

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Parasitária

AVALIAÇÃO DA ANTIGENICIDADE DE FRAÇÕES SUBCELULARES DE *Leishmania*
(*Leishmania*) *amazonensis* PARA DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA.

CAROLINE CARVALHO DE ALMEIDA

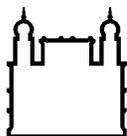
Rio de Janeiro

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

CAROLINE CARVALHO DE ALMEIDA

AVALIAÇÃO DA ANTIGENICIDADE DE FRAÇÕES SUBCELULARES DE *Leishmania*
(*Leishmania*) *amazonensis* PARA DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biologia Parasitária

Orientador: Dr Sylvio Celso Gonçalves da Costa

RIO DE JANEIRO

2009

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

A447

Almeida, Caroline Carvalho de.

Avaliação da antigenicidade de frações subcelulares de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* para diagnóstico de Leishmaniose visceral canina / Caroline Carvalho de Almeida. – Rio de Janeiro, 2009.

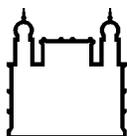
x, 89 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2009.

Bibliografia: f. 68-89

1. Antigenicidade. 2. Frações subcelulares. 3. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. 4. Diagnóstico. 5. ELISA. 6. Leishmaniose visceral canina. I. Título.

CDD 616 9364



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

CAROLINE CARVALHO DE ALMEIDA

AVALIAÇÃO DA ANTIGENICIDADE DE FRAÇÕES SUBCELULARES DE *Leishmania*
(*Leishmania*) *amazonensis* PARA DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA.

ORIENTADOR: Dr Sylvio Celso Gonçalves da Costa

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Dr^a. Alda Maria Da Cruz
Dr^a. Célia Maria Ferreira Gontijo
Dr^a. Maria de Fátima Madeira

SUPLENTE:

Dr. Reginaldo Peçanha Brazil
Dr. Carlos Roberto Alves

Rio de Janeiro, ____ de _____ de 2009

“Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Maurício e Maria Albertina, que sempre se esforçaram em dar a melhor educação possível e a lutar pelos meus sonhos; ao meu marido Rogério pelo incentivo e companheirismo; aos meus irmãos e minhas amigas que sempre me apoiaram; e ao meu querido amigo e orientador, por sempre ter acreditado em mim.”

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Sylvio Celso, um grande incentivador da busca pelo conhecimento, que sempre se esforçou em tornar seus alunos grandes pesquisadores. Obrigada pela sua confiança, pelas lições de vida, otimismo e amizade.

A chefe de laboratório Kátia Calabrese, pelo apoio e liberdade para realização deste trabalho.

Ao Carlos, mais que um professor, um amigo que me socorreu no “segundo tempo”. Obrigada pela compreensão e pela fundamental contribuição para este trabalho.

A minha amiga Flávia Cardoso pelo grande apoio neste trabalho e pela importante presença na minha vida.

A Celeste pela amizade, pelo enriquecimento de informações e por me ajudar em todos os momentos.

A Luciana, uma super secretária, mesmo com toda ocupação sempre me socorreu.

As queridas amigas: Ana Cláudia, Ana Lúcia, Cristiane, Joanna, Mariana Almeida e Mariana Rottini, sempre dividindo comigo todos os momentos e emoções não só relacionados ao mestrado, mas à minha vida.

Ao Luiz Scoffier por solucionar minhas dúvidas em biologia molecular e Luís Otávio por sempre me incentivar, desde o começo.

Ao Dr. Wilson Jacinto, uma maravilhosa pessoa que me apresentou e me integrou ao laboratório. Obrigada pelos ensinamentos e pela amizade.

Aos meus queridos amigos e colegas da turma “quorum sensing”, que batalharam junto comigo, em especial: Daniele Misael, Daniela Rosas, Mônica, Aline, Mariana Gandinni, Tamara, Ana Carolina, Alan, Fernando Uruquai e Alexandre.

Aos amigos do laboratório de Imunomodulação: Rosa, Leandro, Pamela, Daiana, Isabel, Anderson, Celso, Henrique, Edna, Dona Dalva, e as novas estagiárias. Obrigada pelos momentos de descontração e por proporcionarem um ambiente agradável para trabalhar.

Às queridas amigas e ex-companheiras de bancada, Alzenir e Verônica, obrigada pelas técnicas ensinadas e pela amizade.

Ao Dr. Pedro Cabello pelo apoio na avaliação dos dados estatísticos.

Ao laboratório de Parasitologia da Universidade de Mato Grosso do Sul por me ceder os soros caninos, em especial Dr^a. Carla Cardoso Arruda e Dr^a. Ana Luiza Osório. Obrigada pelo carinho e atenção.

A Dr^a. Célia Gontijo pela colaboração e por estar sempre à disposição para ajudar.

Ao Dr. Reginaldo Brazil, pela amizade e por sempre compartilhar sua experiência.

A Suzana Corte-Real pela colaboração na realização da microscopia eletrônica.

A todos do laboratório de Biologia de Tripanossomatídeos, que sempre me receberam de braços abertos.

A todos aqueles que direta ou indiretamente me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

A coordenação do curso de Biologia Parasitária por todo apoio e compreensão.

E a Deus pela proteção e saúde, e por ter inserido a Fiocruz no meu caminho, onde pude conhecer pessoas que hoje têm grande importância na minha vida, além de me tornar uma profissional mais integrada com a ciência e cultura.

“Educação nunca foi despesa. Sempre foi investimento com retorno garantido”

Arthur Lewis

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Considerações gerais.....	02
1.2. Breve histórico.....	05
1.3. Leishmaniose visceral americana (LVA).....	07
1.4. Leishmaniose visceral canina (LVC)	11
1.5. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina	14
2. OBJETIVOS.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. População (amostras).....	23
3.2. Manutenção dos parasitos.....	23
3.3. Obtenção das frações subcelulares.....	24
3.4. Dosagem de proteína.....	25
3.5. Eletroforese.....	25
3.6. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	26
3.7. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	26
3.8. Adsorção dos antígenos (frações subcelulares) nas placas de microtitulação.....	26
3.9. Técnica de ELISA.....	27
3.10. Reprodutibilidade do ELISA.....	27
3.11. Análise estatística dos dados.....	28
4. RESULTADOS.....	29
4.1. Identificação e caracterização bioquímica das frações subcelulares.....	30
4.1.1. Microscopia eletrônica de transmissão.....	30
4.1.2. Eletroforese.....	31
4.2. Padronização do ensaio imunoenzimático utilizando as frações subcelulares.....	32
4.3. Antigenicidade das frações subcelulares nos testes imunoenzimáticos.....	37
5. DISCUSSÃO.....	48
6. CONCLUSÕES.....	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
8. ANEXOS	81

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**AVALIAÇÃO DA ANTIGENICIDADE DE FRAÇÕES SUBCELULARES DE
Leishmania (Leishmania) amazonensis PARA DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE
VISCERAL CANINA.**

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Caroline Carvalho de Almeida

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença parasitária de potencial zoonótico com grande importância para a saúde pública. No Brasil, a LVC é causada por um protozoário da espécie *Leishmania (L.) chagasi*, e transmitida por flebotomíneos vetores cuja espécie principal é a *Lutzomyia longipalpis*. Os cães apresentam maior quantidade de parasitos na pele que o homem, representando importante fonte de infecção para os vetores, por isso são considerados reservatórios para a leishmaniose visceral humana (LVH). A prevalência da LVC varia de 1% a 40% nas áreas endêmicas. Uma das medidas preconizadas pelo Ministério da Saúde (MS) para o controle da LVH no Brasil é a eliminação dos cães soropositivos para LV. O método diagnóstico para cães, recomendado pelo MS, é a sorologia, seja através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) ou da técnica imunoenzimática (ELISA). Ambas as técnicas utilizam antígenos brutos de *Leishmania* spp. que apresentam diferenças na sensibilidade e especificidade, o que pode ocasionar resultados falso-negativos e falso-positivos. No caso de resultados falso-positivos, o animal será submetido à eutanásia. Em virtude da boa imunogenicidade de frações subcelulares de *Leishmania (L.) amazonensis*, como as frações enriquecidas de membrana (FM), de flagelo (FF) e microsomal (FMic), o presente trabalho teve como objetivo investigar a antigenicidade destas frações no diagnóstico de LVC através do ELISA. Inicialmente foi realizada a técnica de fracionamento para a obtenção das frações subcelulares. As frações obtidas foram caracterizadas através da microscopia eletrônica e pela eletroforese em gel de poliacrilamida. Depois as condições ideais para o uso destas no ELISA foram padronizadas. Os soros de cães com resultados negativos e positivos para LVC, através do método parasitológico, foram utilizados como controles. A sensibilidade e especificidade do ELISA utilizando as frações subcelulares de *L. (L.) amazonensis* foram avaliadas através da curva ROC. A sensibilidade das frações FM, FF e FMic foi de 95,5%, 89,8% e 93,2%, e especificidade de 98,1%, 88,7% e 94,3% respectivamente. Todos os resultados foram comparados com os do ELISA (Biomanguinhos), o qual utiliza antígenos brutos, que obteve 89,9% de sensibilidade e 92,5% de especificidade. Dentre as três frações, a FM apresentou uma maior área sobre a curva ROC, seguida da FMic, não havendo diferença significativa entre elas. A FM e a FMic foram as frações subcelulares de *L. (L.) amazonensis* que apresentaram melhores resultados na avaliação da antigenicidade, podendo ser utilizadas no diagnóstico de LVC no teste ELISA.

Palavras chaves: Antigenicidade, frações subcelulares, *Leishmania (L.) amazonensis*, diagnóstico, ELISA, leishmaniose visceral canina.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ANTIGENICITY EVALUATION OF SUBCELLULAR FRACTIONS OF *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* TO CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS DIAGNOSIS

ABSTRACT

Caroline Carvalho de Almeida

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is a parasitic disease with zoonotic potential and very important to the public health. In Brazil, CVL is caused by protozoans species of *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* and mainly transmitted by *Lutzomyia longilpapis* sandfly. Dogs represents an infection source to sandflies, and show higher amounts of parasites in the skin than humans, hence they are considered the reservoirs for human visceral leishmaniasis (HVL). CVL prevalence arranges between 1% and 40% at endemic areas. Some studies show that an increase of HVL cases coincides to an increase in serological prevalence of canine population in the same area, and that the canine infection prevails under human infection. For all reasons, one of attitudes recommended by the Health Ministry (HM) to HVL control is the elimination of CVL seropositive dogs. The diagnosis method recommended by HM is serological test, as indirect immunofluorescence reaction (IFAT) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Both methods use crudes antigens from *Leishmania* spp., which show differences in sensibility and specificity, what can cause false positive and false negative results and may lead to the needless of animals euthanasia. Recent research try to find a specific method to CVL diagnosis using recombinant and purified antigens from *Leishmania* spp., providing more sensitivity to the test and did not produce cross-reactions with antigens of other diseases. Subcellular fractions from *Leishmania*, such as enriched fractions with membrane (MF), flagella (FF) and microsomal (MicF), obtained by subcellular fractionation methodology, have shown a high immunogenicity in murine model. FF and MicF when used in association with immunomodulators were capable to protect mice against *L. (L.) amazonensis*. The present work aimed to investigate the antigenicity of subcellular fractions of *L. (L.) amazonensis* in CVL diagnosis by ELISA. Initially, was standardized the ideal conditions to use these fractions in ELISA. Serum from dogs parasitologically positive and negative to CVL were used to evaluate the sensitivity and specificity through ROC curve. The sensitivity of MF, FF and MicF were 95.5%, 89.8% and 93.2%, and the specificity 98.1%, 88.7% and 94.3%, respectively. All results were compared with those obtained using ELISA manufactured by Biomanguinhos, which use crude antigens of *Leishmania* spp, wich showed 89.9% sensitivity and 92.5% of specificity as results. Among these three fractions, MF had the biggest area on ROC curve, followed by MicF, and there was not significative difference between them. MF and MicF were the subcellular fractions from *L. (L.) amazonensis* that showed the best results in the antigenicity evaluation, and they may be used in CVL diagnosis by ELISA.

Key words: Antigenicity, Subcellular fractions, *Leishmania (L.) amazonensis*, diagnosis, ELISA, canine visceral leishmaniasis.

INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais

As leishmanioses são importantes doenças parasitárias causadas por espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (Ross, 1903). A transmissão é feita por insetos vetores hematófagos da família Psychodidae. Estes protozoários afetam animais silvestres e domésticos, e o homem. Segundo Ashford (2000), as principais formas clínicas da leishmaniose em humanos são: cutânea, mucocutânea, cutânea-difusa e dérmica pós-calazar, todas com comprometimento de pele ou mucosas; e a leishmaniose visceral (LV), com comprometimento de vísceras. As diferentes manifestações clínicas das leishmanioses dependem de vários fatores tais como a espécie de *Leishmania* envolvida, sua virulência e aspectos relacionados à condição nutricional e imunológica do hospedeiro (Turk & Belehu, 1974). A distribuição geográfica das leishmanioses é ampla afetando cerca de 12 milhões de pessoas em 88 países, onde mais de 350 milhões de indivíduos vivem expostos ao risco de infecção (WHO, 2007). Consideradas como doenças negligenciadas, as leishmanioses apresentam-se como grave problema de saúde pública. No Brasil, somente no ano de 2005 foram notificados mais de 26 mil casos de leishmaniose tegumentar americana (LTA) e 3.381 casos de LV (DATASUS, 2008).

O gênero *Leishmania* compreende espécies de parasitos heteroxênicos que apresentam duas formas evolutivas principais: a forma amastigota, arredondada, sem flagelo aparente, parasitando principalmente as células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) dos hospedeiros vertebrados; e a forma promastigota, fusiforme, extracelular com flagelo livre, encontrada no tubo digestório dos hospedeiros invertebrados. Ambas as formas podem ser cultivadas em meios de cultura axênicos. Este gênero, segundo proposta de Levine *et al.* (1980), ocupa a seguinte posição sistemática:

Reino Protista (Haeckel, 1866)

Sub-Reino Protozoa (Goldfuss, 1817)

Filo Sarcomastigophora (Honigberg & Balamuth, 1963)

Sub-Filo Mastigophora (Deising, 1866)

Classe Zoomastigophorea (Calkins, 1909)

Ordem Kinetoplastida (Honigberg, 1963)

Sub-ordem Trypanosomatina (Kent, 1880)

Família Trypanosomatidae (Doflein, 1901)

Gênero: *Leishmania* (Ross, 1903)

A diferença de comportamento dos parasitos no trato digestório dos insetos vetores foi um dos aspectos que permitiu a divisão do gênero *Leishmania* em dois subgêneros: o subgênero *Leishmania*, no qual o parasito tem desenvolvimento restrito à porção anterior e média do intestino do vetor e subgênero *Viannia*, englobando as espécies com desenvolvimento desde o intestino posterior até a porção anterior (Lainson & Shaw, 1987). Nestes dois subgêneros encontram-se agrupadas as diversas espécies de *Leishmania* que parasitam o homem e outros animais, causando diferentes manifestações clínicas, podendo variar de um pólo benigno para um pólo maligno, o que caracteriza a leishmaniose como uma doença espectral (Turk & Belehu, 1974).

➤ **Subgênero *Viannia*** (Distribuição limitada à Região Neotropical):

- ✓ *L. (V.) braziliensis* (Vianna, 1911 *emend.* Matta, 1916)
- ✓ *L. (V.) guyanensis* (Floch, 1954).
- ✓ *L. (V.) panamensis* (Lainson & Shaw, 1972)
- ✓ *L. (V.) peruviana* (Velez, 1913)
- ✓ *L. (V.) lainsoni* (Silveira *et al.*, 1987)
- ✓ *L. (V.) naiffi* (Lainson & Shaw, 1989)
- ✓ *L. (V.) shawi* (Lainson *et al.*, 1989)
- ✓ *L. (V.) colombiensis* (Kreutzer *et al.*, 1991)
- ✓ *L. (V.) lindenbergi* (Silveira *et al.* 2002)

➤ **Subgênero *Leishmania*** (Distribuição nos continentes europeu, asiático, americano e africano):

- ✓ *L. (L.) mexicana* (Biagi, 1953 *emend.* Garnham, 1962)
- ✓ *L. (L.) amazonensis* (Lainson & Shaw, 1977)
- ✓ *L. (L.) chagasi* (Cunha & Chagas, 1937 (sinonímia *L. (L.) infantum*)
- ✓ *L. (L.) enriettii* (Muniz & Medina, 1948)
- ✓ *L. (L.) pifanoi* (Medina & Romero, 1959)
- ✓ *L. (L.) hertigi* (Herrer, 1971)
- ✓ *L. (L.) deanei* (Lainson & Shaw, 1979)
- ✓ *L. (L.) aristidesi* (Lainson & Shaw, 1979 *emend.* Lainson & Shaw 1987)
- ✓ *L. (L.) venezuelensis* (Bonfante-Garrido, 1980)

Os principais vetores das leishmanioses estão incluídos em dois gêneros: *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo. Estes dípteros pertencem à família

Psychodidae, subfamília Phlebotominae, chamados genericamente de flebotomíneos e são conhecidos vulgarmente no Brasil como “cangalha”, “cangalhingã”, “orelha-de-veado”, “asa dura”, “mosquito-palha”, “birigui”, e “tatuíra”, dependendo da região do país. Estes vetores são fundamentais para a manutenção do ciclo da doença, uma vez que veiculam as formas infectantes do parasito de animais infectados para animais suscetíveis ou para o homem. Apenas as fêmeas são hematófagas, com ciclos de atividade crepuscular e pós-crepuscular, abrigando-se durante o dia em lugares úmidos e escuros (Killick-Kendrick, 1990a). Cerca de 30 espécies de flebotomíneos estão implicadas na transmissão da doença (Shaw, 1994; Desjeux et al., 1996; Ashford, 1997). Cada espécie de *Leishmania* está adaptada a um número restrito de vetores e reservatórios, o que determina características próprias para o ciclo de transmissão de cada uma delas (Lainson *et al.*, 1994). Existem condições epidemiológicas básicas para o desenvolvimento do ciclo silvestre e do ciclo domiciliar ou peridomiciliar. No primeiro caso, estão envolvidos reservatórios e flebotomíneos silvestres (Deane & Deane, 1954b), e a transmissão ao homem ocorre na floresta ou em sua proximidade, em atividades como desmatamento, treinamento militar, extrativismo, caça ou pesca (Nery-Guimarães, 1955). No segundo caso, devido à derrubada das matas originais para a colonização humana e ao processo desestruturado de urbanização, algumas espécies de flebotomíneos acabam se adaptando ao habitat doméstico, havendo o envolvimento de reservatórios domésticos como cães e gatos. (Passos *et al.*, 1996; Pennisi, 2002; Cortada *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2008). Neste caso, a transmissão pode ocorrer em todo ambiente peridomiciliar e até mesmo dentro das residências, sendo esta a principal situação epidemiológica observada nas regiões Sudeste e Nordeste do Brasil (Marzochi, 1992).

O ciclo biológico do parasito tem início quando, ao picar o hospedeiro infectado, o flebotomíneo ingere as formas amastigotas contidas no interior das células parasitadas. No inseto, estas formas transformam-se em promastigotas que se multiplicam rápida e intensamente por divisão binária e passam por uma série de mudanças morfológicas e fisiológicas aderindo-se ao tubo digestório do inseto. Em seguida, as formas promastigotas perdem a aderência e migram para a porção anterior do tubo digestório onde ocorre a metaciclogênese, a diferenciação em formas promastigotas metacíclicas infectantes. Na região do esôfago, faringe e válvula estomodeal, ocorre uma intensa multiplicação destas formas, provocando uma obstrução mecânica devido à grande quantidade de parasitos. Isto dificulta a ingestão de sangue pelo inseto, fazendo com que em um próximo repasto sanguíneo ocorra a regurgitação de sangue com formas infectantes no local da picada, infectando o novo hospedeiro (Lainson & Shaw, 1978; Killick-Kendrick, 1990b). A seguir, os parasitos são interiorizados, principalmente por células do SFM, e dentro dos vacúolos parasitóforos de

natureza fagolisossomal destas células, diferenciam-se em formas amastigotas, se multiplicam até romperem as células e são disseminados através do sistema linfático e sanguíneo infectando outras células de mesma natureza (Chang *et al.*, 1986).

1.2. Breve histórico

A primeira observação de um parasito que mais tarde veio a ser denominado de *Leishmania* foi feita por Cunningham, na Índia em 1885, em pacientes com calazar (*kala-azar*, do hindi *kala*: negro e do persa *azar*: doença), tendo esta denominação devido ao aspecto escurecido da pele. Posteriormente, o cientista russo Borovsky descreveu com detalhes este protozoário em casos de lesões cutâneas sem, entretanto, lhe dar nome. O parasito foi a seguir descrito por Leishman em 1903, que observou a semelhança que apresentavam com as formas arredondadas encontradas em infecções por *Trypanosoma*. Ainda em 1903, Donovan observou os mesmos parasitos em pacientes que apresentavam a doença conhecida como febre Dum-Dum ou calazar. Laveran e Mesnil, ao estudarem os preparados de Donovan, deram o nome ao parasito de *Piroplasma donovani*. Ross, ainda em 1903, ao estudar o material em questão, observou claramente que o organismo não era um esporozoário e criou o gênero *Leishmania*. Assim, o nome correto para o parasito causador do calazar ficou sendo *Leishmania donovani* (Ross, 1903). Wright recebeu um paciente oriundo da Síria apresentando o chamado botão do oriente, de quem isolou um protozoário que deu o nome de *Helcosoma tropicum*. Este protozoário foi posteriormente incluído no gênero *Leishmania* e assim os parasitos isolados de lesões de botão do oriente ficaram com a denominação *Leishmania tropica* (Wright, 1903). Cinco anos mais tarde Nicolle, estudando o calazar do Mediterrâneo, descobriu uma nova espécie de *Leishmania* que ficou denominada de *Leishmania infatum* (Nicolle, 1908).

As primeiras observações de casos provenientes do Novo Mundo foram feitas por Cerqueira, em 1855, que descreveu lesões de pele, o qual denominou de botão de biskra, em casos clínicos de italianos que retornaram ao país depois de residirem algum tempo no Brasil (Pessôa, 1982). Em 1908 muitos pacientes foram atendidos na Santa Casa de São Paulo com lesões de pele que foram denominadas úlcera de Bauru, feridas bravas, úlceras da noroeste, etc., sem que os médicos pudessem determinar o agente etiológico das lesões. Já em 1909, Adolfo Lindenberg notificou que os pacientes de São Paulo apresentavam o mesmo parasito descrito como agente etiológico do botão do oriente, o que foi confirmado a seguir por Carini e Paranhos (Silveira *et al.*, 1997). No Peru, foram também identificados os parasitos da espúndia, doença caracterizada por ulcerações progressivas das mucosas (Martinez, 1969). Ainda em 1911, Gaspar Vianna considerou o agente da leishmaniose cutânea do Novo Mundo

bastante diferente da *L. tropica*, propondo o nome *L. braziliensis* (Pessôa, 1982). Esta observação de Gaspar Vianna levantou uma discussão bastante pertinente, pois na época ainda não sabiam se a leishmaniose tegumentar ou cutânea mucosa era autóctone do continente americano. Porém, pode-se admitir que realmente seja autóctone pela correlação entre os trabalhos de ceramistas índios pré-colombianos do Peru e Equador, datadas de 400-900 a.C. Estas cerâmicas, chamadas de huacos, demonstram mutilações similares às causadas pela forma mucosa e mucocutânea da doença e alguns estados patológicos descritos no continente (León e León, 1976). Além disso, historiadores espanhóis, já na época do “descobrimento”, escreveram sobre as lesões faciais que facilmente acometiam os ameríndios locais. Tamoyo, em 1908, relacionou as lesões dos huacos peruanos com a moléstia conhecida na América como “uta”, confirmando a existência da leishmaniose tegumentar entre os habitantes da América pré-colombiana (Pessôa, 1982).

A forma visceral das leishmanioses se confundia no passado com outras doenças endêmicas e de apresentação clínica semelhante, como a malária. Segundo alguns autores, o primeiro caso humano de LV autóctone das Américas foi descrito em 1913, por Migone, ao examinar um paciente febril que havia retornado ao Paraguai após trabalhar na construção da estrada de ferro São Paulo-Corumbá no Brasil (Lainson & Shaw, 1992). Além de o paciente apresentar sintomas semelhantes aos do calazar, o autor relatou a presença de “corpúsculos” no sangue deste paciente, os quais ele estava convencido ser um protozoário do gênero *Leishmania*. Por outro lado, Mazza e Cornejo em 1926 observaram formas do parasito ao examinar o material de punção de uma criança com hepatoesplenomegalia. Segundo os autores, este seria o primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral no Novo Mundo (Mazza & Cornejo, 1926). A seguir, em 1932, Mazza encontrou mais dois casos de calazar, um em Salta e outro em Jujuy. Estes achados foram confirmados em 1937 pela Comissão Brasileira para o estudo de leishmaniose visceral (Iglesias, 1990). Além disso, os achados de formas amastigotas em fragmentos de fígados de 41 casos no Pará e de vários Estados do Nordeste do Brasil, obtidos por meio de viscerotomias para a febre amarela feito por Penna em 1934, forneceram os primeiros dados sobre a importância e distribuição geográfica da LVA. Somente em 1936 foi descrito o primeiro caso de LV em um indivíduo vivo residente no Brasil. Evandro Chagas, investigando a doença em Sergipe, diagnosticou a doença e caracterizou um foco de calazar na região (Chagas, 1936). As amostras de leishmânias isoladas no Brasil não se reproduziram experimentalmente, o que levou dois pesquisadores brasileiros a concluir que se tratava de uma nova espécie, sendo então classificada como *L. chagasi* (Cunha & Chagas, 1937). Em experimentos posteriores, entretanto, Cunha (1938) obteve sucesso ao infectar hamsters, macacos e cães, com a mesma amostra de parasito,

concluindo que as falhas anteriores foram devidas a inoculação de parasitos não viáveis. Cunha, em 1942, ampliou seus estudos de sorologia e sugeriu que os testes de absorção/aglutinação mostravam que o agente causador da LVA era idêntico a *L. infantum* da região Mediterrânea. Embora Wenyon (1946) questionasse o valor destes testes, a opinião de Cunha já havia encontrado o suporte de Senekjic (1944), que sinonimizara *L. chagasi* com *L. donovani*, baseando-se nos caracteres bioquímicos dos dois organismos. Diferenças de opinião existem até hoje sobre a identidade da espécie de leishmânia responsável pela LVA. Segundo alguns autores, existem duas hipóteses sobre a origem da LVA (Lainson & Shaw, 1992). A primeira sugere que a *L. chagasi* seja autóctone das Américas, onde era, primeiramente, um parasito de canídeos selvagens e nos tempos pré-colombianos começou a infectar homens e cães domésticos. A segunda hipótese considera que a LVA seja causada pela *L. infantum*, que teria sido introduzida na América Latina nos tempos pós-colombianos pelos imigrantes europeus e/ou por seus cães (Killick-Kendrick, 1985), o que faz com que muitos autores considerem a *L. infantum* e a *L. chagasi* uma única espécie (Killick-Kendrick *et al.*, 1980; Grimaldi *et al.*, 1987; Rioux *et al.*, 1990). Baseados em análises genéticas multifatoriais, alguns autores sugerem que *L. infantum* e *L. donovani* são as únicas espécies que pertencem ao complexo *L. donovani*, sendo assim, a *L. chagasi* é considerada a mesma espécie de *L. infantum* (Lukes *et al.*, 2007).

1.3. Leishmaniose visceral americana

A leishmaniose visceral humana (LVH) é causada principalmente por três espécies de leishmânias, que estão incluídas no complexo donovani: *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*. Segundo Hommel (1978), a LV pode ser classificada em cinco tipos segundo seu perfil clínico-epidemiológico: 1) tipo indiano: doença de perfil antroponótico causado pela *L. donovani* e transmitida pelo *Phlebotomus argentipes*. A doença é caracterizada por surtos freqüentes e por alta taxa de mortalidade, acometendo adultos e crianças. Esta forma de LV ocorre na Índia, Afeganistão, Iraque, Irã, Jordânia, Israel, Arábia Saudita, Síria e Bengala; 2) tipo africano: também uma antroponose semelhante ao tipo indiano, causado pela *L. donovani* e pela *L. infantum*, e transmitida pelas espécies *Phlebotomus orientalis*, *Phlebotomus martini* e *Phlebotomus celiae*. Esta forma ocorre enzooticamente em partes subhabitadas do sudeste do Sudão, nordeste do Quênia, sudeste da Etiopia e Somália; 3) tipo Chinês: caracterizado por ser uma zoonose rural na qual a *L. infantum* circula entre cães (*Canis familiaris*), procionídeos e o homem. É transmitida por *Phlebotomus chinensis*, *Phlebotomus longiductus* e *Phlebotomus major wui* e ocorre na parte sul da China e no nordeste do país, onde o cão é descrito como sendo o principal reservatório da doença; 4) tipo Mediterrâneo: uma

zooantroponose que acomete principalmente o cão e crianças abaixo de cinco anos. A espécie envolvida é *L. infantum*, e é transmitida por várias espécies de flebotomíneos, sendo o *P. perniciosus* o principal vetor. Esta forma da doença está presente no litoral Mediterrâneo e nos países dos Balcãs; oeste asiático, do norte da Rússia ao sul da península Árabe e o oeste da China; 5) tipo americano (LVA): zoonose cuja espécie responsável é a *L. (L.) chagasi* e o vetor principal é *Lutzomyia longipalpis*. O cão é o reservatório doméstico principal da doença. A LVA está presente em 12 países da América Latina e 90% dos casos ocorrem no Brasil.

As manifestações clínicas da LVH podem variar de discretos, na forma inaparente ou assintomática da doença, até sintomas mais graves, levando ao óbito quando não tratado. A sintomatologia dependerá da carga parasitária, da resposta imunológica do hospedeiro e do processo inflamatório subjacente. Na maioria dos casos, o período inicial da doença pode ser caracterizado por febre, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia. Podem ocorrer também, numa forma mais grave, emagrecimento progressivo, edema dos membros inferiores, icterícia, hemorragias e comprometimento do estado geral. O período de incubação da doença no homem varia entre 10 dias e 24 meses (SVS, 2006).

O tratamento da LVH geralmente é feito com antimoniais pentavalentes, seguido de acompanhamento clínico devido à toxicidade do tratamento. Pessoas com cardiopatias, nefropatias, hepatopatias e doença de Chagas não podem se submeter ao tratamento (SVS, 2006).

O diagnóstico laboratorial da LVH é frequentemente baseado em métodos sorológicos, como a aglutinação direta (DAT), reações de imunofluorescência indireta (RIFI) ou imunoenzimático (ELISA) (Santarém *et al.*, 2005); na identificação do parasito em aspirados de baço, medula óssea e linfonodo; e em métodos moleculares, como reação em cadeia de polimerase (PCR). Cada uma dessas técnicas possui vantagens e desvantagens relacionadas ao custo, à elaboração do antígeno, às reações cruzadas, à especificidade e sensibilidade. Devemos levar em consideração as condições locais de disponibilidade de equipamentos e de pessoal técnico especializado, o que influencia positiva ou negativamente na aplicação de um determinado método diagnóstico.

O diagnóstico diferencial inclui doenças como paracoccidiodomicose, doença de Chagas e esquistossomose. O controle da doença está voltado para medidas profiláticas como proteção individual, como o uso de repelentes e mosquiteiros; controle do vetor e controle da população canina através de inquéritos sorológicos e eutanásia em cães sorologicamente positivos (SVS, 2006).

Originalmente a LV no Novo Mundo era restrita aos ambientes silvestres. Com os trabalhos de Deane e Deane, ficou bem estabelecida a ocorrência da LV também em zonas

rurais e urbanas. Estes estudos foram realizados no Estado do Ceará (Deane *et al.*, 1954a), onde a distribuição do vetor *Lu. longipalpis* coincidia quantitativamente com a incidência da doença humana que ocorria principalmente nos boqueirões e grotões. A partir da década de 80, houve uma transformação notória na distribuição da LV no Brasil, o que alterou seu perfil epidemiológico, ou seja, a doença que era típica da área rural e endêmica no Nordeste passou a ocorrer também na periferia de grandes centros urbanos (Gontijo e Melo, 2004). Recentemente vem ocorrendo uma crescente urbanização da doença atingindo cidades em Campo Grande, MS, e Belo Horizonte, MG (Silva *et al.*, 2001, Antonialli *et al.*, 2007). Fatores como alterações ecológicas e climáticas, destruição de florestas primárias para construção de rodovias e gasodutos, como o caso da construção do gasoduto Brasil-Bolívia e o rápido crescimento e migração populacional, são prováveis hipóteses que contribuem significativamente para o aumento da população de vetores e reservatórios do parasito em áreas não endêmicas (Souza *et al.*, 2008). Um exemplo típico da urbanização da doença vem ocorrendo em Mato Grosso do Sul, onde dados de um inquérito sorológico na população canina de Corumbá realizado em 1988 revelou uma incidência de 8,7% dentre 481 animais examinados, contrastando com outro estudo realizado em 1998, onde a incidência foi de 24% nos municípios de Corumbá e Ladário (Nunes *et al.*, 1988; Santos *et al.*, 1998). Nos últimos anos, assinala-se a expansão da LVH para outros municípios do Estado: Dois Irmãos de Buriti, Bodoquena, Miranda, Aquidauana, entre outros. Um dos fatos que vem chamando atenção dos gestores de saúde do Estado é a alta letalidade da doença. Em 2001, foram notificados 370 casos de LV com 17 óbitos (FUNASA/MS, 2001). Recentemente, dados da Secretaria de Estado de Saúde (SES) revelam que o número de casos confirmados da doença oscilou entre 251 e 269 nos anos de 2004 a 2008, com 25 óbitos apenas em 2008 (CONASS, 2009).

Além da notável urbanização, a doença se nacionalizou se espalhando em 19 das 27 unidades federativas, dentre eles Rio de Janeiro (RJ), Corumbá (MS), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Palmas (TO), Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) (SVS, 2006). Recentemente foram confirmados dois casos de LVH em São Borja (RS), fato preocupante para a Saúde Pública já que a região sul do país não se constituía uma região endêmica para LV (www.ioc.fiocruz.br). A epidemiologia da LV nas regiões endêmicas merece estudos mais aprofundados não só devido ao pouco conhecimento da carga de infecção geral na população, mas pelo fato de se estimar o número de pessoas expostas ao risco de infecção durante um surto epidêmico da parasitose (Werneck *et al.*, 2002). Nas diferentes regiões endêmicas, o número de formas assintomáticas de LV é mais elevado que as formas consideradas sintomáticas por diferentes padrões clínicos. Vários fatores favorecem a ocorrência de formas

clínicas bem definidas ou permitem a reativação de formas latentes. Um desses fatores é a imunossupressão adquirida, como a subnutrição ou infecções diversas principalmente as causadas pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), que aumentam os riscos de infecções graves (Desjeux & Alvar, 2003). Estudos realizados na Espanha mostraram que a incidência da LV é 418 vezes maior entre pacientes infectados com HIV quando comparamos com pessoas HIV negativas (Pintado *et al.*, 2001). O número de casos de LV em indivíduos imunocomprometidos, principalmente pacientes com HIV, tem sido relatado em 35 países, sendo que a maioria dos casos notificados está concentrada em quatro países: França, Itália, Portugal e Espanha (Desjeux *et al.*, 1996). Nestes países, a LV comporta-se como uma enfermidade oportunista em pacientes com infecção avançada pelo HIV. Na Espanha, quase 50% de todos os casos de LV em adultos estão associados ao HIV, fazendo dessa doença a terceira mais comum infecção oportunista neste país (Alvar *et al.*, 1992). Nestas regiões, sugere-se que a LV deva ser incluída como indicadora de HIV, à semelhança com o que já se preconiza com relação às conhecidas doenças oportunistas HIV-associadas (Montalban *et al.*, 1989; Montalban *et al.*, 1990; Peters *et al.*, 1990; Ramos *et al.*, 1994). A coinfeção *Leishmania*/HIV está aumentando consideravelmente na África e na Índia (Albrecht, 1998). No Brasil, a sobreposição LV/HIV tem sido pouco relatada, porém a alta incidência e ampla distribuição da LV nas áreas endêmicas podem caracterizá-la como uma infecção oportunista nos pacientes com HIV (Rabello *et al.*, 2003; Alves e Bevilacqua, 2004). Os portadores dessa associação geralmente apresentam um quadro clínico clássico de LV. Porém, outras manifestações adicionais, que fogem ao padrão clássico, podem ocorrer (Montalban *et al.*, 1989; Peters *et al.*, 1990).

O maior período de transmissão da LV está relacionado às estações de chuva nas épocas de altas temperaturas e alta umidade relativa do ar, período onde o vetor da doença encontra condições ótimas para sua reprodução (Galati *et al.* 1997; Rebêlo *et al.*, 2001). Embora *Lu. longipalpis* seja o principal vetor da LVA no Brasil, outras espécies têm sido incriminadas em focos isolados da doença. Na região Centro-Oeste do Brasil, tem se dado muita atenção à espécie *Lutzomyia cruzi* (dos Santos *et al.*, 1998). Em Mato Grosso do Sul, esta espécie estaria envolvida com a transmissão da doença na região de Corumbá até a fronteira com a Bolívia (de Oliveira *et al.*, 2003). A transmissão da LV por transplante de órgãos, transfusão de sangue e contaminação por seringas pode estar contribuindo também para a expansão da incidência desta doença (Portolés *et al.*, 1994; Moroni & Bossi, 1995).

Em relação aos reservatórios da LVH no Brasil, duas espécies de raposas foram encontradas naturalmente infectadas pela *L.(L.) chagasi* e a infecção também foi reproduzida experimentalmente. A primeira, *Dusicyon vetulus*, no nordeste do Brasil (Deane e Deane,

1954a) e a outra, *Cerdocyon thous*, na região amazônica (Lainson *et al.*, 1969a; Silveira *et al.*, 1982), em Mato Grosso do Sul (Melo *et al.*, 1988) e em Minas Gerais (Silva *et al.*, 2000). O *Didelphis albiventris* foi o primeiro mamífero não canídeo encontrado naturalmente infectado por *L.(L.) chagasi* no Continente Americano (Sherlock *et al.* 1984; 1988). Logo após esse relato, diversos exemplares de uma espécie muito próxima, o *Didelphis marsupialis*, foram encontrados parasitados com a mesma leishmânia em focos endêmicos da Colômbia (Corredor *et al.*, 1989). Esse marsupial apresenta uma infecção inaparente, indicando, segundo Sherlock e colaboradores, uma evoluída associação parasito/hospedeiro, o que poderia conferir ao animal um papel de reservatório primário da LVA. Por outro lado, não se poderia eliminar a hipótese de que o marsupial, em suas incursões ao ambiente doméstico, tenha se infectado com a mesma leishmânia que ali infectava o homem e o cão americano (Sherlock *et al.* 1984; 1988). A raposa *Lycalopes ventulus* naturalmente parasitada por *L. (L.) chagasi* foi capaz de infectar flebótomos em trabalhos experimentais (Deane e Deane, 1954 b). Por possuírem hábitos sinantrópicos, estes animais podem ser responsáveis pela ligação entre o ciclo silvestre e doméstico. Já no ciclo rural e urbano da LV, os principais reservatórios pertencem à família Canidae, onde o cão doméstico é considerado um importante reservatório devido ao intenso parasitismo cutâneo e ao crescente número de casos de leishmaniose visceral canina (LVC) (Deane e Deane, 1954a; Deane e Deane, 1954b; Silva *et al.*, 2001; Cortada *et al.*, 2004b). É importante ressaltar que na Índia não tem sido encontrado animal reservatório da LVH. O ciclo da doença neste país é antropofílico, onde o único hospedeiro encontrado infectado por *L.(L.) donovani* é o homem, sem a participação de animais (Palatnik-de-Sousa *et al.*, 2001). Outro animal doméstico com possível papel de reservatório em alguns focos de LV no Brasil é o gato (*Felis catus*). Apesar de alguns autores não encontrarem formas amastigotas do parasito em gatos de áreas endêmicas no Nordeste (Deane, 1956; Alencar, 1974), foi observado uma prevalência de soropositividade nestes animais em algumas áreas endêmicas por outros autores (Savani *et al.*, 2004; da Silva *et al.*, 2008).

1.4. Leishmaniose visceral canina

Do ponto de vista epidemiológico e de saúde pública, a LVC torna-se mais importante que a LVH, porque além de ser mais prevalente, apresenta um grande contingente de animais infectados com parasitismo cutâneo, que servem como fonte de infecção para os insetos vetores (Nieto *et al.*, 1996, Cortada *et al.*, 2004). Os cães parecem estar envolvidos no ciclo da transmissão da LV desde os primeiros relatos do século passado (Nicolle & Comte 1908). Eles representam fonte de infecção para os vetores, além de apresentarem maior quantidade

de parasitos na pele que o homem. Isto favorece a infecção de vetores e contribui para a transmissão da infecção para o homem, principalmente levando-se em consideração a íntima relação homem-cão (Santa Rosa e Oliveira, 1997). A prevalência da LVC varia de 1% a 40% nas áreas endêmicas (Ashford *et al.*, 1998; Paranhos-Silva *et al.*, 1996, Courteney *et al.*, 2002). A doença é em geral sistêmica e crônica, no entanto uma evolução aguda e grave pode levar o animal ao óbito em poucas semanas. Por outro lado, pode permanecer latente, levando à cura espontânea (SVS, 2006). O período de incubação é de 3 a 7 meses. Os sinais clínicos mais característicos de LVC são: linfadenopatia, principalmente dos linfonodos poplíteos e cervicais; lesões cutâneas como descamação, eczema e pequenas úlceras no focinho e orelhas; e onicogribose. Os animais podem apresentar sinais clínicos inespecíficos como emagrecimento, apatia, febre irregular, coriza, ceratoconjuntivite, edema, diarreia, hepatoesplenomegalia e até hemorragia intestinal (Albuquerque *et al.*, 2007), além de lesões musculares, cardiovasculares, digestivas e nervosas (Blavier *et al.*, 2001).

É possível classificar os cães em assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos (Mancianti, 1998). Os cães assintomáticos podem viver anos sem manifestar qualquer sintomatologia característica da doença, com baixos níveis de anticorpos anti-*Leishmania* e alto nível de parasitismo tissular dependendo da área endêmica de origem (Cortada *et al.*, 2004). Por este motivo, os animais assintomáticos representam grande problema de saúde pública, pois a detecção de anticorpos por técnicas sorológicas pode ser difícil, impossibilitando a adoção de medidas de controle eficazes. Os sintomáticos são aqueles que apresentam mais de três sinais clínicos característicos da doença, como por exemplo, alterações cutâneas (alopecia e úlceras), onicogribose, além de terem altos títulos de anticorpos anti-*Leishmania*. Os oligossintomáticos apresentam até três sinais clínicos, como adenopatia linfóide, perda de peso e pelame opaco. O diagnóstico clínico da doença é complicado devido a grande porcentagem de animais assintomáticos e oligossintomáticos, e também ao fato de outras doenças infecciosas apresentarem sinais clínicos semelhantes aos da LVC (SVS, 2006).

A sintomatologia da LVC tem sido associada com alterações imunológicas envolvendo linfócitos T, que incluem a ausência de hipersensibilidade do tipo tardia, diminuição do número de linfócitos T no sangue periférico e a produção policlonal de anticorpos anti-*Leishmania* não imunoprotetores (IgG). As subclasses de IgG têm sido utilizadas como indicadores da evolução da doença (Deplazes *et al.*, 1995). Os níveis séricos de IgG1 parecem estar associados com mecanismos imunoprotetores da infecção canina, uma vez que estão frequentemente mais elevados em cães assintomáticos. Por outro lado, os níveis séricos de IgG2 parecem estar associados a mecanismos imunopatológicos na LVC, com a

observação mais freqüente de títulos elevados nas formas mais graves da infecção (Reis *et al.*, 2006). Também foi observada forte relação entre o aumento dos níveis de IgG1 e IgG2 em cães sintomáticos (Almeida *et al.*, 2005). Entretanto, a hipótese de que os níveis de produção de IgG1 e IgG2 estejam associados à susceptibilidade e resistência da LVC ainda não foi confirmada (Quinnell *et al.*, 2003). A produção policlonal de anticorpos inclui também a classe IgE, que pode estar fortemente associada ao desenvolvimento da patologia, sendo detectado principalmente nos animais sintomáticos (Almeida *et al.*, 2005). As manifestações clínicas da LVC são bem diversas, mas em todas elas parece haver um acúmulo inicial de células fagocíticas mononucleares nos tecidos invadidos, o que promove a hiperplasia das células do retículo endotelial dos órgãos envolvidos (Malla & Mahajan, 2006). A patologia da LVC é influenciada pela supressão específica da imunidade mediada por células, provocando a disseminação e multiplicação descontrolada dos parasitos, apesar dos altos níveis de anticorpos circulantes. A hipergamaglobulinemia causada pela elevada atividade das células B parece promover mais danos que proteção ao hospedeiro, onde auto-anticorpos podem estar associados ao desenvolvimento de processos patológicos com a deposição dos imunocomplexos em vários órgãos e tecidos. (Ferrer *et al.*, 1995). Muitas vezes a infecção independe da extensão dos sintomas nos cães, ou seja, o cão sendo assintomático, oligossintomático ou sintomático, o vetor consegue se infectar com êxito (Molina *et al.*, 1994).

A correlação entre LVH e LVC apresenta controvérsias. Alguns autores não encontraram uma correlação direta entre a incidência da LVH e LVC em áreas endêmicas (Courtenay *et al.*, 2002; Ribeiro, 2007). Por outro lado, foi observado que a ocorrência de surtos caninos tem precedido a ocorrência de casos humanos, além de constatação de que a infecção em cães tem sido mais prevalente que no homem (Alencar *et al.*, 1987; Antonialli *et al.*, 2007). Portanto, há necessidade de mais estudos relacionados ao papel destes animais na manutenção da transmissão da LV. Por estes motivos, uma das medidas preconizadas pelo Ministério da Saúde para o controle da LVA é a eliminação dos cães soropositivos. Outras medidas são baseadas no diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, na redução da densidade populacional do vetor, no uso em cães de coleiras com inseticidas e atividades de educação em saúde.

O tratamento utilizado com eficácia em humanos acometidos pela LVA não é recomendado para cães, pois além de induzir uma aparente remissão dos sinais clínicos, não previne recidiva e parece ter efeito limitado na infectividade de vetores, podendo levar o risco de selecionar parasitos resistentes em relação às drogas utilizadas no tratamento de humanos (SVS, 2006). Por isso o tratamento canino no Brasil é proibido devido ao risco que esta

conduta acarreta para a saúde humana (http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri1426_11_07_2008.html).

A eutanásia dos cães soropositivos, como preconizada pelo Ministério da Saúde, causa discordância por parte dos proprietários. Muitos mantêm o animal infectado vivo ou então o substitui por outro que provavelmente será infectado no mesmo local. Além disso, a eutanásia dos cães pode ser um método controverso, pois para alguns autores o cão doméstico parece não ser tão importante para a infecção em humanos. Isto faz com que o controle vetorial seja indicado como método mais efetivo na profilaxia da doença (Costa e Vieira, 2001).

Os testes sorológicos podem ser falso-positivos, ou seja, os animais podem estar acometidos por outra doença que cause reação cruzada com leishmaniose, já que muitas vezes o técnico profissional desconhece a área da patologia veterinária, podendo levar à eliminação equivocada destes animais. Uma alternativa para evitar a eutanásia dos animais infectados seria a busca de medidas terapêuticas ou imunoproláticas, como a vacina de frações de glicoproteínas purificadas (Leishmune®), que há cinco anos vem sendo empregada no Brasil revelando resultados promissores para a prevenção da doença segundo Borja-Cabrera *et al.* (2008). A vacina pode representar uma alternativa de controle da doença pela possível redução do número de reservatórios caninos que atuam como fonte de infecção para os seres humanos. Encontra-se em fase de teste um antígeno recombinante A2 para vacinação de LVC. A proteína A2 é encontrada apenas nas formas amastigotas do parasito. Uma das principais vantagens desta vacina é de produzir anticorpos para A2, que faz com que o animal, mesmo depois de vacinado, continue negativo nos exames sorológicos que utilizam formas promastigotas, não interferindo nos inquéritos epidemiológicos preconizados pelo Ministério da Saúde (Fernandes *et al.*, 2008). Esta vacina, chamada Leishtec, está sendo testada experimentalmente em Minas Gerais (<http://www.hertapecalier.com.br>).

Mesmo assim, com o desenvolvimento de outras vacinas para LVC, novos estudos devem ser conduzidos nesta área. Para um controle eficaz, o diagnóstico precoce da doença ainda está incluído nos protocolos de prevenção.

1.5. Diagnóstico da LVC

O diagnóstico da LVC pode ser feito por diferentes métodos, todos semelhantes aos empregados na LVH. O diagnóstico clínico é um método difícil de ser realizado devido não só a presença de manifestações clínicas variadas, mas pela grande quantidade de animais assintomáticos e também pelo fato de alguns sinais clínicos da LVC serem semelhantes a outras patologias. As alterações laboratoriais encontradas no hemograma e em testes bioquímicos, como função renal e hepática, são inespecíficos. Portanto, a confirmação do

diagnóstico é baseada nos métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares. Vale ressaltar que no município de Campo Grande (MS) o cão só é eutanasiado mediante a execução simultânea de um segundo exame diagnóstico comprobatório, ou seja, devem ser realizados dois métodos sorológicos para a confirmação do diagnóstico (<http://www.tjms.jus.br/cposg/pcpoResultadoConsProcesso2Grau.jsp>).

O diagnóstico parasitológico é realizado pela observação, ao microscópio, de formas amastigotas do parasito obtidos de esfregaços de punções de linfonodos, medula óssea e pele. Alguns autores observaram que nos aspirados de medula óssea a sensibilidade do teste parasitológico é maior que no aspirado de linfonodo (Alvar *et al.*, 2004). Estes procedimentos são invasivos, e algumas vezes os proprietários dos cães não autorizam sua execução. Além da citologia, a biópsia de pele é indicada para histopatologia que também pode detectar a presença de formas amastigotas pela técnica de coloração hematoxilina-eosina. Apesar do exame parasitológico ser ainda considerado padrão ouro para o diagnóstico da doença (Singh & Sivakumar, 2003), resultados falso-negativos no caso de ausência do parasito na amostra retirada ou na falta de interesse em retirar amostras de cães assintomáticos podem ocorrer. Para minimizar este problema, uma outra técnica mais sensível, a imuno-histoquímica está sendo introduzida para o diagnóstico da LVC (Tafuri *et al.*, 2004). Esta técnica utiliza imunoglobulinas conjugadas a enzimas que identificam antígenos parasitários em cortes histológicos parafinados ou congelados, tornando-se um teste mais específico, sensível e de fácil execução (Ferrer *et al.*, 1988). Um outro teste parasitológico utilizado é o crescimento de parasitos em cultura, um método muito útil na detecção do parasito na amostra de tecido retirada. Mas nem toda amostra de *Leishmania* tem bom desenvolvimento em meios padronizados. Além disso, o fragmento do órgão processado pode não conter parasitos suficientes, o que diminui a sensibilidade do teste.

O xenodiagnóstico é outra técnica utilizada para a detecção e isolamento de parasitos na qual se testa a infecção do seu vetor natural. Estudos divergem quanto à taxa de infecção de flebotomíneos do Velho e Novo mundo. Apesar de ser uma ferramenta excelente para estudos epidemiológicos da LVC, o xenodiagnóstico é raramente utilizado, pois necessita de colônias de flebotomíneos bem estabilizadas em laboratórios especializados (Maia e Campino, 2008).

Quando não é possível a visualização do parasito pelas técnicas supracitadas, os métodos sorológicos são empregados para detectar a relação antígeno-anticorpo presentes numa infecção. A sensibilidade e a especificidade são parâmetros utilizados para validação de um teste sorológico, onde a primeira está relacionada com a porcentagem de resultados

positivos na população de doentes, e a segunda é definida como a percentagem de resultados negativos numa população de sadios, ou seja, que não foram acometidos pela doença.

Um grande avanço para o diagnóstico sorológico da LV foi o a reação de fixação de complemento (RFC), que empregava antígeno extraído do bacilo da tuberculose. Em inquéritos caninos, foi observado que esta técnica possuía sensibilidade e especificidade melhores que o exame direto (Nussenzweig *et al.*, 1957). Porém, a RFC encontra-se em desuso devido à grande quantidade de reações cruzadas com doença de Chagas e LTA (Alves e Bevilacqua, 2004). O teste de aglutinação direta (DAT) é mais um método sorológico de fácil execução, rápido, não necessitando de equipamentos para leitura do resultado e nem de reagentes que dependem de refrigeração (Meredith *et al.*, 1995; Schallig *et al.*, 2001). No teste são utilizados promastigostas íntegras ou fragmentadas de *Leishmania*, que são aglutinadas diretamente com os anticorpos anti-*Leishmania*, entretanto o resultado além de ser subjetivo devido à leitura ser feita a olho nu, necessita de um período de incubação de 18 horas (Harith *et al.*, 1989). Apesar destas limitações, alguns autores consideram o DAT como uma boa ferramenta diagnóstica para LV, principalmente quando empregada no campo (Silva *et al.*, 2005). Em estudos com cães de áreas endêmicas, o DAT mostrou sensibilidade que varia de 70-100% e especificidade de 80-100% (Mohebalí *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2006). Outro método sorológico muito frequente em diagnóstico de LVC é o Western blot, que detecta anticorpos específicos utilizando antígenos de *Leishmania* ligados a uma matriz de nitrocelulose (Neogy *et al.*, 1992). Não é um teste muito aplicado para diagnóstico de rotina porque necessita de habilidade técnica além de ser caro e demorado (Ferroglío *et al.*, 2007). Por outro lado, alguns autores sugerem a importância do Western blot no diagnóstico da LVC, demonstrando que este método pode ser mais sensível que a RIFI pela detecção precoce dos animais infectados (Silva *et al.*, 2005).

Atualmente, o teste recomendado pelo Ministério da Saúde em inquéritos soropidemiológicos caninos é a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), que geralmente utiliza formas promastigotas do parasito fixados em lâminas para posterior reação com anticorpos. Esta técnica demonstra sensibilidade que varia de 90 a 100% e especificidade de aproximadamente 80%, mas é limitada em termos de reprodutibilidade. Um estudo com cães assintomáticos e sintomáticos de áreas endêmicas utilizando a RIFI como diagnóstico demonstrou uma sensibilidade de 85,5% e especificidade de 94,7% ao teste (Maia *et al.*, 2008). A especificidade deste teste não é a ideal devido à presença de reações cruzadas com doenças causadas por outros tripanossomatídeos, como doença de Chagas e LTA (Alves e Bevilacqua, 2004). Outro teste sorológico que teve sua primeira descrição por Engvall e Perlmann (1971), é o imunoenensaio enzimático-ELISA, que tem tido sucesso para o

diagnóstico de várias doenças infecciosas. Esta técnica é tão sensível quanto a RIFI para diagnóstico de leishmaniose, e é aplicada para estudos em grande escala (Hommel *et al.*, 1978). Diversas variações de ELISA surgiram para seu aprimoramento, como o Dot-ELISA (Pappas *et al.*, 1984), Fast-ELISA (Ashford *et al.*, 1993), micro ELISA (Hommel *et al.*, 1978), fucose manose ligant-ELISA - FML-ELISA (Palatnik *et al.*, 1996), que utilizam antígenos brutos ou purificados de *Leishmania* spp. Um estudo observou sensibilidade de 94-100% em cães assintomáticos e de 100% em cães sintomáticos, utilizando promastigotas ou amastigotas solúveis no teste ELISA (Mettler *et al.*, 2005). Atualmente as pesquisas têm explorado a utilização de antígenos recombinantes na técnica de ELISA, a fim de melhorar a sensibilidade e especificidade, além da facilidade de sua obtenção em relação aos antígenos purificados. Dentre os antígenos recombinantes mais estudados, estão o A2 (Carvalho *et al.*, 2002), k26 (Bhatia *et al.*, 1999) e rK39, este último sendo o mais promissor no diagnóstico da LV (Burns *et al.*, 1993). Um estudo realizado com estas três proteínas mostrou que o rk26 e rk39 tiveram boa sensibilidade na detecção de cães sintomáticos, 94% e 100% respectivamente, e a proteína A2, comparada aos outros, mostrou uma sensibilidade maior em cães assintomáticos e uma especificidade de 98% (Porrozzi *et al.*, 2007). O rk39 é um antígeno recombinante que possui alta sensibilidade e alta especificidade quando utilizado no ELISA para diagnóstico de LVH. Trata-se de uma proteína relacionada à família das quinesinas expresso nas espécies de *Leishmania* do complexo *L. donovani* (Singh *et al.*, 1995; Zijlstra *et al.*, 2001). Vários trabalhos têm sido realizados utilizando o rk39 no teste ELISA, um deles examinou mais de seis mil soros caninos comparando-o com o teste RIFI. Os resultados revelaram uma variação na sensibilidade do ELISA k39 quando comparada com a RIFI (70 a 100%) entre os diferentes autores (Scalone *et al.*, 2002). A partir da rk39, foi desenvolvido um teste imunocromatográfico simples e rápido, fixando esta proteína em papel (Teste Rápido Anticorpo *Leishmania donovani* –TRALd) para reagir com o sangue ou o soro do paciente (Badaró *et al.*, 1996). Este antígeno possui epítomos de alta densidade, e uma proteína A conjugada com ouro coloidal permite uma rápida ligação do rk39 com o anticorpo anti-*Leishmania* específico (Reed *et al.*, 1996), produzindo resultados em até 10 minutos. Este método vem sendo utilizado no diagnóstico de LVH no Sudão e na Índia, com bons resultados em relação à sensibilidade, entretanto pode apresentar reação cruzada com malária, febre tifóide e tuberculose (Gontijo e Melo, 2004). Para o diagnóstico da LVC, o teste mostrou sensibilidade de 92% e especificidade de 99,5%, não sendo capaz de detectar a infecção nos títulos entre 1:40 a 1:320 (Genaro *et al.*, 1997). O teste imunocromatográfico está sendo aplicado atualmente de forma experimental no Brasil para o diagnóstico da LVC (Silva *et al.*, 2001), podendo ser indicado ao programa de controle da doença por ser de fácil execução e

aplicável no campo sem necessidade de profissionais altamente especializados, caso apresente resultados satisfatórios. Além disso, o teste pode ser capaz de detectar diferentes formas clínicas de cães infectados por *L. (L.) chagasi* (Lemos *et al.*, 2008).

A reação em cadeia de polimerase (PCR) é um dos métodos moleculares utilizados para diagnóstico da LVH e LVC, que permite não só identificar e ampliar seletivamente sequências de DNA do parasito, mas também monitorar a cura parasitológica depois da quimioterapia (Pennisi *et al.*, 2005; Francino *et al.*, 2006; Manna *et al.*, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2007). Esta técnica permite uma rápida detecção de pequenas quantidades de DNA do parasito, mesmo em presença de grandes quantidades de DNA do hospedeiro. Uma outra vantagem desta técnica é a diversidade de material clínico que pode ser utilizado no teste para detecção do DNA do parasito, como sangue, medula óssea, biópsias cutâneas, aspirados de linfonodo, coração, pênis, vagina, sêmen, placenta, rim, intestino, urina, swabs de conjuntiva entre outros (Andrade *et al.*, 2002; Reithinger *et al.*, 2002; Barrrouin-Melo *et al.*, 2005; Diniz *et al.*, 2005; Rosypal *et al.*, 2005; Franceschi *et al.*, 2006). A técnica tem sido utilizada também em estudos epidemiológicos visando detectar a presença do parasito nas diferentes espécies de vetores (Osman, 1998). A sensibilidade máxima da técnica tem sido obtida quando são empregadas sequências de cópias múltiplas para alvo da PCR, como gene dos RNA ribossomais, do k-DNA, regiões repetitivas do genoma, entre outras. Um dos grandes problemas do emprego do PCR é que esta técnica depende de laboratórios bem estruturados e técnicos habilitados para executá-la. Outra desvantagem é a sensibilidade em determinados tipos de amostra, como o sangue, onde não se encontra quantidade de parasito suficiente para ser detectado no teste (Lachaud *et al.*, 2002). Um método de diagnóstico que não se enquadra nas técnicas acima por estar relacionado à imunidade celular, é o teste de Montenegro. Este resulta na hipersensibilidade do tipo retardada para antígenos de *Leishmania*, onde é inoculado intradermicamente uma suspensão de promastigotas inativas diluídas em formol ou metiolate. A leitura está relacionada com o endurecimento no local da inoculação após um período de 48-72h, ou seja, será positivo dependendo do diâmetro da lesão formada pelo inoculo. (Fernández-Bellón *et al.*, 2005).

Muitos autores procuram obter um método específico para o diagnóstico sorológico da LVC principalmente com a utilização de antígenos recombinantes e purificados de *Leishmania*, que apresentem mais sensibilidade ao teste e que não produzam reações cruzadas com antígenos de outras doenças. Atualmente a baixa especificidade é uma das maiores limitações dos testes diagnósticos que utilizam antígenos tradicionais (Passos *et al.*, 2005; Rosário *et al.*, 2005). Geralmente os antígenos utilizados no teste ELISA, indicado pelo Ministério da Saúde, são oriundos da sonicação de formas promastigotas de *L. (L.) chagasi*.

As frações subcelulares de *Leishmania* obtidas por técnica de fracionamento subcelular têm se mostrado bastante imunogênicas nos protocolos de vacinação no modelo murino. Tanto a fração flagelar (FF) como a fração microsomal (FMic) foram capazes de proteger camundongos contra uma infecção por *L. (L.) amazonensis* quando utilizadas em associação a imunomoduladores (Gonçalves da Costa *et al.*, 1988; Gaspar, 2005; do Valle *et al.*, 2007). Paula (2003) mostrou através da técnica de western-blotting que uma banda da FMic de *Leishmania*, com aproximadamente 35 kDa, era majoritariamente reconhecida pelo soro de camundongos injetados com três doses da mesma fração. Esta banda também era reconhecida por animais infectados por *L. (L.) amazonensis*. Diante deste contexto, este trabalho visa aumentar o conhecimento sobre o potencial antigênico destas frações subcelulares no teste ELISA, avaliando sua especificidade e sensibilidade no diagnóstico da LVC.

OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a antigenicidade das frações subcelulares de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* na técnica imunoenzimática (ELISA) para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar bioquimicamente as frações subcelulares de *L. (L.) amazonensis* ;
- Padronizar um teste ELISA utilizando como antígenos frações subcelulares de *L. (L.) amazonensis*;
- Determinar a especificidade e sensibilidade do teste ELISA com as frações subcelulares de *L. (L.) amazonensis*.
- Comparar os resultados obtidos pelo ELISA com frações subcelulares de *L. (L.) amazonensis* com os obtidos pelo ELISA de Biomanguinhos;

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. População (amostras)

Os soros caninos testados neste trabalho foram provenientes de levantamentos soropidemiológicos, realizados em regiões endêmicas para LVC. Os soros foram cedidos pelo laboratório de leishmanioses do CPqRR (Belo Horizonte, MG), e pelo laboratório de parasitologia da UFMS (Campo Grande, MS). Os soros controles negativos (n=53) foram oriundos de cães saudáveis com testes parasitológicos e sorológicos negativos para *Leishmania* spp. Estão incluídos no grupo de controles negativos soros caninos com sorologia e teste parasitológico positivos para *Trypanosoma cruzi* (n=6) e negativos para *Leishmania* spp. Os soros utilizados como controles positivos (n=88) foram provenientes de cães parasitologicamente positivos para *L. (L.) chagasi*, seja através da demonstração dos parasitos por *imprint* de lesão ou pela cultura de aspirado de medula óssea, e com titulação de anticorpos anti-*Leishmania* acima de 1:80 pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI). A partir dos resultados da sorologia e em associação aos sinais clínicos apresentados, os animais foram classificados em assintomáticos (n=33), oligossintomáticos (n=18) e sintomáticos (n= 37).

3.2. Manutenção dos parasitos

Foi utilizada a cepa MHOM/BR/76/Ma-5 de *L. (L.) amazonensis*. Esta amostra foi isolada de um caso humano de leishmaniose cutânea difusa e caracterizada pela técnica de lectinas (Schotelius e Gonçalves da Costa, 1982) e isoenzimas (Grimaldi *et al.*, 1991).

A manutenção dos parasitos foi realizada no laboratório de Imunomodulação e Protozoologia - IOC, *in vivo* e *in vitro*. No primeiro caso, a *L. (L.) amazonensis* foi mantida por passagens seriadas em camundongos BALB/c. Estes animais foram inoculados com 10^4 formas amastigotas do parasito em um volume final de 0,05ml de PBS por via subcutânea no coxim traseiro esquerdo. A cada três meses, quando surgiam as lesões, os animais eram eutanasiados, tendo as lesões retiradas assepticamente para o isolamento dos parasitos, que posteriormente foram inoculados em novos animais ou semeados em meio de cultura bifásico a 24° C para manutenção *in vitro* dos parasitos.

In vitro, as formas promastigotas do parasito foram mantidas em cultura axênica a 24 °C, em estufa incubadora BOD (Fanem - 347). O meio de cultura empregado era composto por duas fases: uma fase sólida de ágar-sangue (Nicolle, 1908b; Navy & MacNeal, 1904) e uma fase líquida, o LIBHIT. Este último é uma modificação do meio Liver Infusion Tryptose (LIT), inicialmente desenvolvido por Yeager (Fernandes et al, 1965), com diferentes concentrações de componentes orgânicos a fim de melhorar as condições de crescimento do parasito (Gonçalves da Costa & Lagrange, 1981). A cultura foi examinada e repicada a cada

sete dias, quando os parasitos encontravam-se em fase estacionária de crescimento (Pessotti, 2001).

A utilização de camundongos no presente trabalho se restringe à manutenção da cepa da espécie *L.(L.) amazonensis* que é um procedimento de rotina do laboratório e está licenciado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais nº. L0001/07.

3.3. Obtenção das frações subcelulares

Foi realizado o cultivo de *L. (L.) amazonensis* em meio LIBHIT em larga escala para obtenção das frações subcelulares dos parasitos conforme técnica desenvolvida por Pereira e cols. (1978), com pequenas modificações. O fracionamento foi realizado após 6-7 dias de cultivo, quando as promastigotas encontravam-se em fase estacionária. Após observação de alíquotas para exclusão de garrafas contaminadas, as culturas foram centrifugadas a 4000rpm por 10 minutos e a massa do parasito obtida foi lavada 3 vezes em um tampão de lavagem (TPMN) e, em seguida, ressuspensa em uma solução hipotônica (tampão S) por 20 minutos para que as células ficassem túrgidas. A seguir, 1ml para cada grama de massa de parasito de detergente não iônico, lubrol PX, na concentração de 10%, foi adicionado e os parasitos rompidos sob a ação mecânica de um homogeneizador Dounce (Konter Glass, Vineland, NJ, EUA), empregando-se o pistilo B. Este procedimento, assim como todo o resto, foi realizado sempre em banho de gelo a fim de minimizar a ação de proteases.

Em seguida, as condições isotônicas foram reajustadas e as células íntegras foram retiradas através de centrifugação à baixa velocidade, 750g por 90 segundos. Nesta etapa foi retirada uma alíquota do material, sendo denominada de homogeneizado total (HT). O restante do material foi, então, centrifugado duas vezes a 5.000g por 10 minutos. O sobrenadante foi centrifugado novamente a 27.000g por 30 minutos, sendo o sedimento desta centrifugação ressuspensa em 1ml de PBS e denominado de fração de membrana (FM). O sobrenadante foi depositado em uma coluna de 2ml de solução de sacarose a 20% em tampão TMK, em tubos de polialômeros e a seguir, esse preparado foi centrifugado a 100.000g no rotor SW41Ti em ultracentrífuga Beckman, durante 45 minutos. O sedimento obtido nessa última centrifugação foi ressuspensa em 1ml de PBS e denominado fração microssomal (FMic). O sedimento da centrifugação a 10.000g também foi aproveitado, sendo ressuspensa em uma solução de sacarose 0,25M e posteriormente centrifugado a 11.000g por 10 minutos, obtendo-se, no sedimento, a fração de flagelo (FF) bruta. Esta foi, então, purificada em um gradiente de sacarose. Para isso foi ressuspensa em sacarose a 5%, depositada em um colchão formado por sacarose a 25% e centrifugada a 700g por 10 minutos em uma centrífuga clínica. A camada superior e a interface foram recolhidas e colocadas sobre um novo colchão de

sacarose 25%. Mais uma vez o material foi centrifugado à 500g e, desta vez, somente a camada superior foi recolhida e centrifugada uma última vez a 12.000g por 10 minutos sobre um colchão de sacarose 25% em rotor de ângulo fixo. O sedimento obtido foi ressuspenso em 1ml de PBS, obtendo-se a FF purificada. O material foi aliquoteado e estocado em freezer -70° C até o uso

Todas as centrifugações em rotor de ângulo fixo foram realizadas em centrífuga Beckman-Avanti J-25, com rotor JA-10 e JA-20.

3.4. Dosagem de proteína

O teor protéico de cada fração subcelular foi dosado pelo método de Bradford (1976). Para isso foi construída uma curva padrão com concentrações conhecidas de albumina bovina fração V (BSA). Diferentes concentrações desta proteína (5, 10, 15 e 20µg) foram diluídas em água bidestilada (quantidade suficiente para – qsp.- 50µL) e acrescidas de 2,5mL de solução de Bradford. Após 10 minutos foi feita a leitura de sua absorbância a 590nm em um espectrofotômetro (Beckman-DU640). Um tubo somente com água bidestilada (50µL) e solução de Bradford foi utilizado como branco da reação. Após a confecção da curva padrão o mesmo procedimento foi utilizado para dosar a absorbância de tubos contendo 5µL de cada uma das frações, água bidestilada qsp 50µL e reagente de Bradford. A concentração protéica em cada amostra foi calculada a partir da inclinação da reta obtida na curva padrão.

3.5. Eletroforese

Foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS) para se comparar o perfil protéico de cada fração subcelular, seguindo a técnica descrita por O’Farrel (1975). Foram preparados dois géis de corrida com 10% e 12% de poliacrilamida com um gel de empacotamento com 4% do polímero. Vinte microgramas de cada fração foram diluídos em tampão de amostra e aquecidos a 95 °C por 5 minutos para que as proteínas fossem desnaturadas. O mesmo procedimento foi realizado com um padrão de peso molecular contendo proteínas entre 209 e 7kDa (BioRad – Broad range 161-0318). As amostras, assim como o padrão, foram aplicadas aos géis preparados em uma cuba para eletroforese (BioRad – Mini Protean 3 cell) que foi completada com tampão de corrida. O gel foi submetido a uma diferença de potencial de 80v gerada por uma fonte (Hoefer - OS 500XT).

Após a corrida, o gel foi posto em solução de coloração por 30 minutos e, em seguida, solução de descoloração até que ficasse transparente, sendo em seguida digitalizado utilizando-se um “Scanjet” HP –2400.

3.6. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Alíquotas de cada uma das frações subcelulares foram fixadas por 1 hora em 2,5% de glutaraldeído (Sigma, G6257) em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7.2) com 3,5% de sacarose a 4 °C. Em seguida, foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixados por 30 minutos com 1% de tetróxido de ósmio (Sigma, O5500) em tampão cacodilato de sódio. Posteriormente, foram desidratados em concentrações crescentes de acetona e incluídos em resina (Poly-bed 812). Após polimerização em estufa a 60 °C os blocos foram clivados. O material foi então contrastado com acetato de uranila e citrato de chumbo (Reynolds, 1963) e observado em um microscópio eletrônico de transmissão Zeiss–EM10C.

3.7. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A técnica foi empregada nos soros utilizados neste trabalho para confirmação dos resultados das titulações informadas e realizadas nas instituições de pesquisa que cederam o material.

Para realização da técnica utilizamos o kit IFI BIOMANGUINHOS. Para a titulação cada soro foi descongelado, diluído em PBS na concentração de 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 e 1:640, e 10µl pingados nos poços das lâminas previamente sensibilizadas com antígenos. Soros controle positivo e negativo também foram usados. As lâminas foram incubadas por 30 minutos em câmara úmida e ao final lavadas 3 vezes em PBS por 5 minutos cada lavagem. Em seguida, todos os poços das lâminas receberam anticorpo anti-IgG canino conjugado a um fluorocromo (FITC), sendo incubadas mais uma vez por 30 minutos diluído a 1: 100. Finalmente, as lâminas foram lavadas mais 3 vezes e montadas com glicerina (9:1) diluída em PBS, utilizando-se lamínulas 24x32mm. A fluorescência dos antígenos foi analisada em um microscópio óptico Zeiss – Axiolab equipado com HBO50 e a titulação estabelecida pela última diluição onde foi possível observar a fluorescência do antígeno.

3.8. Adsorção dos antígenos (frações subcelulares) nas placas de microtitulação:

Foram utilizadas placas de polietileno (NUNC Maxisorp e NUNCLON). Para estabelecer a concentração do conjugado-peroxidase anti-IgG cão (SIGMA), foram adsorvidos inicialmente 1µg de cada fração diluídos em 100µL de PBS estéril por poço. Foram utilizados três soros caninos positivos com titulação de 1:640 pela técnica de RIFI e três soros negativos para LVC para os controles, e a técnica de ELISA empregada conforme descrição abaixo. Foram testadas quatro concentrações do conjugado: 1:5.000, 1:25.000, 1:50.000 e 1:80.000. Para estabelecer a concentração ideal de proteína adsorvida em cada poço, foram estabelecidas quatro concentrações de cada fração subcelular: 125ng, 250ng,

500ng e 1µg, os quais foram distribuídos na placa, diluídos em 100µL de PBS estéril em cada poço. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C durante 2 horas e depois deixadas overnight a 4 °C. Após a etapa de adsorção, as placas foram lavadas no aparelho Wash ELISA com solução de 0,05% de Tween 20 em PBS por 4 vezes. Após a lavagem foi retirado o excesso da solução e as placas foram estocadas no freezer para realização da técnica de ELISA.

3.9. Técnica de ELISA

Neste trabalho foi utilizada uma variante da técnica de ELISA denominada ELISA-indireto, que prevê a captura antigênica seguida da reação com anticorpo específico. A reação é revelada através do uso de um segundo anticorpo marcado com uma enzima (peroxidase) dirigido contra o primeiro anticorpo presente no soro de um cão positivo para LVC (anticorpos de cão para *L. (L.) chagasi*). No caso, a ação da oxidoreductase, sobre o substrato água oxigenada adicionado, gera oxigênio que por sua vez oxida um segundo composto presente no meio reacional (TMB), conduzindo-o do estado incolor para o estado colorido (azul), que finalmente em meio de ácido forte, apresenta-se na cor amarela. Após a etapa da adsorção dos antígenos, para diluição dos soros e do conjugado foi feita uma solução bloqueadora de 1% de leite em pó desnatado, 0,2% de gelatina, 1% de citrato de sódio e 1% de soro de cabra em 100mL de PBS. Os soros foram diluídos 1:100 nesta solução (dilúente do soro e conjugado - DSC) e distribuídos na placa em 100µL cada poço. A placa foi incubada por 30 minutos em estufa a 37 °C. Após incubação, a placa foi lavada quatro vezes com 0,05% de Tween 20 em PBS. O anticorpo monoclonal anti-IgG canino conjugado a peroxidase foi diluído 1:80.000 na solução DSC e 100µL desta solução foram colocados em todos os poços e a placa incubada por 30 minutos a 37 °C. Após esta etapa, as placas foram lavadas novamente quatro vezes, e a reação foi evidenciada através da adição 10mg/mL de tetramethyl benzidine (TMB), tampão citrato-fosfato e 30% de H₂O₂. Foram colocados 100µL desta solução em todos os poços e a placa deixada em câmara escura por 15 minutos em temperatura ambiente. A reação foi bloqueada colocando-se 50µL de ácido sulfúrico 8M nos poços. A reação colorimétrica foi lida a 490nm sem a utilização de filtro de referência em um espectrofotômetro de placa (BioRad-Benchmerck Microplate Reader).

3.10. Reprodutibilidade do ELISA

Para avaliar a reprodutibilidade do teste utilizando as frações subcelulares foram realizados o intra-ensaio e o inter-ensaio. A precisão intra-ensaio foi verificada determinando-se a média das absorbâncias de 15 repetições para um mesmo soro controle negativo e um

mesmo positivo, em uma mesma placa. A precisão inter-ensaio foi determinada utilizando as médias das triplicatas das absorbâncias de 15 repetições para um mesmo soro negativo e, da mesma forma, para um positivo, em placas e dias diferentes.

3.11. Análise estatística dos dados

Para análise da sensibilidade, especificidade e *Cut-Off* do teste ELISA para cada antígeno (frações subcelulares e antígeno bruto do kit EIE BIOMANGUINHOS) foi utilizada a curva ROC (Receiver Operating Characteristic). Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa estatístico MedCalc®.

RESULTADOS

4.1. Identificação e caracterização bioquímica das frações subcelulares

4.1.1. Microscopia eletrônica de transmissão

Nossos resultados de microscopia eletrônica confirmaram os dados já publicados por Zaverucha do Valle *et al.* (2007). Estes mostraram que as diferentes frações apresentam poucos contaminantes.

A FF apresentou um axonema típico com 9 pares periféricos e 2 centrais de microtúbulos. As membranas dos flagelos não se apresentaram aderidas a estes, provavelmente em função do tratamento pelo lubrol, que é fundamental para o rompimento das promastigotas. A FM manteve a camada sub-pelicular de microtúbulos e raramente formou vesículas. Nas membranas vesiculadas observa-se a camada dos microtúbulos na face externa. A FMic apresentou vesículas e uma concentração elevada de ribossomos (**Figura 4.1**).

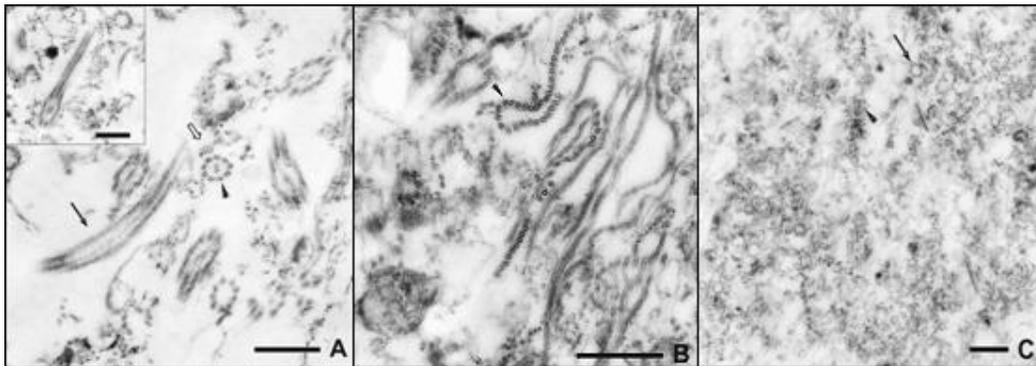


Figura 4.1 - Microscopia eletrônica de transmissão das frações subcelulares de *L. (L.) amazonensis*. **A)** A fração flagelar enriquecida mostra uma estrutura flagelar tradicional com um par de microtúbulos central e 9 pares periféricos (cabeça de seta). O corpo paraxial pode ser visto (seta vazada) em corte transversal, sem estar associado à membrana flagelar. Microtúbulos podem ser visualizados em orientação oblíqua (janela) ou longitudinal (seta preta). **B)** Fração enriquecida de membrana claramente demonstra a camada de microtúbulos subpericardial (cabeça de seta). A membrana não forma vesículas. **C)** Fração microsomal enriquecida apresentando pequenas vesículas (seta) e grande número de ribossomos (cabeça de seta). (Todas as barras = 0,5 μ m).

4.1.2. Eletroforese

A análise dos componentes macromoleculares mostrou que o componente de 55kDa da FF estava bastante enriquecida em relação às bandas de FM e de FMic. A fração FMic apresentou vários componentes protéicos, e como se trata de uma fração que contém microsomas rugosos, algumas bandas correspondem as proteínas ribossomais. Pelos resultados da microscopia eletrônica a FM também apresentou tubulina, mas de baixo teor protéico. A visualização dos diferentes componentes macromoleculares foi possível pela técnica de coloração pelo Coomassie Blue (**Figura 4.2**).

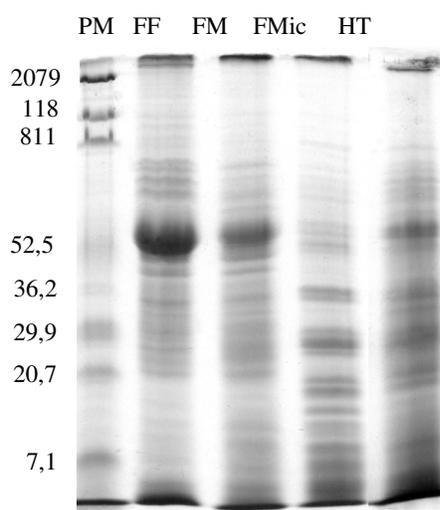


Figura 4.2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS das frações subcelulares de *L. (L.) amazonensis*. PM (Peso molecular padrão); FF (fração de flagelo; FM (fração de membrana); FMic (fração microsomal); HT (homogeneizado total).

4.2. Padronização do ensaio imunoenzimático utilizando as frações subcelulares

Após a identificação e caracterização das proteínas de cada fração subcelular, estas foram adsorvidas na placa de microtitulação. Foram testados o tampão fosfato, o tampão carbonato/bicarbonato, diferentes concentrações de antígenos (125ng a 1µg) e diferentes concentrações do conjugado anti IgG canino comercial SIGMA (1:10.000; 1:25.000; 1:50.000 e 1:80.000). A melhor diluição do conjugado para esta etapa foi 1:50.000. Além disso, nossos resultados também indicaram que não houve diferença entre as densidades ópticas (DOs) independente do tipo de tampão utilizado. A partir destes dados, todos os ensaios imunoenzimáticos foram conduzidos com o tampão PBS.

Observamos que tanto a concentração de 125ng/poço quanto a de 1000ng/poço de cada fração testada foi suficiente para obtenção de resultados satisfatórios (**Figura 4.3 e 4.4**). Porém, para minimizar erros na adsorção do antígeno, evitou-se a utilização de concentrações inferiores a 500ng, sendo esta a concentração padrão utilizada para a adsorção dos antígenos na placa.

De uma maneira geral, os valores de DO obtidos foram semelhantes aos já padronizados para o teste ELISA BIOMANGUINHOS, ou seja, valores de DO dos soros positivos > 0,5 e dos negativos <1,2.

Outras diluições dos soros positivos e negativos (1:10, 1:50, 1:100 e 1:200) também foram avaliadas ao longo deste trabalho. Os resultados indicaram que a diluição de 1:100 dos soros manteve-se satisfatória na diferenciação entre os grupos controles – soros negativos e soros positivos.

Todos estes experimentos de padronização foram conduzidos com a placa Maxisorp Loose. Além disso, nós também avaliamos estas condições padronizadas utilizando as placas Falcon 3072 e Nunclon. Os nossos resultados indicaram que a placa Maxisorp Loose proporcionou resultados mais homogêneos entre os valores de DO dos soros caninos negativos e positivos, seguido da placa Nunclon. Desta forma, a placa Maxisorp Loose foi mantida para os ensaios posteriores.

Os resultados das análises das precisões intraensaio e interensaio estão sumarizados nas **tabelas 4.1 e 4.2**. Estes mostram que o coeficiente de variação dos soros negativos e positivos não ultrapassou 15% nos dois ensaios, tendo apenas a FMic uma variação maior no inter-ensaio de 21,4% em relação ao soro positivo.

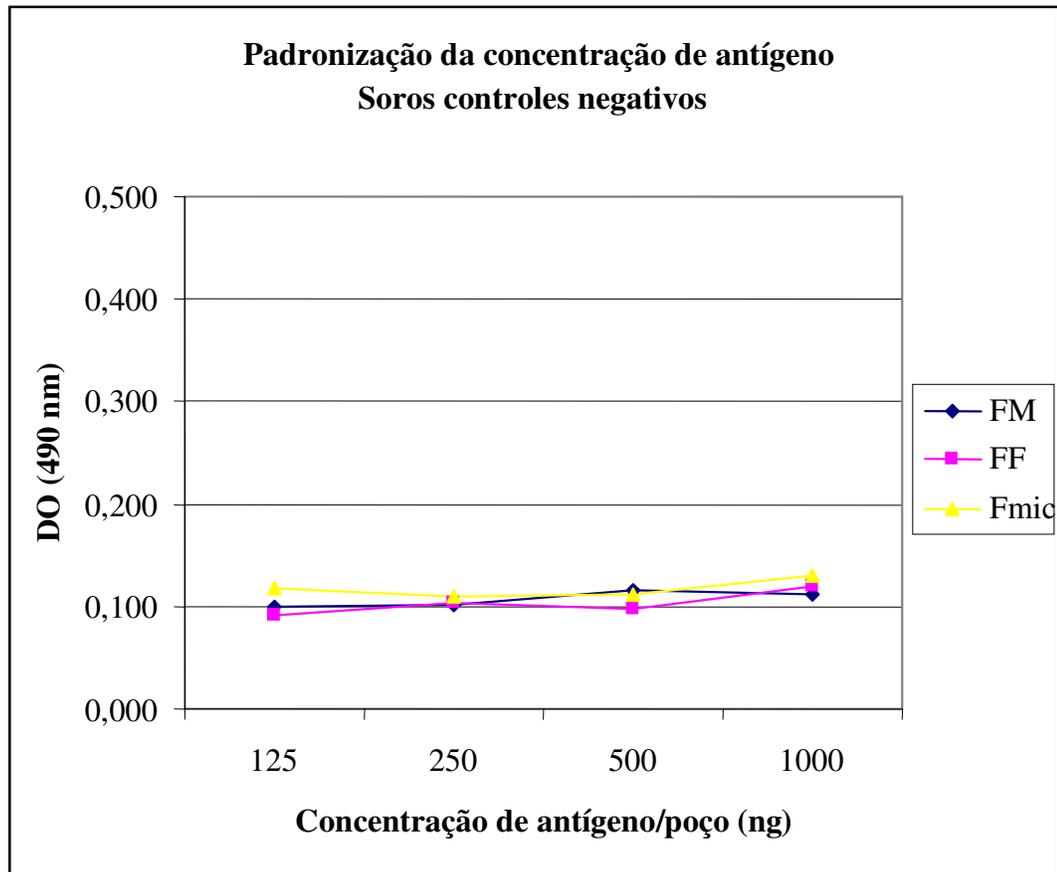


Figura 4.3- Análise dos valores de absorvâncias de amostras de soros caninos parasitológicamente negativos para *Leishmania (L.) chagasi* no ELISA com frações subcelulares de *Leishmania (L.) amazonensis*.

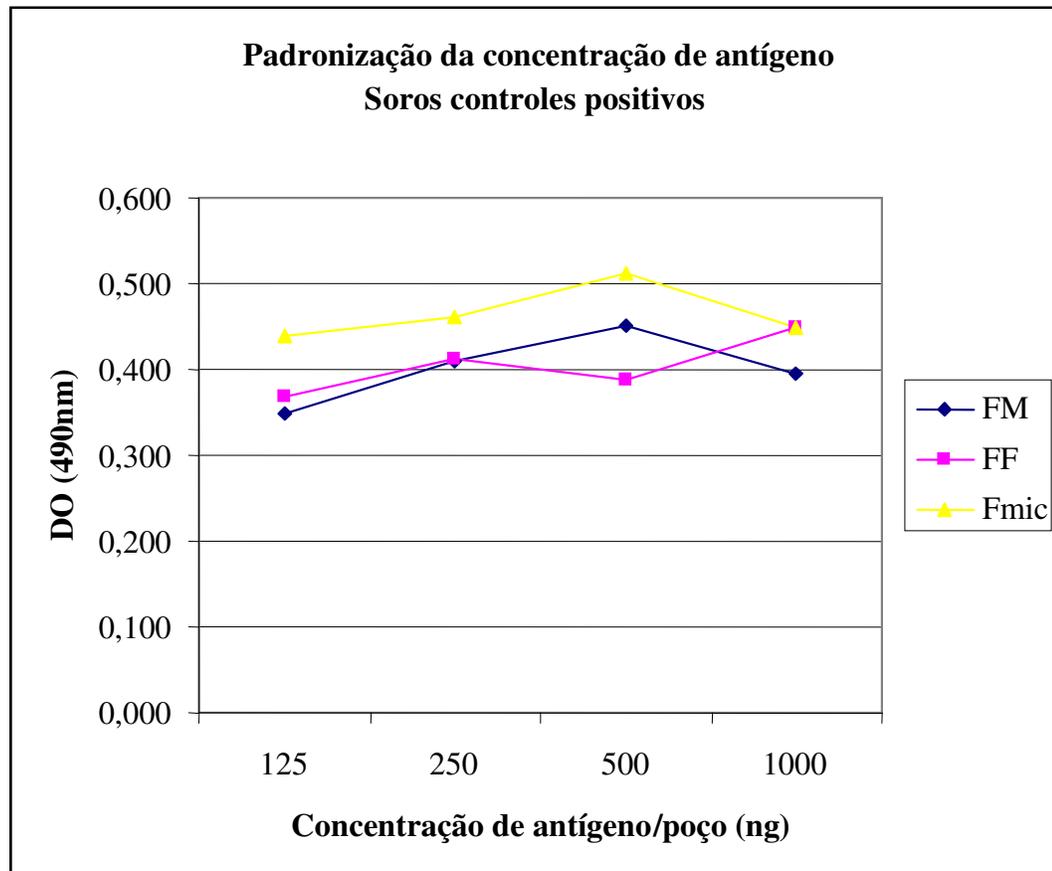


Figura 4.4- Análise dos valores de absorvâncias de amostras de soros caninos parasitológicamente positivos para *Leishmania (L.) chagasi* no ELISA com frações subcelulares de *Leishmania (L.) amazonensis*.

Tabela 4.1 - Precisão intraensaio determinada com 15 replicatas de um mesmo soro negativo e de um mesmo soro positivo, em uma mesma placa.

Frações	Soros	n	Média	DP	IC (95%)	CV %
FM	Negativo	15	0,072	0,009	(0,054 - 0,089)	12,5
	Positivo	15	0,694	0,047	(0,601 - 0,786)	6,7
FF	Negativo	15	0,072	0,006	(0,060 - 0,083)	8,3
	Positivo	15	0,668	0,106	(0,460 - 0,875)	15,8
FMic	Negativo	15	0,072	0,006	(0,060 - 0,0837)	8,3
	Positivo	15	0,694	0,040	(0,615 - 0,772)	5,7

FM (fração de membrana), FF (fração de flagelo) e FMic (fração microsomal) de *L.(L.) amazonensis*, (DV) Desvio padrão das absorbâncias, (n) número de ensaios; (IC) intervalo de confiança; (CV) coeficiente de variação

Tabela 4.2 - Precisão interensaio determinada com 15 replicatas de um mesmo soro negativo e de um mesmo soro positivo, em placas e dias diferentes.

Frações	Soros	n	Média	DP	IC (95%)	CV %
FM	Negativo	15	0,06	0,009	(0,042 – 0,077)	15
	Positivo	15	0,290	0,036	(0,219 – 0,360)	12,4
FF	Negativo	15	0,061	0,008	(0,045 – 0,076)	13,1
	Positivo	15	0,341	0,046	(0,250 – 0,431)	13,4
FMic	Negativo	15	0,058	0,004	(0,050 – 0,065)	6,8
	Positivo	15	0,289	0,062	(0,167 – 0,410)	21,4

FM (fração de membrana), FF (fração de flagelo) e FMic (fração microsomal) de *L.(L.) amazonensis*, (DV) Desvio padrão das absorbâncias, (n) número de ensaios; (IC) intervalo de confiança; (CV) coeficiente de variação

4.3. Antigenicidade das frações subcelulares nos testes imunoenzimáticos.

A antigenicidade das frações subcelulares foi analisada pela técnica ELISA padronizada, utilizando os soros controles positivos e negativos. Para cada fração foi determinado um valor de corte (*Cut-Off*), a sensibilidade e especificidade através da curva ROC, mostrados na **tabela 4.3**. Os valores de sensibilidade e especificidade foram bem semelhantes em todos os testes, sendo igual ou superior a 90% nas frações FM e FMic e antígenos brutos, e inferior a 90% apenas na fração FF. O mesmo acontece com a especificidade, sendo a FM com o maior valor de 98,1%.

Ao analisar o gráfico de dispersão de cada fração subcelular, podemos observar o número de soros falso-positivos e falso-negativos nos testes ELISA, o que foi avaliado também no teste de contingência de dupla entrada.

A **figura 4.5** apresenta o ensaio em que se usou como antígeno a fração FM de *L. (L.) amazonensis*, mostrando que 97,7 % das amostras de soros positivos para LVC apresentaram absorvâncias acima do *Cut-Off*, ou seja, apenas um soro (2,3%) foi considerado falso-negativo. Em relação aos soros negativos, 13,2% foram considerados falso-positivos.

A **figura 4.6** mostra a distribuição dos soros com a fração FF de *L. (L.) amazonensis*. Pode-se observar que sete soros positivos (8%) tiveram valor abaixo do *Cut-Off* sendo considerados falso-negativos, e 28,3% dos soros negativos foram falso-positivos, destes, cinco soros com reação cruzada com soros reagentes para *T. cruzi*.

A **figura 4.7** apresenta os resultados da fração FMic de *L. (L.) amazonensis*, onde 4,5% dos soros positivos foram falso-negativos, e 13,2% dos soros negativos foram falso-positivos. A distribuição dos soros com o antígeno bruto do kit BIOMANGUINHOS está representada na **figura 4.8**, em que 10,2% dos soros positivos foram falso-negativos e 13,2% dos soros negativos foram falso positivos, não havendo reação cruzada com os soros de *T. cruzi*.

A **tabela 4.4** apresenta a taxa de positividade do ELISA com frações subcelulares de *L. (L.) amazonensis* nas amostras obtidas de animais de diferentes condições clínicas.

A **figura 4.9** apresenta a comparação entre as curvas ROC dos antígenos estudados. O melhor desempenho do teste foi com a fração FM, pois esta apresentou maior área sob a curva, que foi expressa também em valores na **tabela 4.5**. Estes dados também mostraram que as áreas sob a curva da FM, FMic e de BIO foram próximas, sendo a FF o antígeno que apresentou menor área sob a curva. A **tabela 4.6** mostra a comparação entre as áreas das curvas de cada teste. A menor diferença foi entre FM-FMic e FMic-Bio. A diferença mais

significativa ($p=0,000$) foi entre FM e FF. Entre os demais ensaios, as diferenças entre as áreas foram mínimas.

Tabela 4.3 - Parâmetros sorológicos das frações subcelulares de *Leishmania (L.) amazonensis* utilizadas como antígenos nos ensaios imunoenzimáticos.

Antígenos	Sensibilidade %	Especificidade %	Cut-Off
FM	95,5	98,1	0,219
FF	89,8	88,7	0,145
FMic	93,2	94,3	0,138
Antígenos brutos	89,9	92,5	0,150

FM (fração de membrana), FF (fração de flagelo) e FMic (fração microsomal)

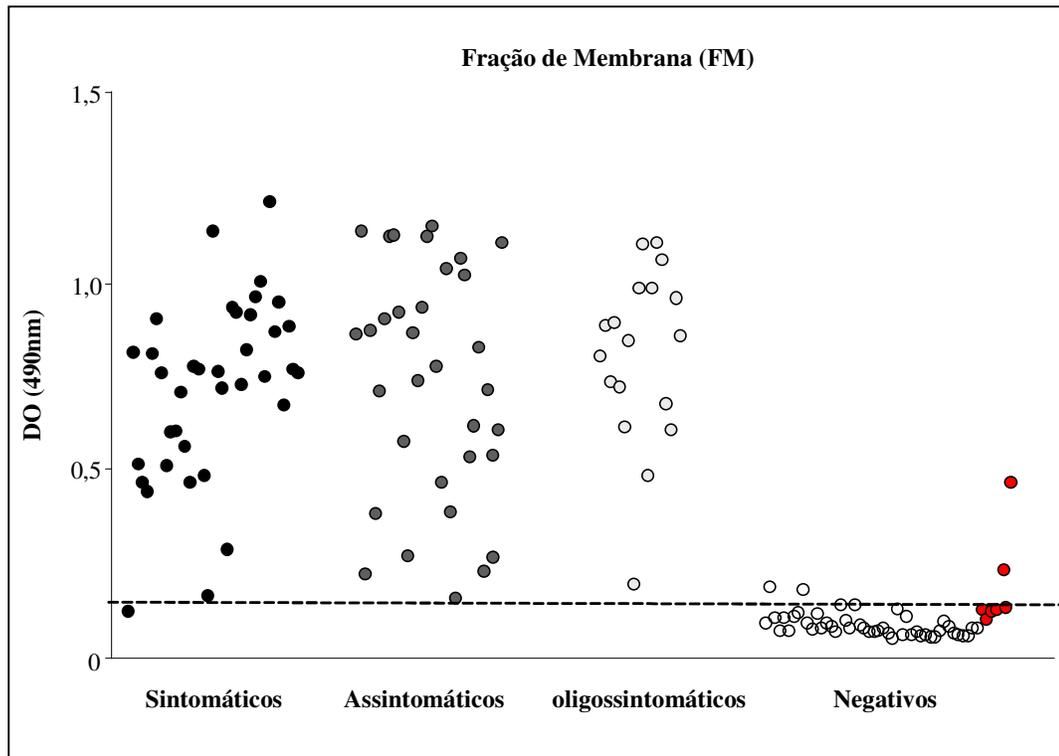


Figura 4.5 - Representação gráfica do ELISA para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* utilizando como antígeno a fração de membrana (FM) de *L. (L.) amazonensis*. A linha pontilhada plotada no gráfico representa o valor de DO do *Cut-Off* (0,219). Dentre os soros negativos encontram-se os soros reagentes para *T. cruzi* (pontos vermelhos). As absorvâncias dos ensaios foram medidas a 490nm.

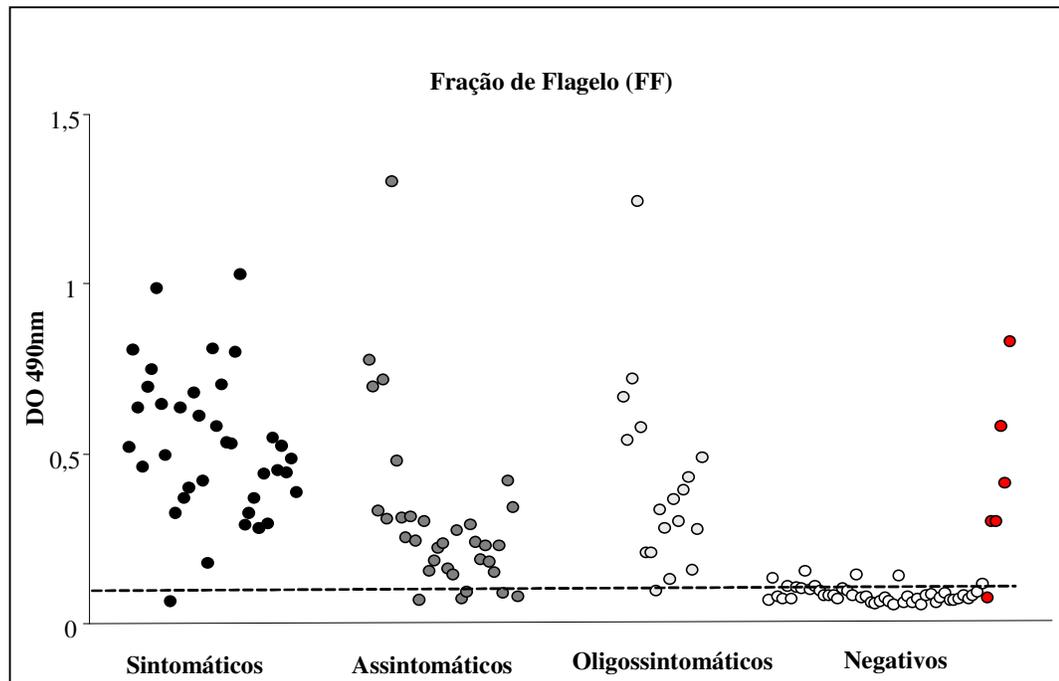


Figura 4.6 - Representação gráfica do ELISA para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* utilizando como antígeno a fração de flagelo (FF) de *L. (L.) amazonensis*. A linha pontilhada plotada no gráfico representa o valor de DO do *Cut-Off* (0,145). Dentre os soros negativos encontram-se os soros reagentes para *T. cruzi* (pontos vermelhos). As absorvâncias dos ensaios foram medidas a 490nm..

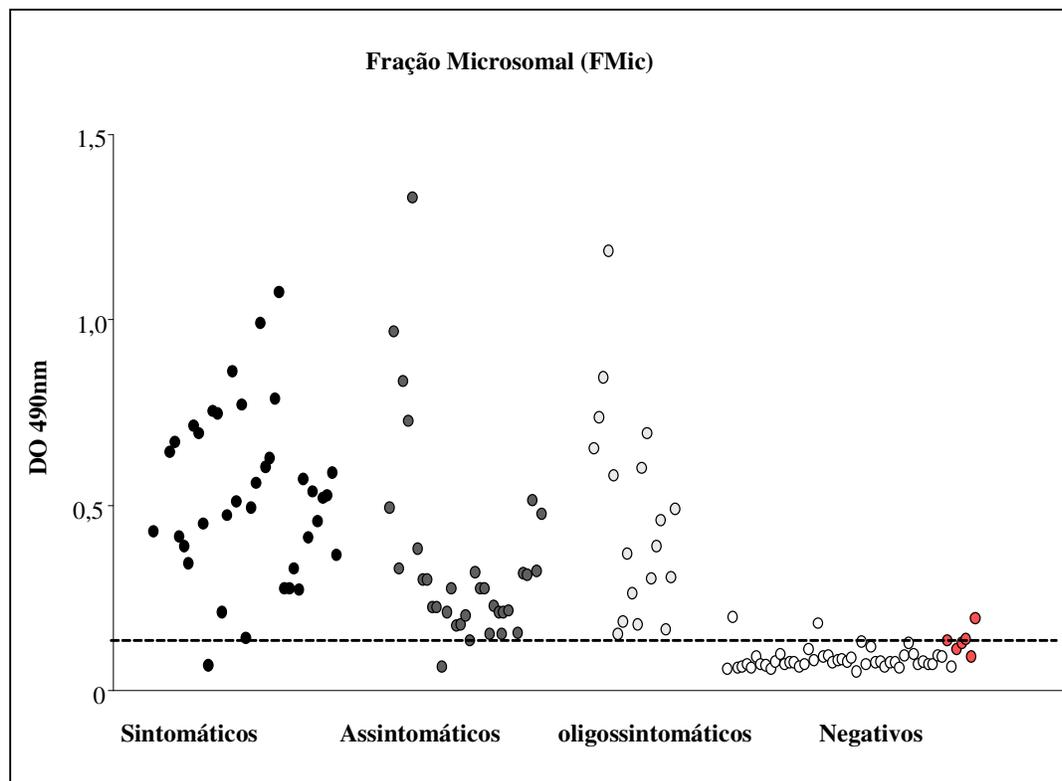


Figura 4.7 - Representação gráfica do ELISA para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* utilizando como antígeno a fração microsomal (FMic) de *L. (L.) amazonensis*. A linha pontilhada plotada no gráfico representa o valor de DO do Cut-Off (0,138). Dentre os soros negativos encontram-se os soros reagentes para *T. cruzi* (pontos vermelhos). As absorbâncias dos ensaios foram medidas a 490nm..

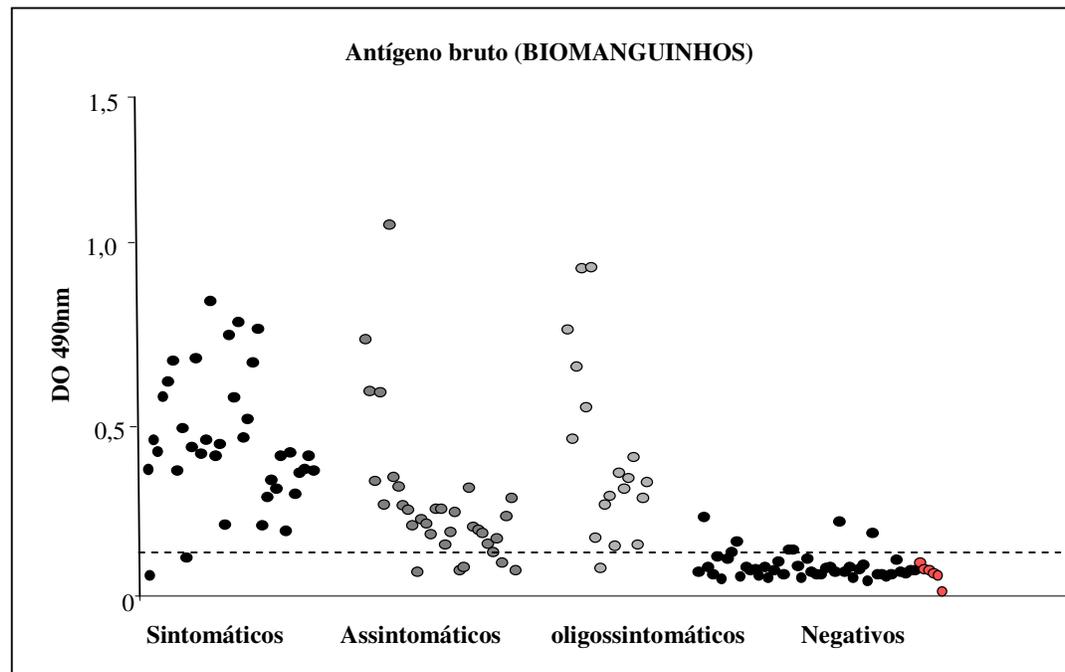


Figura 4.8 - Representação gráfica do ELISA para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* utilizando o kit ELISA - BIOMANGUINHOS. A linha pontilhada plotada no gráfico representa o valor de DO do *Cut-Off* (0,150). Dentre os soros negativos encontram-se os soros reagentes para *T. cruzi* (pontos vermelhos). As absorbâncias dos ensaios foram medidas a 490nm.

Tabela 4.4 – Positividade do ELISA com as frações subcelulares de *Leishmania (L.) amazonensis* e antígenos brutos de *Leishmania* spp. nos diferentes grupos clínicos.

Características Clínicas	Total de soros	FM n (%)	FF n (%)	FMic n (%)	Ags. brutos n (%)
Assintomáticos	33	33 (100)	28 (84,8)	32 (96,7)	28 (84,8)
Oligosintomáticos	18	18 (100)	17 (94,4)	18 (100)	17 (94,4)
Sintomáticos	37	36 (97,3)	36 (97,3)	36 (97,2)	34 (94,4)
Não infectados	53	4 (7,5)	9 (17)	3 (5,7)	7 (13,2)

FM (fração de membrana), FF (fração de flagelo), FMic (fração microsomal), Ags brutos (antígenos brutos de Biomanguinhos); n (número de soros que reagiram no ELISA).

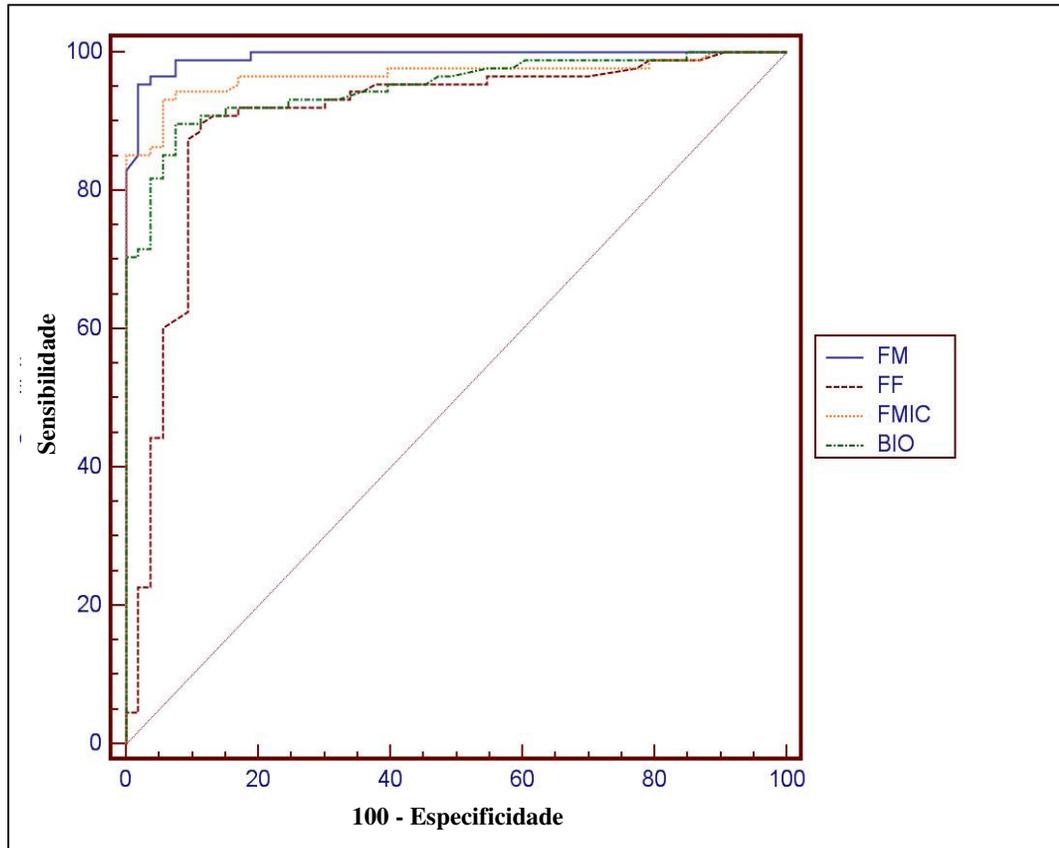


Figura 4.9 - Comparação entre as curvas ROC de todos os antígenos utilizados: fração de membrana (FM); fração de flagelo (FF); fração microsomal (FMic) de *L. (L.) amazonensis*; e (BIO) antígeno bruto do kit BIOMANGUINHOS.

Tabela 4.5 - Valores das áreas sob a curva ROC

Antígenos	AUC*	EP**	IC (95%) ***
FM	0,994	0,006	0,962 a 0,999
FF	0,903	0,025	0,842 a 0,947
FMic	0,968	0,014	0,923 a 0,990
BIO	0,949	0,017	0,898 a 0,979

•Área sob a curva ROC (*Area Under the Curve- AUC*); **Erro padrão; ***Intervalo de confiança

FM (fração de membrana), FF (fração de flagelo) e FMic (fração microsomal) de *L.(L.) amazonensis*, BIO (kit ELISA – BIOMANGUINHOS).

Tabela 4.6 - Comparação entre as áreas sob a curva ROC de todos os antígenos estudados

Frações	Diferença entre as áreas sob a curva	EP*	IC (95%) **	Significância (p=)
FM x FF	0,09	0,020	0,04-0,13	0,000
FM x FMic	0,02	0,010	-0,002-0,045	0,07
FM x BIO	0,04	0,010	0,009-0,008	0,014
FF x FMic	0,06	0,020	0,023-0,106	0,002
FF x BIO	0,04	0,020	0,0006-0,009	0,047
FMic x BIO	0,01	0,018	-0,0179-0,0554	0,310

*Erro padrão; ** Intervalo de confiança.

FM (fração de membrana), FF (fração de flagelo) e FMic (fração microsomal) de *L.(L.) amazonensis*, BIO (kit ELISA – BIOMANGUINHOS).

DISCUSSÃO

A técnica de imunoenensaio enzimática, ELISA, é uma ferramenta útil devido ao seu fácil manuseio, possibilidade de diagnóstico coletivo, e obtenção de resultado independente da subjetividade da leitura, como acontece em outros testes sorológicos. Um dos objetivos do ELISA é determinar com precisão a menor concentração para a substância a ser analisada. Entretanto, a padronização deste teste é problemática, principalmente quando o antígeno a ser utilizado é uma proteína. Isto ocorre devido a vários fatores como: perda de proteína no momento do descongelamento da mesma; pipetagem manual, que pode interferir na concentração da proteína a ser adsorvida; homogeneização correta da proteína com o tampão, dentre outros. Estes fatores podem influenciar o resultado final, podendo proporcionar um resultado falso-negativo ou falso-positivo, não só para diagnóstico de LVC, mas para outros tipos de padronização de ELISA (Stenman, 2001).

A padronização do ELISA utilizando as frações subcelulares de *L. (L.) amazonensis* realizada no presente trabalho também apresentou algumas dificuldades, como a obtenção das concentrações ideais do anticorpo conjugado e da proteína a ser adsorvida nas placas. Os soros controles utilizados para esta etapa foram diluídos 1:100 como proposto na técnica EIE de Biomanguinhos. Após encontrar a diluição ideal do conjugado, nossos resultados mostraram que independente da concentração de proteína adsorvida, ou seja, utilizando 0,125ng ou 1µg de proteína por poço, de qualquer fração subcelular, é possível diferenciar soros controles positivos de soros controles negativos. Isso pode representar uma das vantagens da utilização destas frações como antígenos no ELISA. Na padronização do tampão para adsorção das proteínas, optamos por utilizar o tampão fosfato, que também é utilizado por outros autores em protocolos de ELISA (Araújo *et al.*, 1998; Mettler *et al.*, 2005; Malaquias *et al.*, 2007). Um estudo para otimização desta técnica realizada por outros autores avaliou a eficácia de quatro tampões diferentes para diluição de antígenos de *Leishmania*. Os autores obtiveram melhores resultados quando utilizaram o PBS (Rajasekariah *et al.* 2001). Em nosso trabalho também testamos outro tampão para diluição dos antígenos, o tampão carbonato-bicarbonato. Entretanto, não houve diferenças nos resultados quando comparamos os dois tampões. Tanto o PBS como o tampão carbonato-bicarbonato discriminou bem os valores de DO dos soros negativos e positivos para cada fração subcelular. Através destes resultados, avaliamos a reprodutibilidade e repetibilidade pelo intratesto (intraensaio) e interteste (interensaio). A precisão intratesto refere-se à repetição do teste no mesmo ensaio, utilizando um mesmo soro negativo e positivo em vários poços da placa, ou seja, por ensaios em replicata do mesmo material. A precisão interteste refere-se à repetição da mesma amostra em testes realizados em dias e placas diferentes, também por pessoas diferentes. Os resultados obtidos nesses testes devem ser homogêneos, à medida que se repetem nas mesmas condições,

e serão verificados através do coeficiente de variação (CV). Nossos resultados revelaram que no intraensaio a fração microsomal (FMic) foi a fração subcelular que apresentou menor CV quando testada com soros controles positivo (5,7%) e negativo (8,3%), seguida das frações de membrana (FM) e flagelar (FF). No interensaio, os valores dos CV foram semelhantes com a utilização das três frações subcelulares, tendo um menor valor na fração FMic relacionado ao soro negativo, porém, no soro positivo o CV foi maior que 20%. Sabe-se que quanto menor for o coeficiente de variação, melhor será a reprodutibilidade do teste, portanto, os valores do CV no intraensaio foram bem promissores, atingindo o máximo de 15%. Um estudo utilizando antígeno recombinante no ELISA revelou um CV inferior a 10% tanto no intraensaio como no interensaio (Boarino *et al.*, 2008). Estes dados foram semelhantes aos nossos resultados com a FM e a FMic no intraensaio, mas no interensaio foram bem menores em relação ao nosso, provavelmente por utilizarem diferentes antígenos ou diferentes esquemas de padronização.

Os parâmetros sorológicos como a sensibilidade, especificidade e linha de corte (Cut-Off) foram avaliados através da curva ROC (Receiver Operating Characteristic). Geralmente os valores de cutoff no ELISA e em outros testes diagnósticos são estabelecidos como a média das absorbâncias das amostras da população de referência negativa mais dois desvios padrões. Entretanto, alguns autores consideram que essa metodologia pode conduzir a erros (Barjas-Rojas e col. 1993, Richardson, 1998). A curva Roc foi introduzida como um método estatístico para determinar as características operacionais de um ensaio de laboratório e, mesmo, para comparação entre dois ou mais ensaios, evitando os problemas que ocorrem quando são utilizados outros métodos (Zweig e col., 1993, Gall & Nielsen, 2001). Optamos por esse teste estatístico porque ele permite a análise da variação da sensibilidade e especificidade para diferentes valores de corte, além da comparação entre os ensaios avaliados através de um gráfico, o que torna mais simples e compreensível a análise dos resultados (Greiner *et al.*, 2000; Ribeiro *et al.*, 2007). Na análise estatística utilizando a curva ROC, ao comparamos a área sob a curva obtida com o emprego da FM e da FMic, não observamos diferenças significativas entre elas ($P=0,07$), podendo-se concluir que ambas as frações apresentam bom desempenho no teste. A antigenicidade da FMic pode ser explicada por esta possuir antígenos intracelulares que permitem boa imunoreatividade sorológica. Trabalhos realizados para avaliação das características bioquímicas de cada fração subcelular de *L. (L.) amazonensis*, verificaram a existência de um epítipo protéico presente no peptídeo de 35kDa na FMic. Este epítipo se mostrou imunodominante durante a resposta humoral após imunizações sucessivas com a fração no modelo murino, e poderia estar também enriquecido na FM (Paula, 2003). Estes dados corroboram os dados obtidos neste trabalho, onde as frações

FM e FMic mostraram melhor desempenho e antigenicidade semelhantes no teste ELISA. Requena *et al.* (2000) criaram o termo pan-antígeno para agrupar antígenos conservados que se apresentam como potentes imunógenos durante a infecção por *Leishmania* spp. Segundo os autores, para que um antígeno seja encaixado nesta categoria é necessário que tenha as seguintes características: ser um abundante componente celular; ter um alto grau de conservação durante a evolução; formar uma estrutura estável e com diferentes componentes; ser alvo para autoanticorpos em doenças autoimunes (Requena *et al.*, 2001). Dentre os pan-antígenos sugeridos por eles, estão diferentes componentes intracelulares como histonas, proteínas de choque térmico (HSPs) e proteínas ribossomais. É possível que alguns destes componentes, especialmente as proteínas ribossomais, estejam presentes na FMic, explicando assim, o seu grande poder imunogênico (Paula, 2003).

A sensibilidade de um teste diagnóstico é determinada pela porcentagem de amostras positivas detectados pelo teste entre as amostras sabidamente positivas. A especificidade, pela porcentagem de amostras negativas, também previamente determinadas por outras técnicas de diagnóstico. Um resultado é considerado falso positivo quando uma amostra é sabidamente negativa, entretanto, apresenta resultado positivo no teste avaliado. Ao contrário, um resultado falso negativo é aquele obtido em amostras sabidamente positivas (Lira *et al.*, 2005). Os resultados obtidos com as três frações subcelulares, no presente trabalho, apresentaram valores bem semelhantes quanto à sensibilidade e especificidade. Com a FM obtivemos 95,5% e 98,1%, com a FMic 93,2% e 94,3% e com a FF 89,8% e 88,7% respectivamente. Apenas a FF apresentou um desempenho inferior em relação às outras duas frações e ao antígeno bruto de *Leishmania* spp, que apresentou 89,9% de sensibilidade e 92,5% de especificidade. Estes resultados foram pouco superiores aos achados por Lira *et al.* (2005), que observaram sensibilidade de 72% e especificidade de 87,5% no kit EIE Biomanguinhos quando aplicado em cães sintomáticos e parasitologicamente positivos para LVC. A fração que apresentou melhor desempenho no teste ELISA foi a FM, em relação não só às outras frações mas também ao antígeno bruto de Biomanguinhos. Provavelmente isto se deve à localização destas proteínas no parasito. São com estas proteínas que as células do sistema imunológico do hospedeiro têm o primeiro contato.

Através dos gráficos de dispersão foi possível observar que não houve diferença entre os valores de DO obtidos com soros de cães sintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos. A FM e a FMic foram as frações que menos apresentaram resultados falso-positivos e falso-negativos. Já a FF e os antígenos brutos de Biomanguinhos apresentaram resultados falso-negativos consideráveis, principalmente nas amostras de cães assintomáticos, (4/33) e (6/33) respectivamente. A detecção de praticamente 100% dos cães assintomáticos na

FM e FMic indicam resultados promissores para o diagnóstico de LVC, já que cães assintomáticos possuem baixa produção de anticorpos na infecção por *Leishmania* spp. Portanto, estas frações mostraram alta sensibilidade na detecção de anticorpos no grupo dos cães assintomáticos, o que chama atenção para estudos mais aprofundados no potencial antigênico destas.

A reação de Imunofluorescência Indireta, que emprega antígenos brutos, ainda é o método preconizado pelo Ministério da Saúde em inquéritos soro-epidemiológicos para determinação da incidência de LVH e LVC (SVS, 2006). Entretanto, um estudo comparando duas técnicas de diagnóstico, RIFI e ELISA, revelou que a aplicação destes antígenos nos testes sorológicos deve ser feito em conjunto, ou seja, um único teste sorológico utilizando antígenos brutos não seria suficiente para o diagnóstico de LVC, havendo a necessidade de ser utilizado pelo menos dois testes sorológicos (Lira *et al.*, 2005). Nos nossos resultados, os antígenos brutos utilizados no Kit Biomanguinhos não apresentaram reação cruzada com nenhum soro positivo para *T. cruzi*, mas sua especificidade foi comprometida por apresentar uma considerável quantidade de falso-negativos.

A utilização de antígenos recombinantes e purificados no teste ELISA melhora a sensibilidade e especificidade do diagnóstico para LV (Reed *et al.*, 1990; Scalone *et al.*, 2002; Rosário *et al.*, 2005). Porrozi *et al.* (2007) avaliaram os antígenos recombinantes k26, k39 e A2 no teste ELISA para diagnóstico de LVC. Os antígenos rk26 e rk39 demonstraram alta sensibilidade na detecção de cães sintomáticos, 93% e 100%, respectivamente; enquanto o rA2 mostrou ser mais sensível para detecção dos cães assintomáticos, sugerindo a utilização destes antígenos na identificação de cães infectados. As proteínas recombinantes também estão sendo utilizadas em técnicas imunocromatográficas para diagnóstico rápido da LV em áreas endêmicas. Os kits imunocromatográficos dispensam as etapas de incubação e aparelhos para leitura, sendo de fácil manuseio para qualquer profissional em trabalhos de campo onde, em geral, a infraestrutura é precária. Quando foi utilizado um teste imunocromatográfico utilizando o rk39, Teste rápido para antígenos de *Leishmania donovani* (TRALd), não foi observado reação cruzada com outras doenças como: leishmaniose cutânea, doença de Chagas, tuberculose, hanseníase e esquistossomose (Badaró, 1996). O mesmo teste aplicado em cães de áreas endêmicas para LVC apresentou sensibilidade e especificidade elevadas, porém o teste não foi capaz de detectar a infecção em cães com títulos de anticorpos inferiores a 1:320 obtidos pela RIFI (Genaro *et al.*, 1997). Existem outros testes imunocromatográficos, a maioria utiliza o antígeno rk39 para diagnóstico de LVH e LVC, como o DiaMed IT Leish e o kalazar detect™. Este último teve seu desempenho avaliado em cães com e sem sinais clínicos de LVC, e comparado ao ELISA com antígenos brutos de *Leishmania* spp. Os autores

observaram uma sensibilidade menor que a obtida com o ELISA, 83% contra 95%, e especificidade de 100% nos dois testes (Lemos *et al.*, 2008). Pode-se notar que a especificidade é alta quando se utilizam antígenos recombinantes nos testes sorológicos, porém a sensibilidade é prejudicada na maioria deles. Devemos ressaltar também que a técnica da produção destes antígenos é trabalhosa devido à produção de plasmídeos bacterianos para sua obtenção, além de requerer estrutura apropriada para sua produção.

Escolhemos a espécie *L.(L.) amazonensis* para obtenção das frações subcelulares utilizadas neste trabalho primeiramente porque embora esta espécie esteja relacionada às manifestações cutâneas da leishmaniose, vários trabalhos têm demonstrado a visceralização desta espécie para órgãos como o cérebro (Abreu-Silva *et al.*, 2003), fígado, baço (Almeida *et al.*, 1996; Abreu-Silva *et al.*, 2004) e medula óssea (Barral *et al.*, 1986; Barral *et al.*, 1991). Outro fator é a possibilidade dessa espécie estar sendo transmitida por flebotomíneos no peridomicílio e ser responsável por uma condição clínica bem semelhante à LV causada por *L. (L.) chagasi* em cães (Tolezano *et al.*, 2007). Além disso, trabalhos recentes observaram a possibilidade de se utilizar antígenos de *L. (L.) amazonensis* no teste ELISA para diagnóstico de LVC (Rosário *et al.*, 2005; Valle *et al.*, 2008) e LVH (Badaró *et al.*, 1985), com valores de sensibilidade e especificidade semelhantes aos encontrados nos nossos trabalhos utilizando frações subcelulares. Somado a tudo isso, a *L. (L.) amazonensis*, diferentemente da *L.(L.) chagasi*, possui excelente crescimento em meio de cultura líquido, proporcionando o crescimento de promastigotas em larga escala em um tempo menor e, conseqüentemente, obtenção de quantidades satisfatórias de proteínas nas frações subcelulares através da técnica de fracionamento.

O fracionamento subcelular é uma das ferramentas da biologia molecular muito utilizada para verificar a localização ou isolamento de proteínas na célula (Wilson *et al.*, 1992; Luga *et al.*, 2009; Sant'Anna *et al.*, 2009). O fracionamento subcelular de tripanossomatídeos foi inicialmente desenvolvido por Pereira *et al.* (1978), e tinha como objetivo a obtenção de proteínas concentradas de *Trypanosoma cruzi*, que seriam purificadas e avaliadas pelas suas propriedades imunogênicas, para protocolos de vacinação associados à imunomoduladores. A técnica foi adaptada a outras espécies de tripanossomatídeos, como *L. (L.) amazonensis*, que mostrou resultados bem diferentes em relação à fração de membrana, que possui um perfil bioquímico mais próximo ao da fração de flagelo. No caso do *T. cruzi*, a FM forma vesículas (Pereira *et al.*, 1978), enquanto a FM de *L. (L.) amazonensis* apresenta microtúbulos associados sem formação de vesículas (do Valle *et al.*, 2007). As frações subcelulares de *Leishmania (L.) amazonensis* têm sido utilizadas em associação a imunomoduladores em protocolos de imunização no modelo murino. Estudos anteriores da

nossa equipe utilizando frações de membrana (FM), flagelo (FF) ou fração microsomal (FMic) de *L. (L.) amazonensis* em associação com dois imunomoduladores, o BCG e a ciclofosfamida, mostraram uma indução da resposta Th1 em camundongos (do Valle *et al.*, 2007). Gonçalves da Costa & Lagrange (1981), também em experimentos *in vivo*, mostraram a imunogenicidade da FF de *T. cruzi* associada à imunomoduladores na doença de Chagas experimental. A idéia de empregar estas frações foi baseada em duas hipóteses. Em primeiro lugar, estas frações se mostram na forma de componentes particulados que seriam mais indicados do que os componentes solúveis para a indução de imunidade celular. Além disso, algumas das frações ribossomais expressam epítomos imunogênicos e indutores de respostas ligadas à imunoproteção. Assim, estas seriam privilegiadas por apresentarem em suas estruturas, componentes com propriedades adjuvantes, como por exemplo, grande concentração de RNA (Paula, 2003).

Devido à progressiva urbanização e expansão geográfica, a leishmaniose visceral (LV) vem apresentando mudanças importantes em seu padrão de transmissão, acometendo regiões anteriormente consideradas indenes, como a região sul do país (Costa, 2008). O controle da doença tem se mostrado difícil, e a experiência adquirida nas últimas décadas revela a necessidade de se utilizar medidas de controle de forma integrada, o que inclui diagnóstico precoce e controle de vetores e reservatórios. Entre as estratégias preconizadas pelo Ministério da Saúde, a eliminação dos reservatórios caninos constitui uma importante ação que, para ser executada, exige uma correta identificação dos cães infectados. Alguns autores discordam desta estratégia baseando-se em estudos de correlação entre a incidência da leishmaniose visceral canina (LVC) e a leishmaniose visceral humana (LVH). Dados obtidos entre os anos de 1990 e 1994 revelaram que mais de 80.000 cães com LVC foram eutanasiados no Brasil, porém, a doença humana aumentou em quase 100% neste período (Ribeiro, 2007). Fato parecido ocorreu em um estudo feito no Espírito Santo, onde foi visto que a eliminação de cães infectados não resultou diferença estatisticamente significativa entre a incidência da conversão sorológica da doença em humanos (Dietze *et al.*, 1997). Outro estudo de controle para LV mostrou que a eliminação dos cães, a curto e médio prazos, é insuficiente para a erradicação da LVC, e a longo prazo, não promove diferenças estatísticas em relação às áreas sem intervenção (Ashford *et al.*, 1998). Por outro lado, alguns autores consideram a eutanásia dos cães uma alternativa válida para o controle da doença, pois através de estudos realizados em áreas endêmicas, observaram que a doença canina precede a doença humana, sendo a LVC responsável pelo avanço da LVH (Oliveira *et al.*, 2001; Falqueto *et al.*, 2009). Frente a estes conflitantes estudos em relação ao impacto da eliminação de cães soropositivos no controle da LV no Brasil, é de extrema importância evitar a eutanásia de cães

falso-positivos, levando-se em consideração o papel sócio-cultural que esses animais representam para a sociedade. Além disso, com o advento de uma vacina no mercado, a Leishmune®, torna-se importante diferenciar animais vacinados de animais infectados, pois a vacina induz uma sorologia positiva para LVC, mesmo que estes não apresentem infecção (Borja-Cabrera *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2007). O teste diagnóstico ideal deve reunir características essenciais como baixo custo, facilidade de execução, resultado rápido, e alta sensibilidade e especificidade, evitando assim reações cruzadas com outras doenças (Waneska & Bevilacqua, 2004).

Muitos estudos têm focado a procura de um antígeno ideal para ser utilizado em testes sorológicos para LV. Apesar da introdução de novas técnicas na área de diagnóstico, ainda não há disponível um teste que reúna não só o melhor antígeno, mas todas as características consideradas desejáveis para um diagnóstico eficaz. As frações subcelulares de *L. (L.) amazonensis* mostraram-se antigênicas no ELISA, principalmente quando comparadas aos antígenos brutos. Além da padronização, há a necessidade de estudos mais aprofundados para a aplicação destas frações no diagnóstico de LVC. Nossas perspectivas estão relacionadas com a busca e caracterização de proteínas mais antigênicas presentes nas frações FF e FMic, para uma possível utilização em diagnósticos sorológicos mais eficazes. Além disto, pretendemos também testar a eficácia destas frações em ELISA para investigações soropidemiológicas em gatos (*Felis catus*). O estudo da infecção em gatos vem ganhando importância para a Saúde Pública não apenas no Brasil, como também na Europa (Mancianti, 2004; Silva *et al.*, 2008). Pode ser que o gato tenha uma importante participação no ciclo de transmissão da doença, o que também pode estar associado com a expansão da LV no Brasil e no mundo. Desta maneira, poderemos contribuir para o desenvolvimento de um Kit que nos permita avaliar o papel desse animal como possível reservatório doméstico da LV.

CONCLUSÕES

1. A técnica de fracionamento subcelular de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* empregada neste trabalho revelou-se satisfatória para obtenção das frações de membrana, de flagelo e microsomal, mostrando que estas possuem perfis distintos de polipeptídeos
2. As três frações subcelulares de *L. (L.) amazonensis* revelaram diferentes graus de antigenicidade para detecção de anticorpos anti-IgG de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi*.
3. Os valores de sensibilidade e especificidade dos ensaios imunoenzimáticos avaliados pelo teste da curva ROC, com as frações de membrana e microsomal, foram maiores quando comparado ao extrato total do parasito - kit de Biomanguinhos.
4. A maioria dos soros do grupo assintomático foi positivo no ELISA utilizando as três frações subcelulares testadas.
5. As frações de membrana e microsomal tiveram desempenhos semelhantes no teste; a FM teve sensibilidade de 95,5% e especificidade de 98,1%, maior área sob a curva ROC, e apresentou menor número de resultados falso-positivos e falso-negativos, quando comparadas aos antígenos brutos utilizados no ELISA. Isto sugere que a fração de membrana foi a fração que apresentou melhor antigenicidade em relação às outras testadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Tedesco RC, Mortara RA, Gonçalves da Costa SC. Central nervous system involvement in experimental infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Am J Trop Med Hyg. 2003;68(6):661-5.

Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Cupolilo SM, Cardoso FO, Souza CS, Gonçalves da Costa SC. Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. Vet Parasitol. 2004;121(3-4):179-87.

Albrecht H. Leishmaniosis--new perspectives on an underappreciated opportunistic infection. AIDS. 1998;12(16):2225-6.

Albuquerque AR, Aragão FR, Faustino MAG, Gomes YM, Lira RA, Nakasawa M, Alves LC. Aspectos clínicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* na região metropolitana do Recife. Clin Vet. 2007; 71: 78-80

Alencar JE. Estudos sobre a epidemiologia de calazar no estado de Ceará, Brasil. Calazar canino versus calazar humano: aspectos profiláticos e históricos. Rev Soc Bras Med Trop. 1987; 20: 156-157.

Alencar JE de, Almeida YM, Silva ZF, Paiva AS, Fonseca MF. Aspectos atuais do calazar no Ceará. Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais 1974/75;26:27-53.

Almeida RP, Barral-Netto M, De Jesus AM, De Freitas LA, Carvalho EM, Barral A. Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/C mice. Am J Trop Med Hyg. 1996;54(2):178-84.

Almeida MA, Jesus EE, Sousa-Atta ML, Alves LC, Berne ME, Atta AM. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. Vet Immunol Immunopathol 2005;106:151-8

Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. Adv Parasitol 2004;57:1-88.

Alvar J, Gutiérrez-Solar B, Molina R, López-Velez R, Garcia-Camacho A, Martinez P, Laguna F, Cercenado E, Galmes A. Prevalence of *Leishmania* infection among AIDS patients. Lancet. 1992;339(8806):1427.

Alves WA, Bevilacqua PD. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. *Cad Saude Publica* 2004; 20:259-65.

Andrade HM, de Toledo Vde P, Marques MJ, França Silva JC, Tafuri WL, Mayrink W, Genaro O. *Leishmania (Leishmania) chagasi* is not vertically transmitted in dogs. *Vet Parasitol.* 2002;103(1-2):71-81.

Antonialli, SAC; Torres, TG ; Paranhos-Filho, AC; Tolezano, JE. Spatial analysis of american visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State, central Brazil. *J Infect*, 2007; 54: 509-514.

Araujo FAP, Santos JR, Souza WJS. Standardization of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies for *Toxoplasma gondii* in swine (*Sus scrofa*) sera. *Arq. Fac. vet. UFRGS, Porto Alegre.* 1998; 26(1) 94-102.

Ashford RW. The leishmaniasis as model zoonoses *Ann Trop Med Parasitol* 1997;91:693-701.

Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 2000;30:1269-81.

Ashford DA, Badaro R, Eulalio C, Freire M, Miranda C, Zalis MG, David JR. Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the Falcon assay screening test--enzyme-linked immunosorbent assay (FAST-ELISA) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1993;48(1):1-8.

Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, Eulálio MC, Sampaio DP, Badaro R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;59(1):53-7.

Badaró R, Benson D, Eulálio MC, Freire M, Cunha S, Netto EM, Pedral-Sampaio D, Madureira C, Burns JM, Houghton RL, David JR, Reed SG. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1996;173:758-61.

Badaró R, Reed SG, Barral A, Orge G, Jones TC. Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in american visceral leishmaniasis: antigen selection for detection of infection-specific responses. *Am J Trop Med Hyg.* 1986;35(1):72-8.

Barral A, Badaró R, Barral-Netto M, Grimaldi G Jr, Momem H, Carvalho EM. Isolation of *Leishmania mexicana amazonensis* from the bone marrow in a case of american visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 1986;35(4):732-4

Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Júnior G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Badaro R, Barral-Netto M, Carvalho EM, et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. Am J Trop Med Hyg. 1991;44(5):536-46.

Barrouin-Melo SM, Larangeira DF, Trigo J, Aguiar PH, dos-Santos WL, Pontes-de-Carvalho L. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004;99(2):195-7.

Bhatia A, Daifalla NS, Jen S, Badaro R, Reed SG, Skeiky YA. Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. Mol Biochem Parasitol 1999;102:249-61.

Biagi FF. Algunos comentarios sobre las leishmaniasis y sus agentes etiológicos, *Leishmania tropica mexicana*, nueva subespecie. Medna Mexico 1953;33:401-406.

Blavier A, Keroack S, Denerolle P, Goy-Thollot I, Chabanne L, Cadoré JL, Bourdoiseau G. Atypical forms of canine leishmaniosis. Vet J. 2001;162(2):108-20.

Boarino A, Bollo E, Prunotto L, Canale L, Uslenghi F, Poletti P. Application of a recombinant protein for the serological diagnosis of canine leishmaniosis. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2008;31(6):527-36.

Bonfante-Garrido R. New sub-species of leishmaniasis isolated in Venezuela. In: Proceedings of the 10th International Congress of Tropical Medicine and Malaria; 1980; Manila; 1980. p. 203.

Borja-Cabrera GP, Santos FN, Bauer FS, Parra LE, Menz I, Morgado AA, Soares IS, Batista LM, Palatnik-de-Sousa CB. Immunogenicity assay of the Leishmune® vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. Vaccine. 2008;26(39):4991-7.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 7;72:248-54.

Burns JM Jr, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in african and american visceral leishmaniasis. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90:775-9.

Carini A, Paranhos U. Identification de l' "Ulcera de Bauru" avec le bouton d'Orient. Bull Soc Path Exot 1909; 2:255-7.

Carvalho FA, Charest H, Tavares CA, Matlashewski G, Valente EP, Rabello A, Gazzinelli RT, Fernandes AP. Diagnosis of american visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. Diag Microbiol Infect Dis 2002;43:289-95.

Chagas E. Primeira verificação em indivíduo vivo da leishmaniose visceral no Brasil. Bras Med 1936;50:221-2.

Chang KP, Nacy CA, Pearson RD. Intracellular parasitism of macrophages in leishmaniasis: in vitro systems and their applications Methods Enzymol. 1986;132:603-26.

Conass.org.br [homepage na Internet].; Conselho Nacional de Secretários de Saúde c2007 [acesso em 2008 Nov 11]. Disponível em: Conselho Nacional de Secretarios de Saude.mht

Corredor A, Gallego JF, Tesh RB, Peláez D, Diaz A, Montilla M, Paláu MT. Didelphis marsupialis, an apparent wild reservoir of *Leishmania donovani chagasi* in Colombia, South America. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1989;83(2):195.

Cortada VM, Doval ME, Souza Lima MA, Oshiro ET, Meneses CR, Abreu-Silva AL, Cupolilo E, Souza CS, Cardoso FO, Zaverucha do Valle T, Brazil RP, Calabrese KS, Gonçalves da Costa SC. Canine visceral leishmaniosis in Anastácio, Mato Grosso do Sul state, Brazil. Vet Res Commun. 2004;28:365-74.

Costa CH, Vieira JB. Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2001;34(2):223-8.

Costa CHN. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Cad Saude Publica. 2008; 24(12):2959-2963

Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis.* 2002;186:1314-20.

Cunha AM. Infection experimentales obtenues en partant de la leishmaniose viscerale américaine. *Comptes Rendus Sc Soc Biol (Paris)* 1938;129:428-30.

Cunha AM. A soro aglutinação das leishmânias. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1942; 37:35-37.

Cunha AM, Chagas E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* pathogenico para o homem. *Leishmania chagasi*, n. sp. Nota prévia. *O Hospital* 1937;11;3-9.

Cunningham D. On the presence of pelicular parasitic organism in the tissue culture of a specimen of Delhi boil. *Scientific Memoirs of the Medical Officers of the Army of India* 1885;1:21-31.

da Silva AV, de Souza Cândido CD, de Pita Pereira D, Brazil RP, Carreira JC. The first record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Trop.* 2008;105(1):92-4.

de Oliveira AG, Andrade Filho JD, Falcão AL, Brazil RP. Study of sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul State, Brazil, from 1999 to 2000. *Cad Saude Publica.* 2003;19(4):933-44.

Deane LM. Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. *Ser Nac Ed San*,1956.

Deane LM, Deane MP. Dogs naturally infected by *Leishmania donovani* in Ceará. *Hospital (Rio J)* 1954a;45:703-7.

Deane MP, Deane LM. Infecção experimental de *Phlebotomus longipalpis* em raposa (*Lycalopex vetulus*) naturalmente parasitada pela *Leishmania donovani*. *Hospital* 1954b; 46:651-653.

Deplazes P, Smith NC, Arnold P, Lutz H, Eckert J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol.* 1995;17(9):451-8.

Desjeux P. Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clin Dermatol* 1996;14:417-23.

Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol* 2003;1997: 3-15.

Dietze R, Barros GB, Teixeira L, Harris J, Michelson K, Falqueto A, Corey R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin Infect Dis*. 1997;25(5):1240-2.

Diniz SA, Melo MS, Borges AM, Bueno R, Reis BP, Tafuri WL, Nascimento EF, Santos RL. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania sp.* in the semen of naturally infected dogs. *Vet Pathol*. 2005;42(5):650-8.

do Valle TZ, Gaspar EB, Souza-Lemos C, Souza CS, Márquez FB, Baetas-da-Cruz W, d'Escofier LN, Côrte-Real S, Calabrese KS, Gonçalves da Costa SC. Experimental *Leishmania (L.) amazonensis* leishmaniasis: characterization and immunogenicity of subcellular fractions. *Immunol Invest*. 2007;36(4):473-92.

Donovan C. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. *Natural Medical Journal India*. 1903;7:201-202.

dos Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, de Paiva Hoffmann M, de Freitas RA, Malacco MA. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. *Med Vet Entomol*. 1998;12(3):315-7.

Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 1971;8(9):871-4.

Falqueto A, Ferreira AL, dos Santos CB, Porrozzi R, da Costa MV, Teva A, Cupolillo E, Campos-Neto A, Grimaldi G Jr. Cross-sectional and longitudinal epidemiologic surveys of human and canine *Leishmania infantum* visceral infections in an endemic rural area of southeast Brazil (Pancas, Espírito Santo). *Am J Trop Med Hyg*. 2009; 80(4):559-65.

Fernandes JF, Halsman M, Castellani O. Effect of actinomycin D on the infectivity of *Trypanosoma cruzi*. *Nature* 1965;207P:1004-1005.

Fernández-Bellón H, Solano-Gallego L, Rodríguez A, Rutten VP, Hoek A, Ramis A, Alberola J, Ferrer L. Comparison of three assays for the evaluation of specific cellular immunity to *Leishmania infantum* in dogs. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005;107(1-2):163-9.

Ferrer L, Aisa MJ, Roura X, Portús M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Vet Rec.* 1995;136(20):514-6.

Ferrer L, Rabanal RM, Domingo M, Ramos JA, Fondevila D. Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. *Res Vet Sci.* 1988;44:194-6.

Ferroglio E, Centaro E, Mignone W, Trisciunglio A. Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog as compared with immunofluorescence assay and Western blot. *Vet Parasitol* 2007;144:162-6.

Floch H. *Leishmania tropica guyanensis* n.ssp., agent de leishmaniose tégumentaire edes Guyanas et de l'Amérique Centrale. *Archives de Institut Pasteur de la Guyane Française* 1954;15:1-4.

Franceschi A, Merildi V, Guidi G, Mancianti F. Occurrence of *Leishmania* DNA in urines of dogs naturally infected with leishmaniasis. *Vet Res Commun.* 2007;31(3):335-41.

Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, Ferrer L, Sánchez A, Roura X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 2006;137(3-4):214-21.

Fundação Nacional da Saúde. Relatório técnico operacional do programa de controle de leishmaniose visceral, 2001. Campo Grande, MS, 2002.

Galati EA, Nunes VL, Rego Júnior Fde A, Oshiro ET, Chang MR. [Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) focusing visceral leishmaniasis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. 1997. *Rev Saude Publica.*;31(4):378-90.

Garnham PCC. Cutaneous leishmaniasis in the New World with special reference to *Leishmania mexicana*. *Sci Rep Ist Super Sanita* 1962;2:76-82.

Gaspar EG. Avaliação da imunização com promastigotas sob modulação do Bacilo Calmette-Guérin e da ciclofosfamida no curso da infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* [Mestrado em Biologia Parasitária]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2005.

Genaro O, de Toledo VP, da Costa CA, Hermeto MV, Afonso LC, Mayrink W. Vaccine for prophylaxis and immunotherapy, Brazil. *Clin Dermatol.* 1996;14(5):503-12.

Genaro, O. et al. Evaluation of immunochromatographic Assay for the Diagnosis for dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania chagasi* in Brasil. Acta Parasitológica Turcica, , 1997;v. 21 suppl 1, p. 93.

Gonçalves da Costa SC, Lagrange PH. Development of cell mediated immunity to flagellar antigens and acquired resistance to infection by *Trypanosoma cruzi* in mice. Mem Inst Oswaldo Cruz 1981;76:367-381.

Gonçalves da Costa SC, Santos EB, Lagrange PH. Vaccination of mice against *Leishmania (mexicana) amazonensis* with microsomal fraction associated with BCG. Ann Inst Pasteur Immunol 1988;139:143-56.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev. bras. epidemiol. 2004; 7(3): 338-349.

Greiner M, Pfeiffer D, Smith RD. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. Prev Vet Med. 2000;45(1-2):23-41.

Grimaldi G Jr, David Jr, McMahon-Pratt D. Identification and distribution of New World *Leishmania* species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. Am J Trop Med Hyg 1987;36:270-87.

Grimaldi G Jr, Momen H, Naiff RD, McMahon-Pratt D, Barrett TV. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon region of Brazil. Am J Trop Med Hyg. 1991;44(6):645-61.

Guerra JA, Barros ML, Fé NF, Guerra MV, Castellon E, Paes MG, Sherlock IA. Visceral leishmaniasis among Indians of the State of Roraima, Brazil: clinical and epidemiologic aspects of the cases observed from 1989 to 1993. Rev Soc Bras Med Trop. 2004;37(4):305-11.

Harith A, Slappendel RJ, Reiter I, van Knapen F, de Korte P, Huigen E, Kolk AH. Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-*Leishmania* antibodies in the canine reservoir. J Clin Microbiol 1989;27:2252-7.

Herrer A. *Leishmania hertigi* sp. n., from the tropical porcupine, *Coendou rothschildi*. J Parasitol 1971;57:626-629.

Hommel M, Peters W, Ranque J, Quilici M, Lanotte G. The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. Ann Trop Med Parasitol 1978;72:213-8.

Honigberg BM. Evolutionary and systematic relationships in the flagellate order *Trichomonadida* Kirby. J Protozool 1963;10:20-63.

Iglesias JPS. Salvador Mazza, sua vida sua obra – redescubridor de la enfermedad de Chagas. Ed. Universidad Nacional de Jujuy. 1990.. Pp.: 527.

Killick-Kendrick R. The causative organism of infantile kala-azar in Egypt. Trans R Soc Trop Med Hyg 1985;79:737-8.

Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. Med Vet Entomol. 1990a;4(1):1-24.

Killick-Kendrick R, Molyneux DH, Rioux JA, Lanotte G, Leaney AJ. Possible origins of *Leishmania chagasi*. Ann Trop Med Parasitol. 1980;74:563-5.

Killick-Kendrick R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. Ann Parasitol Hum Comp.1990b;65

Kreutzer RD, Corredor A, Grimaldi G, Grol M, Rowton ED, Young DG, Morales A, McMahon-Pratt D, Guzman H, Tesh RB. Characterization of *Leishmania colombiensis* sp. n (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting humans, animals and phlebotomine sandflies in Colombia and Panama. Trans R Soc Trop Med Hyg 1991;44:662-675.

Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. J Clin Microbiol. 2002;40(1):210-5.

Lainson R, Shaw JJ, Lins ZC. Leishmaniasis in Brazil IV. The fox, *Cerdocyon thous* (L) as a reservoir of *Leishmania donovani* in Pará state Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 1969a;63:741-5.

Lainson R, Shaw JJ. *Leishmaniasis* of the New World: Taxonomic problems. Braz Med Bull 1972;28:44-48.

Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil. XII. Observations on cross-immunity in monkeys and man infected with *Leishmania mexicana*, *L. amazonenses*, *L. braziliensis braziliensis*, *L. quyanensis* and *L. panamensis*. J Trop Med Hyg 1977;80:29-35.

- Lainson R, Shaw JJ. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. *Nature*. 1978; 273 (5664):595-600
- Lainson R, Shaw JJ. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: Lumsden WHR, A ED, editors. *Biology of the kinetoplastida*. London, New York & San Francisco: Academic Press; 1979. p. 1-116.
- Lainson R, Shaw JJ 1987. Evolution, classification and geographical distribution, p. 1-120. W. Peters, R. Killick-Kendrick (eds). *The leishmaniasis in Biology and Medicine, Volume I, Biology and Epidemiology*. Academic Press Inc, Londres.
- Lainson R, Shaw JJ. *Leishmania (Viannia) naiffi* sp. n., a parasite of the armadillo, (*Dasypus novemcinctus*) in Amazonian Brazil. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1989;64(1):3-9.
- Lainson R, Shaw JJ. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. *Cienc Cult* 1992; 44:94-106.
- Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, de Souza AAA, Braga RR, Ishikawa EAY. The dermal leishmaniasis of Brazil, with especial reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89:435-443.
- Laveran A. 'Sur un protozoaire nouveau (*Piroplasma donovani*, Laveran et Mesnil), parasite d'une fièvre de l'Inde'. *Comp. Rend. Academia de Sciencia*, 1903;137:957-62.
- Leishman WB. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. *Br Med J* 1903;1:1252-4.
- Lemos EM, Laurenti MD, Moreira MA, Reis AB, Giunchetti RC, Raychaudhuri S, Dietze R. Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect) in dogs with and without signs of the disease. *Acta Trop*. 2008;107(2):205-7.
- León LA, León R. Las rinopatias en las leishmaniasis tegumentar americana. In: Publicación de la Asociación para el Estudio de Patología Tropical y las Ciencias Naturales. *Kasmera*, 1976; 5(2): p. 315-333 . Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela.
- Levine ND, Corliss JO, Cox FE, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, Leedale GF, Loeblich AR 3rd, Lom J, Lynn D, Merinfeld EG, Page FC, Poljansky G, Sprague V, Vavra J, Wallace FG. A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool* 1980;27:37-58.

- Levy, MSF. Perspectivas do crescimento das populações indígenas e os direitos constitucionais. 2008. Rev. bras. estud. popul. [online]. 2008;2(2):387-397
- Lindenberg A. L'ulcere de Bauru ou le bouton d'Orient au Bresil. Bull Soc Path Exot 1909;2:252-4.
- Lira RA; Cavalcanti MP; Nakazawa M; Ferreira AGP; Silva ED; Abath FGC; Alves LC; Souza WV; Gomes YM. Canine visceral leishmaniosis: a comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. Vet Parasit. 2005.
- Luga V, McLean S, Le Roy C, O'Connor-McCourt M, Wrana JL, Di Guglielmo GM The extracellular domain of the TGF beta type II receptor regulates membrane raft partitioning. Biochem J. 2009
- Lukes J, Mauricio IL, Schönian G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP, Kuhls K, Tintaya KW, Jirků M, Chocholová E, Haralambous C, Pratlong F, Oborník M, Horák A, Ayala FJ, Miles MA. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. Proc Natl Acad Sci USA 2007.29;104(22):9375-80.
- Maia C, Nunes M, Campino L. Importance of cats in zoonotic leishmaniasis in Portugal. Vector Borne Zoonotic Dis. 2008;8(4):555-9..
- Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. Vet Parasitol. 2008;158:274-87.
- Malaquias LC, do Carmo Romualdo R, do Anjos JB Jr, Giunchetti RC, Corrêa-Oliveira R, Reis AB. Serological screening confirms the re-emergence of canine leishmaniosis in urban and rural areas in Governador Valadares, Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brazil.Parasitol Res. 2007;100(2):233-9.
- Malla N, Mahajan RC. Pathophysiology of visceral leishmaniasis - some recent concepts. Indian J Med Res. 2006;123(3):267-74.
- Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S. Studies on canine control 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1998; 82: 566-567.

- Mancianti F. Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat? *Parassitologia*. 2004;46(1-2):203-6.
- Manna L, Reale S, Vitale F, Picillo E, Pavone LM, Gravino AE. Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet J*. 2008;177(2):279-82.
- Martinez NI. Resultados de las inoculaciones experimentales en el perro con cepas de *Leishmania* precedentes de casos de espundia. *O Hospital*. 1969; 75(5):183-196.
- Marzochi MCA Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares. *JBM* 1992;63:82-104.
- Matta AA. Sur les leishmanioses tegumentaires. Classification general des leishmanioses. *Bull Soc Path Exo* 1916;9:494-503.
- Mazza S, Cornejo A. Primeros casos autóctonos de kala-azar infantil comprobados en el norte de la República (Tabacal y Orán, Salta). *Bol Inst Clin Quir Buenos Aires* 1926;2:140-4.
- Medina R, Romero J. Clinical and parasitological study of a new strain of *Leishmania*. *Arch Venez Med Trop Parasitol Med*. 1959;3:298-326.
- Mello DA, Rego Jr FA, Oshozo E, Nunes VLB. *Cerdocyon thous* (L.) (Carnivora, Canidae) naturally infected with *Leishmania donovani chagasi* (Cunha & Chagas, 1973) in Corumbá (Mato Grosso do Sul State, Brazil). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1988 (83): 259.
- Meredith SE, Kroon NC, Sondorp E, Seaman J, Goris MG, van Ingen CW, Oosting H, Schoone GJ, Terpstra WJ, Oskam L. Leish-KIT, a stable direct agglutination test based on freeze-dried antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 1995;33:1742-5.
- Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J Clin Microbiol* 2005; 43:5515-9.
- Migone LE. Un caso de kala-azar a Assuncion (Paraguai). *Bull Soc Pathol Exot* 1913;6:118-20.

Ministério da Saúde [homepage na Internet] [acesso em 2009 May 11]. Disponível em: (http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri1426_11_07_2008.html)

Mohebali M, Taran M, Zarei Z. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rk39 test and direct agglutination. *Vet Parasitol* 2004;121:239-45.

Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andrés M, González F, Castillo JA, Lucientes J, Alvar J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1994;88(4):491-3.

Montalban C, Calleja JL, Erice A, Laguna F, Clotet B, Podzamczar D, Cobo J, Mallolas J, Yebra M, Gallego A. Visceral leishmaniasis in patients infected with human immunodeficiency virus. Co-operative Group for the Study of leishmaniasis in AIDS. *J Infect.* 1990;21(3):261-70.

Montalban C, Martinez-Fernandez R, Calleja JL, Garcia-Diaz JD, Rubio R, Drona F, Moreno S, Yebra M, Barros C, Cobo J, et al. Visceral leishmaniasis (kala-azar) as an opportunistic infection in patients infected with the human immunodeficiency virus in Spain. *Rev Infect Dis.* 1989;11(4):655-60.

Moroni G, Bossi L. Don't forget visceral leishmaniasis in transplant patients. *Nephrol Dial Transplant.* 1995;10:563-4.

Muniz J, Medina H. Leishmaniose tegumentar do cobaio (*Leishmania enrietti n. sp.*). *Hospital* 1948;33:7-25.

Navy FG, MacNeal WJ. On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. *J Infect Dis* 1904;1:1-30.

Neogy AB, Vouldoukis I, Silva OA, Tselentis Y, Lascombe JC, Segalen T, Rzepka D, Monjour L. Serodiagnosis and screening of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Corsica: applicability of a direct agglutination test and immunoblot analysis. *Am J Trop Med Hyg* 1992;47:772-7.

Nery-Guimarães F. – Estudo de um foco de leishmaniose muco-cutânea na baixada fluminense (Estado do Rio de Janeiro). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1955; 53:1-11.

Nicolle CJ. 'Sur trois cas d' infection splénique infantile à corps de Leishman observés en Tunisia'. *Archives du Institute Pasteur de Tunisia*, 1908a;3: 1-26.

- Nicolle CH. Culture du parasite du Bouton d'Orient. Compte Rendu Hebdomadaire des Séances de l'Académie des Sciences, Paris 1908b;146:842-843.
- Nicolle C., Comte C. Origine du Kalazar. Academy of Science.1908 ; 146: 789.
- Nieto CG, Viñuelas J, Blanco A, Garcia-Alonso M, Verdugo SG, Navarrete I. Detection of *Leishmania infantum* amastigotes in canine choroid plexus. Vet Rec. 1996;139(14):346-7.
- Nunes VLB, Yamamoto Y, Rego Jr FA, Dorval MEC, Galati EAB, Oshiro ET, Rodrigues M. Estudos epidemiológicos sobre leishmaniose visceral em cães de Corumbá, Mato Grosso do Sul. Pesq Vet Bras 1988 (8) (1/2): 17-21,.
- Nussenzweig V, Nussenweig RS, Alencar JE. Leishmaniose visceral canina nos arredores de Fortaleza, Estado do Ceará. Inquérito sorológico utilizando a reação de fixação de complemento com antígeno extraído do "bacilo de tuberculose". Observações sobre o diagnóstico e epidemiologia da doença. Hospital, Rio de Janeiro. 1957: (52); 111-29.
- O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem. 1975; 250(10):4007-21.
- Oliveira CD, Assunção RM, Reis IA, Proietti FA. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. Cad Saude Publica. 2001 Sep-Oct;17(5):1231-9.
- Osman OF. Visceral leishmaniasis: the PCR and direct agglutination test for diagnosis and management . PhD thesis, University of Amsterdam, The Netherlands. 1998.
- Palatnik de Sousa CB, Gomes EM, de Souza EP, dos Santos WR, de Macedo SR, de Medeiros LV, Luz K. The FML (Fucose Mannose Ligand) of *Leishmania donovani*: a new tool in diagnosis, prognosis, transfusional control and vaccination against human kala-azar. Rev Soc Bras Med Trop. 1996;29(2):153-63.
- Palatnik de Sousa CB, dos Santos WR, França-Silva JC, da Costa RT, Reis AB, Palatnik M, Mayrink W, Genaro O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2001;65(5):510-7.
- Pappas MG, Hajkowski R, Cannon LT Sr, Hockmeyer WT. Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA): comparison with standard ELISA and complement

- fixation assays for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 1984;14(3-4):239-49.
- Paranhos-Silva M, Freitas LA, Santos WC, Grimaldi G Júnior, Pontes-de- Carvalho LC, Oliveira-dos-Santos AJ. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg.* 1996;55(1):39-44.
- Passos S, Carvalho LP, Orge G, Jerônimo SM, Bezerra G, Soto M, Alonso C, Carvalho EM. Recombinant *Leishmania* antigens for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;12:1164-7.
- Passos VMA, Lasmar EB, Gontijo CMF, Fernandes O, Degraive W. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania*(*Viannia*) in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais. *Brazil Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1996;91 (1), 19–20.
- Paula, KC. Identificação de um antígeno de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* associado à proteção contra a leishmaniose no modelo murino [Mestrado em Biologia Parasitária]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2003.
- Penna HA. Leishmaniose visceral no Brasil. *Brasil Médico* 1934;18:940-50.
- Pennisi, MG. A high prevalence of feline leishmaniasis in southern Italy. *In:* R. Killick-Kendrick, Editor, canine leishmaniasis: Moving Towards a Solution, Intervet International, Boxmeer 2002, pp. 39–48.
- Pennisi MG, Reale S, Giudice SL, Masucci M, Caracappa S, Vitale M, Vitale F. Real-time PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. *Vet Res Commun.*2005; 29(1 2):301-3.
- Pereira NM, Timm SL, Gonçalves da Costa SC, Rebello MA, de Souza W. *Trypanosoma cruzi*: isolation and characterization of membrane and flagellar fractions. *Exp Parasitol.* 1978;46(2):225-34.
- Pessôa SM. *Parasitologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982
- Pessotti JH. Estudo do comportamento de cepas de *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonensis* em meios de cultura acelulares e em cultura de células de mamíferos [Mestrado em Biologia Parasitária]. Rio de Janeiro: IOC; 2001.

Peters BS, Fish D, Golden R, Evans DA, Bryceson AD, Pinching AJ. Visceral leishmaniasis in HIV infection and AIDS: clinical features and response to therapy. *Q J Med.* 1990;77(283):1101-11.

Pintado V, Martín-Rabadán P, Rivera ML, Moreno S, Bouza E. Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected patients. A comparative study. *Medicine (Baltimore).* 2001;80(1):54-73.

Porrozzì R, Santos da Costa MV, Teva A, Falqueto A, Ferreira AL, dos Santos CD, Fernandes AP, Gazzinelli RT, Campos-Neto A, Grimaldi G Jr. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14(5):544-8.

Portolés J, Prats D, Torralbo A, Herrero JA, Torrente J, Barrientos A. Visceral leishmaniasis: a cause of opportunistic infection in renal transplant patients in endemic areas. *Transplantation.* 1994;57(11):1677-9.

Portolés J, Prats D, Torralbo A, Herrero JA, Torrente J, Barrientos A. Nephrology Service, Hospital Universitario San Carlos, Madrid, Spain. Visceral leishmaniasis: a cause of opportunistic infection in renal transplant patients in endemic areas. *Transplantation.* 1994 Jun 15;57(11):1677-9.

Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez LM, Kaye PM, Shaw MA, Dye C, Day MJ. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003;91(3-4):161-8.

Rabello A, Orsini M, Disch J. *Leishmania*/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. *Ann Trop Med Parasitol* 2003;97(Suppl 1):17-28.

Rajasekariah GH, Ryan JR, Hillier SR, Yi LP, Stiteler JM, Cui L, Smithyman AM, Martin SK. Optimisation of an ELISA for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis using in vitro derived promastigote antigens. *J Immunol Meth.* 2001;252(1-2):105-19.

Ramos CC, Duarte MI, Ramos AM. Fatal visceral leishmaniasis associated with acquired immunodeficiency syndrome: report of a case with necropsy findings and immunohistochemical study. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1994;27(4):245-50.

Rebêlo JM, de Oliveira ST, Silva FS, Barros VL, Costa JM. Sandflies (Diptera: Psychodidae) of the Amazônia of Maranhão. V. Seasonal occurrence in ancient colonization area and endemic for cutaneous leishmaniasis. *Braz J Biol.* 2001;61(1):107-15.

Reed SG. Diagnosis of leishmaniasis. *Clin Dermatol.* 1996;14(5):471-8.

Reed SG, Shreffler WG, Burns JM Jr, Scott JM, Orge Mda G, Ghalib HW, Siddig M, Badaro R. An improved serodiagnostic procedure for visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1990;43(6):632-9.

Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Vale AM, Marques MJ, Giunchetti RC, Mayrink W, Guerra LL, Andrade RA, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006;112(3-4):102-16.

Reis, AB, Teixeira-Carvalho A, Vale AM, Marques MJ, Giunchetti, RC, Mayrink M, Guerra LL, Andrade AR, Correa oliveira R, Martins-Filho O. Isotype patterns of immunoglobulins: Halmarks for clinical status and tissue parasite density in brasilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet. Immunol. Immunophatol* 2006:102-116.

Reithinger R, Davies CR. American cutaneous leishmaniasis in domestic dogs: an example of the use of the polymerase chain reaction for mass screening in epidemiological studies. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002; 96 (1):S123-6.

Requena JM, Alonso C, Soto M. Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. *Parasitol Today.* 2000 ;16(6):246-50.

Requena JM, Alonso C, Soto M. More panantigens in *Leishmania*. *Trends Parasitol.* 2001;17(2):64.

Reynolds ES, The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy, *J. Cell. Biol.* 17 (1963), pp. 208–212

Ribeiro FC, de O Schubach A, Mouta-Confort E, Schubach TM, de Fátima Madeira M, Marzochi MC. Use of ELISA employing *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* antigens for the detection of IgG and IgG1 and IgG2 subclasses in the diagnosis of american tegumentary leishmaniasis in dogs. *Vet Parasitol.* 2007 30;148(3-4):200-6.

Ribeiro MV. Leishmaniose visceral canina: aspectos de tratamento e controle. Clin Vet 2007; 71: 66-76.

Rioux JA, Linotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. Ann Parasitol Hum Comp 1990;65:111-25.

Rosário EY, Genaro O, Franca-Silva JC, da Costa RT, Mayrink W, Reis AB, Carneiro M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis, 2005. Mem Inst Oswaldo Cruz.;100:197-203.

Ross R. Further notes on Leishman's bodies. Br Med J 1903;11:1401.

Rosypal AC, Troy GC, Zajac AM, Frank G, Lindsay DS. Transplacental transmission of a North american isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. J Parasitol. 2005; 91(4):970-2..

Sant'Anna C, Nakayasu ES, Pereira MG, Lourenço D, de Souza W, Almeida IC, Cunha-E-Silva NL. Subcellular proteomics of *Trypanosoma cruzi* reservosomes. Proteomics. 2009; 9(7):1782-94.

Santa Rosa ICA, Oliveira ICS. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. Clín Vet 1997 (2): 24-28.

Santarém N, Tomás A, Ouaisi A, Tavares J, Ferreira N, Manso A, Campino L, Correia JM, Cordeiro-da-Silva A. Antibodies against a *Leishmania infantum* peroxiredoxin as a possible marker for diagnosis of visceral leishmaniasis and for monitoring the efficacy of treatment. Immunol Lett 2005;101:18-23.

Santos FN, Borja-Cabrera GP, Miyashiro LM, Grechi J, Reis AB, Moreira MA, Martins Filho OA, Luvizotto MC, Menz I, Pessôa LM, Gonçalves PR, Palatnik M, Palatnik-de-Sousa CB. Immunotherapy against experimental canine visceral leishmaniasis with the saponin enriched-Leishmune® vaccine. Vaccine. 2007;25(33):6176-90

Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, Hoffmann MP, Freitas RA, Malacco MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of american visceral leishmaniasis. Med Vet Entomol. 1998 (12): 315-317.

Savani ES, de Oliveira Camargo MC, de Carvalho MR, Zampieri RA, dos Santos MG, D'Auria SR, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol.* 2004;120(3):229-33.

Scalone A, De Luna R, Oliva G, Baldi L, Satta G, Vesco G, Mignone W, Turilli C, Mondesire RR, Simpson D, Donoghue AR, Frank GR, Gradoni L. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Parasitol.* 2002;104:275-85.

Schallig HD, Schoone GJ, Kroon CC, Hailu A, Chappuis F, Veeken H. Development and application of 'simple' diagnostic tools for visceral leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol* 2001;190:69-71.

Schotelius J, Gonçalves da Costa SC, 1982. Studies on the relationship between lectin binding carbohydrates and different strains of *Leishmania* from the New World. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 77: 19–21.

Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.

Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Doenças Infecciosas e Parasitárias. Guia de bolso. Ministério da Saúde. Brasília/DF. 2006

Senekjic HA American visceral leishmaniasis. The etiological agent. *J Parasitol* 1944;30:303-308.

Shaw JJ. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994;89:471-478.

Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi Júnior G. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1984;79(4):511.

Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi Júnior G. Observations on kala azar in Jacobina, Bahia. VI. Investigations on sylvatic and commensal mammals. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1988;21(1):23-7.

- Silva EA, Andreotti R, Dias ES, Barros JC, Brazuna JCM. Detection of *Leishmania* DNA in phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Exp Parasitology* 2008; (19):343–348.
- Silva ES, Gontijo CM, Pacheco RS, Fiuza VO, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96:285-91.
- Silva ES, Pirmez C, Gontijo CMF, Fernandes O, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in south-east Brazil. *Vet Record* 2000;147:421-422.
- Silva ES, Schoone GJ, Gontijo CM, Brazil RP, Pacheco RS, Schallig HD. Application of direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST) for serodiagnosis of visceral leishmaniasis in endemic area of Minas Gerais, Brazil. *Kinetoplastid Biol Dis.* 2005;14;4:4.
- Silva ES, van der Meide WF, Schoone GJ, Gontijo CM, Schallig HD, Brazil RP. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. *Vet Res Commun* 2006;30:637-43.
- Silveira FT, Ishikawa EA, de Souza AAA, Lainson R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará state, Brasil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. A new *Leishmania* parasite of man in the Amazon region. *Parasite* 2002;9:43-50.
- Silveira FT, Lainson R, Brito AC, Oliveira MRF, Paes MG, Souza AAA, Silva BM. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Leão RNQ. *Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico*. Belém: Editora CEJUP; 1997.
- Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Póvoa MM. Leishmaniasis in Brazil: XVIII. Further evidence incriminating the fox *Cerdocyon thous* (h) as a reservoir of Amazonian visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1982;76(6):830-2.
- Silveira FT, Shaw JJ, Braga RR, Ishikawa EA. Dermal leishmaniasis in the Amazon region of Brazil: *Leishmania (Viannia) lainsoni* sp n., a new parasite from the state of Pará. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1987;82:289-292.
- Singh S, Gilman-Sachs A, Chang KP, Reed SG. Diagnostic and prognostic value of K39 recombinant antigen in Indian leishmaniasis. *J Parasitol.* 1995;81:1000-3.

Singh S, Sivakumar R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. J Postgrad Med 2003;49:55-60.

Solano-Gallego L, Rodriguez-Cortes A, Trotta M, Zampieron C, Razia L, Furlanello T, Caldin M, Roura X, Alberola J. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. Vet Parasitol. 2007;147(3-4):315-9.

Souza VMM, Julião FS, Neves RCS, Magalhães PB, Bisinotto TV, Lima AS, Oliveira SS, Junior ED. Ensaio comunitário para avaliação da efetividade de estratégias de prevenção e controle da leishmaniose visceral humana no município de Feira de Santana, Estado da Bahia, Brasil. Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília. 2008; 17(2): 97-106.

Tabnet.datasus.gov.br [homepage na Internet]. DATASUS; c2008 [acesso em 2008 Dez 12]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2007/matriz.htm>.

Tafuri WL, Santos RL, Arantes RM, Gonçalves R, de Melo MN, Michalick MS, Tafuri WL. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. J Immunol Methods 2004;292:17-23.

Tamoyo M 1908. La Uta en el Peru. IV Cong. Cient. (1º Pan Americano) Chile Imp. Nac. Roderico Barrionuevo, Lima, Peru, 263

Tolezano JE, Uliana SR, Taniguchi HH, Araújo MF, Barbosa JA, Barbosa JE, Floeter-Winter LM, Shaw JJ. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba Country, São Paulo State, Brazil. Vet Parasitol. 2007;149(3-4):280-4.

Tribunal de Justiça do Mato Grosso do Sul. [homepage na Internet] [acesso em 2009 May 11]. Disponível em: <http://www.tjms.jus.br/cposg/pcpoResultadoConsProcesso2Grau.jsp>; nº do processo: 2007.015237-9.

Turk JL & Belehu A. Immunological spectra in infectious diseases. In: Parasites in the immunized host: mechanisms of survival..Amsterdam, Elsevier, (Ciba Foundation Symposium 25 (new series), 1974: 101-:122.

Vale AM, Fujiwara RT, da Silva Neto AF, Miret JA, Alvarez DC, da Silva JC, Campos-Neto A, Reed S, Mayrink W, Nascimento E. Identification of highly specific and cross-reactive

antigens of *Leishmania* species by antibodies from *Leishmania (Leishmania) chagasi* naturally infected dogs. *Zoonoses Public Health*. 2009;56(1):41-8.

Velez LR. Uta e espúndia. *Bull Soc Pathol Exot*. 1913;6:545.

Vianna G. Sobre uma nova espécie de *Leishmania*. *Brazil Medico* 1911;41:1-1.

www.ioc.fiocruz.br [homepage na Internet]. IOC/FIOCRUZ; c2009 [acesso em 2009 Mar 2009]: disponível em:

<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=604&query=simple&search%5Fby%5Fauthorname=all&search%5Fby%5Ffield=tax&search%5Fby%5Fheadline=false&search%5Fby%5Fkeywords=any&search%5Fby%5Fpriority=all&search%5Fby%5Fsection=all&search%5Fby%5Fstate=all&search%5Ftext%5Foptions=all&sid=32&site=fio&text=leishmaniose+em+s%E3o+borja>

Wenyon CM. 1946. Comments in a abstract of Cunha (1942). *Trop Dis Bull* 43:113-114.

Werneck GL, Costa CH, Walker AM, David JR, Wand M, Maguire JH. The urban spread of visceral leishmaniasis: clues from spatial analysis. *Epidemiol*. 2002;13(3):364-7.

Who.int [homepage na Internet]. World Health Organization; c2007 [acesso em 2008 Nov 11]. Disponível em: http://www.who.int/leishmaniasis/history_disease/en/index.html.

Wilson RJ, Fry M, Gardner MJ, Feagin JE, Williamson DH. Subcellular fractionation of the two organelle DNAs of malaria parasites. *Curr Genet*. 1992;21(4-5):405-8.

Wright JH. Protozoa in a Case of Tropical Ulcer (“Delhi Sore”) *J Med Res*. 1903; 10(3): 472–482.7.

Zijlstra EE, Nur Y, Desjeux P, Khalil EA, El-Hassan AM, Groen J. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan. *Trop Med Int Health* 2001;6:108-13.

ANEXOS

Meio LIBHIT

Glicose.....	2g
Triptose.....	2g
Infusão de cérebro e coração.....	2g
Infusão de fígado.....	50mL
Solução salina 10x conc.....	50mL
Soro fetal bovino.....	50mL
Hemoglobina.....	2mL
H2O destilada.....	1000mL

Solução salina 10x concentrada:

NaCl.....	2g
KCl.....	20g
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O.....	57,2g
H ₂ O destilada q.s.p.....	500mL

Fracionamento subcelular:

Tampão de lavagem (TPMN)

NaCl 1M.....	20mL
K ₂ HPO ₄ 0,2M.....	20mL
MgCl ₂ 0,5M.....	0,5mL
H ₂ O dest. q.s.p.....	200mL

Tampão S (Sacarose 50mM em Tris HCl 10mM - pH 7.5)

Sacarose.....	5mL
Tris HCl 1M pH7.5.....	1mL
H ₂ O dest. q.s.p.....	400mL

Sacarose 1M Tris HCl 10mM pH 7.5

Sacarose.....	34,2mL
Tris HCl 1M pH 7.5.....	1mL
H ₂ O dest. q.s.p.....	100mL

Tris HCl 10mM pH7.5

Tris HCl 1M pH 5.0.....2mL

H2O dest. q.s.p.....200mL

Lubrol 10%

Sacarose 5%

Sacarose 25%

Tampão para ajuste de condições isotônicas:

Sacarose 1M em Tris HCl mM pH 7.5.....4,5mL

Tris HCl 10mM pH 7.5.....5,5mL

Tampão TMK (tampão para obtenção de fração microsomal)

MgCl₂ 10mM.....2,03g

KCl 25mM.....1,86g

Tris-HCl 10mM pH 7,4.....1,21g

H₂O q.s.p.....1000mL

(Penicilina 200U/ml - Estreptomicina 200µg/mL)

Tampão PBS – pH 7.2

NaCl 7,6g

NaH₂PO₄ 0,275g

Na₂HPO₄ 1,13g

Água destilada qsp 1000mL

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)