, M. K., MENDEZ, S., KAMHAVI, S., ROWTON, E. D., SACKS, D. L., RIBEIRO, J. M. C. Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. **JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE** 94(3): 331-343 (2001).

ZURALSKI, G. & VRIES, J. E. Interleukin 13 and interleukin 4-like cytokine that acts on monocyte and B cells, but not on T cells. **IMMUNOLOGY TODAY** 15(1) (1994).

WILLIAMS, S. P. & DAVIES, G. J. Protein-carbohydrate interactions: learning lessons of the nature. **TRENDS IN BIOTECHNOLOGY** 19(9) (2001).

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), Report of the Division of Control to
Tropical Diseases (1998)

YAMAKAMI, K., AKAO, S., SATO, M., NITTA, Y., MIYAZAKI, J., TADAKUMA, T.

A single intradermal administration of soluble leishmanial antigen and plasmid
expression interleukin-12 protects BALB/c mice from *Leishmania major* infection.

PARASITOLOGY INTERNATIONAL 50(2): 81-91 (2001).

YANG, D. M., ROGERS, M. V., LIEW, F. W. Identification and characterization of host-
protective T-cell epitopes of a major surface glycoprotein (gp63) from *Leishmania major*.

IMMUNOLOGY 72(1): 3 (1991).