



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ



CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

TESE DE DOUTORADO

VALIDAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DA *Leishmania infantum* E DA
SALIVA DO *Lutzomyia longipalpis* COMO BIOMARCADORES PARA O
SORODIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO ÀS LEISHMANIOSES.

Ana Paula Almeida de Souza

Salvador – Bahia – Brasil

2013

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**VALIDAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DA *Leishmania infantum* E DA
SALIVA DO *Lutzomyia longipalpis* COMO BIOMARCADORES PARA O
SORODIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO ÀS LEISHMANIOSES.**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Patologia do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM) como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Patologia.

**ANA PAULA ALMEIDA DE SOUZA
Orientadora: Prof^a Dr^a Aldina Barral**

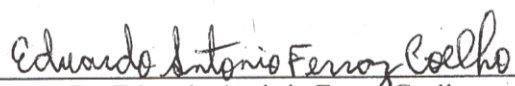
**Salvador – Bahia – Brasil
2013**

“IDENTIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DO PARASITO E DA SALIVA DOS FLEBOTOMÍNEOS COMO BIOMARCADORES PARA O SORODIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO ÀS LEISHMANIOSES”

ANA PAULA ALMEIDA DE SOUZA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA

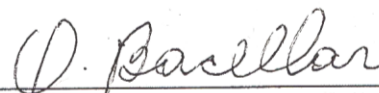


Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho
Professor Adjunto
UFMG

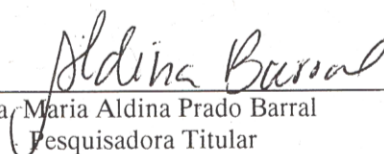
Dra. Alda Maria da Cruz
Pesquisadora em Saúde Pública
IOC/FIOCRUZ



Dra. Deborah Bittencourt Mothé Fraga
Professora Titular
UFBA



Dra. Maria Olívia Amado Ramos Bacellar
Professora Adjunta
UFBA



Dra. Maria Aldina Prado Barral
Pesquisadora Titular
CPqGM/FIOCRUZ

*Para minha querida família com
todo o meu amor...*

AGRADECIMENTOS

A Dra. **Aldina Barral** pela orientação não só deste trabalho, mais dos 10 anos de incentivo, ensinamentos e oportunidade. Obrigada por tudo!

Ao Dr. **Manoel Barral-Netto** pelas sugestões sempre pertinentes.

A Dra. **Camila Indiani**, pelo incentivo e pelas orientações durante o desenvolvimento do trabalho.

A Dra. **Claudia Brodski** pelo incentivo e sugestões.

Ao Dr. **Manoel Soto** pela orientação e acolhida em seu laboratório. Obrigada!

A Dra. **Socorro Escuellas** pela agradável estadia em seu laboratório e pelos seus ensinamentos.

Aos demais **Pesquisadores do LIP/LIMI** pelos ensinamentos e colaborações.

A **Bárbara Soares e Juqueline Cristal** pela amizade, companheirismo e apoio durante o período do doutorado. Muito Obrigada!

Aos demais colegas do **LIP e LIM/CPqGM** pelo agradável convívio, contribuições e troca de informações.

A meus **pais, irmãos, sobrinhos, cunhados e sogros** pelo incentivo e conforto nas horas mais difíceis. Obrigada por acreditarem em mim.

Ao meu esposo **Nilo Matias** por estar presente nos momentos em que mais precisava de apoio, me incentivado sempre a prosseguir. Te amo!

Aos amigos pelo apoio e compreensão nos momentos de ausência.

As secretarias do LIP/LIMI **Elze e Andrezza** pela amizade e principalmente pela disposição em resolver os problemas.

Ao **Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz, FIOCRUZ** e a **Universidade Federal da Bahia**.

Ao **Programa de Pós-graduação em Patologia**, aos **secretários** do PPGPat, aos **funcionários da biblioteca** e a todos os **professores e funcionários** do CPqGM/UFBA.

A todos que não constam nesta nota, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e desejaram o seu sucesso. O desenvolvimento desta tese somente foi possível com o apoio de todos vocês.

APOIO FINANCEIRO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Por parte da bolsa de doutorado e pela bolsa de doutorado sanduiche.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Pela bolsa de doutorado.

Ao Programa Ibero Americano de Ciência e a Tecnologia para o Desenvolvimento (CYTED) e Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ/PAPES) – pelo suporte ao projeto o qual este trabalho fez parte.

SUMÁRIO

| | |
|---|-------------|
| LISTA DE FIGURAS..... | viii |
| LISTA DE QUADROS E TABELAS..... | ix |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS..... | x |
| RESUMO..... | xi |
| ABSTRACT..... | xii |
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 As leishmanioses: considerações gerais..... | 13 |
| 1.2 A epidemiologia das leishmanioses..... | 13 |
| 1.3 Mecanismos de transmissão das leishmanioses..... | 14 |
| 1.4 Anticorpo anti-saliva: marcadores de exposição às Leishmanioses..... | 16 |
| <i>1.4.1 Proteínas recombinantes da saliva: biomarcadores de exposição aos insetos vetores.....</i> | 17 |
| 1.5 Diagnóstico das leishmanioses: considerações gerais..... | 18 |
| <i>1.5.1 Diagnóstico laboratorial.....</i> | 19 |
| 1.5.1.1 Diagnóstico parasitológico..... | 19 |
| 1.5.1.2 Imunodiagnóstico | 20 |
| <i>1.5.1.2.1 Sorodiagnóstico utilizando antígenos recombinantes.....</i> | 21 |
| 2 OBJETIVOS..... | 30 |
| 3 METODOLOGIA EMPREGADA PARA A EXECUÇÃO DO OBJETIVO ESPECÍFICO I..... | 31 |
| 3.1 Desenho do estudo..... | 31 |
| 3.2 Obtenção das glândulas salivares para os estudos sorológicos:..... | 33 |
| 3.3 Obtenção das proteínas recombinantes da saliva de <i>L. longipalpis</i> para os estudos sorológicos..... | 33 |
| 3.4 Identificação de proteínas recombinantes reconhecidas pelo soro dos indivíduos expostos à picada do <i>L. longipalpis</i> através de Dot blot..... | 34 |

| | |
|---|-----------|
| 3.5 ELISA para detecção de anticorpos anti-saliva de flebotomíneos e anti-proteínas recombinantes..... | 34 |
| 3.6 Análise estatística..... | 35 |
| 4 RESULTADOS DO OBJETIVO ESPECÍFICO I..... | 36 |
| 5 METODOLOGIA EMPREGADA PARA A EXECUÇÃO DO OBJETIVO ESPECÍFICO II..... | 42 |
| 5.1 Desenho do Estudo..... | 42 |
| 5.2 Obtenção das amostras de soros..... | 44 |
| 5.3 Obtenção dos antígenos recombinantes parasitário para os estudos sorológicos..... | 45 |
| 5.4 Obtenção do antígeno bruto parasitário para os estudos sorológicos..... | 45 |
| 5.5 ELISA para detecção de anticorpos anti-<i>Leishmania</i>..... | 45 |
| 5.6 Análise estatística..... | 46 |
| 6 RESULTADOS DO OBJETIVO ESPECÍFICO II..... | 47 |
| 7 DISCUSSÃO..... | 55 |
| 8 CONCLUSÃO..... | 62 |
| REFERÊNCIAS..... | 63 |
| APÊNDICE | 76 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 1 | Ciclo de vida digenético do parasito <i>Leishmania</i> , mostrando a fase do ciclo no hospedeiro invertebrado e vertebrado. | 14 |
| Figura 2 | Diferentes categorias de proteínas recombinantes descritas como possíveis antígenos para o sorodiagnóstico das Leishmaniose. | 21 |
| Figura 3 | Fluxograma do estudo utilizando as proteínas recombinantes da saliva do <i>Lutzomyia longipalpis</i> . | 31 |
| Figura 4 | Avaliação de proteínas recombinantes salivares de <i>L. longipalpis</i> como marcador de exposição ao vetor. | 36 |
| Figura 5 | Curvas ROC dos níveis de anticorpos limiars para predição da positividade contra SGS. | 37 |
| Figura 6 | Avaliação da especificidade do SGS do <i>L. longipalpis</i> e das proteínas recombinantes salivares. | 38 |
| Figura 7 | Correlação entre a produção de anticorpos contra antígenos da saliva total e rLJM11+rLJM17. | 39 |
| Figura 8 | Validação da combinação da rLJM17 e rLM11 para a estimativa da exposição humana a saliva de <i>L. longipalpis</i> . | 40 |
| Figura 9 | Fluxograma do estudo utilizando as proteínas recombinantes da <i>Leishmania</i> . | 42 |
| Figura 10 | Reatividade dos antígenos parasitários frente aos soros dos pacientes com leishmaniose e indivíduos saudáveis. | 47 |
| Figura 11 | Curvas ROC dos níveis de anticorpos limiars para detecção de pacientes com leishmaniose. | 49 |
| Figura 12 | Avaliação da especificidade dos antígenos recombinantes frente aos soros dos pacientes com outras patologias que não leishmaniose. | 51 |
| Figura 13 | Curvas ROC dos níveis de anticorpos limiars para identificação de pacientes com leishmaniose entre indivíduos portadores de outras patologias. | 53 |

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADROS

| | | |
|-----------------|--|----|
| Quadro 1 | Relação das proteínas secretadas/excretadas descritas e sua capacidade de reconhecimento por anticorpos presentes nos soros de pacientes com leishmaniose e outras patologias. | 22 |
| Quadro 2 | Relação das proteínas de superfície descritas e sua capacidade de reconhecimento por anticorpos presentes nos soros de pacientes com leishmaniose e outras patologias. | 23 |
| Quadro 3 | Relação das proteínas ribossomais ácidas descritas e sua capacidade de reconhecimento por anticorpos presentes nos soros de pacientes com leishmaniose e outras patologias. | 24 |
| Quadro 4 | Relação das proteínas derivadas de histonas descritas e sua capacidade de reconhecimento por anticorpos presentes nos soros de pacientes com leishmaniose e outras patologias. | 25 |
| Quadro 5 | Relação das proteínas de choque térmico descritas e sua capacidade de reconhecimento por anticorpos presentes nos soros de pacientes com leishmaniose e outras patologias. | 26 |
| Quadro 6 | Relação das cisteínas proteases descritas e sua capacidade de reconhecimento por anticorpos presentes nos soros de pacientes com leishmaniose e outras patologias. | 27 |
| Quadro 7 | Relação das cisteínas proteases descritas e sua capacidade de reconhecimento por anticorpos presentes nos soros de pacientes com leishmaniose e outras patologias. | 28 |

TABELAS

| | | |
|-----------------|---|----|
| Tabela 1 | Características epidemiológicas dos indivíduos incluídos no estudo. | 43 |
|-----------------|---|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------|---|
| ASC | Área sob a curva |
| CPA | <i>Cysteine proteinases A</i> |
| DO | Densidade ótica |
| DTH | Teste de hipersensibilidade tardia, do inglês <i>Delay- type Hypersensitivity</i> . |
| ELISA | Teste imunoenzimático, do inglês <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> |
| GBP | <i>Gene B protein</i> |
| gP63 | <i>Glycoprotein of 63 kDa</i> |
| HIV | Vírus da imunodeficiência humana |
| IDRM | A intradermorreação de Montenegro |
| IFA | Imunoflorescência indireta |
| KMP11 | <i>Kinetoplastid Membrane Protein</i> |
| LC | Leishmaniose Cutânea |
| LCD | Leishmaniose Cutânea Difusa |
| LES | Lúpus Eritematoso Sistêmico |
| LM | Leishmaniose Mucosa |
| LPG | <i>Lipophosphoglycan</i> |
| LTA | Leishmaniose Tegumentar Americana |
| LV | Leishmaniose Visceral |
| ROC | Curvas de Características de Operação do Receptor do inglês <i>Receiver Operator Characteristic</i> |
| SGS | Sonicado da glândula salivar |
| SIR-2 | <i>Sirtuin-2</i> |
| SLA | Antígeno solúvel de <i>Leishmania</i> do inglês <i>Soluble Leishmania Antigens</i> |
| TSA | <i>Thiol-specific antioxidant</i> |

RESUMO

VALIDAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DA *Leishmania infantum* E DA SALIVA DO *Lutzomyia longipalpis* COMO BIOMARCADORES PARA O SORODIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO ÀS LEISHMANIOSES. ANA PAULA ALMEIDA DE SOUZA. O controle das populações de flebotomíneos, a contenção das epidemias nas fases iniciais e a facilitação do diagnóstico precoce dos indivíduos parasitados são estratégias traçadas pela OMS para a vigilância e controle da leishmaniose. Neste contexto, os testes sorológicos utilizando tanto o sonicado de glândula salivar (SGS) dos flebotomíneos quanto o antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) são importantes ferramentas para o controle/diagnóstico das Leishmanioses. No entanto, os testes realizados a partir da utilização de antígenos obtidos de frações brutas, apesar de apresentarem alta sensibilidade, alguns destes antígenos apresentam reação cruzada com epítomos compartilhados por outros patógenos/vetores. Além disso, o preparo dos antígenos não tem adequada reprodutibilidade devido a grande dificuldade de obtenção e/ou padronização destes. No presente trabalho, objetivamos identificar biomarcadores para a vigilância e o controle das Leishmanioses, utilizando proteínas recombinantes da saliva dos flebotomíneos como biomarcadores de exposição ao vetor e proteínas recombinantes da *Leishmania* para obtenção de um diagnóstico sorológico mais preciso para a Leishmaniose Tegumentar humana. Numa primeira etapa, foram realizados testes imunoenzimáticos contra as proteínas recombinante da saliva do vetor *L. longipalpis* (rLJM11 e rLJM17) para estimar a positividade anti-saliva num pequeno número de soros de crianças de uma área endêmica para Leishmaniose Visceral. Foi observado que os soros que reconhecem o SGS do *L. longipalpis* também reconhecem em diferentes proporções as proteínas rLJM17 e rLJM11. Ademais, as proteína recombinantes foram capazes de detectar a soroconversão anti-saliva de soros de uma segunda área endêmica para LV, havendo aumento no reconhecimento quando utilizadas as duas proteínas recombinantes de forma combinada. Além disso, a análise das curvas ROC evidenciou o desempenho superior da combinação das proteínas rLJM17 + rLJM11. Estes dados foram confirmados com a avaliação das proteínas frente um grande painel de 1.077 amostras de soro de indivíduos de uma outra área endêmica para LV. Nesta etapa, nossos resultados indicam que as proteínas rLJM11+rLJM17 representam uma ferramenta epidemiológica promissora que pode auxiliar na implementação de medidas de controle contra a Leishmaniose Visceral. Numa segunda etapa, testes imunoenzimáticos foram realizados contra uma série de proteínas recombinantes da *Leishmania* (HSP70, H2A, H2B, H3, H4 e KMP11) a fim de selecionarmos proteínas antigênicas contra soros de pacientes com Leishmaniose Cutânea (LC) e Leishmaniose Mucosa (LM) e que apresentassem elevada especificidade quando testadas contra soros de indivíduos com outras patologias (doença de Chagas, Lúpus Eritematoso Sistêmico, Hanseníase e Tuberculose). Para avaliar a eficácia das proteínas recombinantes foram utilizadas curvas ROC, possibilitando a seleção de antígenos possivelmente mais eficientes que o SLA no imunodiagnóstico da Leishmaniose. As proteínas recombinantes HSP70 e H2A foram selecionadas por apresentarem elevada sensibilidade, sendo reconhecida por anticorpos dos soros de pacientes com LM e LC respectivamente. Na última etapa dos experimentos, utilizando soros de indivíduos que apresentavam outras patologias, observou-se que a reação cruzada diminui frente aos antígenos recombinantes, especialmente para a rHSP70, quando comparamos à observada para o SLA. Nossos resultados mostram a elevada antigenicidade da rHSP70, sugerindo a possibilidade de utilização desta proteína recombinante para o sorodiagnóstico da Leishmaniose Tegumentar. Neste trabalho foi possível identificar e validar o uso de proteínas recombinantes do parasito e da saliva dos flebotomíneos como biomarcadores para o sorodiagnóstico e avaliação da exposição às leishmanioses. **[Palavras-chave]** Leishmanioses, biomarcadores, sorodiagnóstico, flebotomíneos, proteínas recombinantes.

ABSTRACT

VALIDATION OF RECOMBINANT PROTEINS OF *Leishmania infantum* AND SALIVA OF *Lutzomyia longipalpis* AS BIOMARKERS FOR SERODIAGNOSIS AND LEISHMANIASIS EXPOSURE. **ANA PAULA ALMEIDA DE SOUZA.** The population control of sand flies, containment of epidemics in the early stages and facilitating early diagnosis of infected individuals are strategies outlined by WHO for surveillance and control of Leishmaniasis. In this context, serologic tests using both the salivary gland sonicate (SGS) of sandflies as soluble Leishmania antigen (SLA) are important tools for the control / diagnosis of Leishmaniasis. However, tests based on the use of antigens derived from crude fractions, despite showing high sensitivity, some of these antigens cross-react with epitopes shared by other pathogens / vectors. Moreover, the preparation of antigens has adequate reproducibility due to difficulty in obtaining and / or standardization of these. In this study, we aimed to identify biomarkers for the surveillance and control of Leishmaniasis, through use of recombinant proteins from the saliva of sandflies as biomarkers of exposure to vector and through the use of recombinant proteins of Leishmania to get a more accurate serodiagnosis for human leishmaniasis. On the first step, ELISAs were performed against the recombinant protein from the saliva of the vector *L. longipalpis* (rLJM11 and rLJM17) to estimate the positive anti-saliva on a small number of sera from children from an endemic area for VL. It was observed that the sera that recognize the SGS of *L. longipalpis* also recognize in different proportions of rLJM17 and rLJM11 proteins. Further, each recombinant protein was able to detect anti-saliva seroconversion in sera from a second endemic area for VL, with increase in recognizing when the two recombinant proteins were used in combination. Furthermore, the ROC analysis showed the superior performance of the combination of rLJM17 + rLJM11, these data confirmed using a large panel of 1077 serum samples from individuals from another endemic area for LV. At this stage, our results indicate that proteins rLJM11 + rLJM17 represent a promising epidemiological tool that can assist in the implementation of control measures against Visceral Leishmaniasis. In a second step, ELISAs were performed against a series of recombinant proteins of Leishmania (HSP70, H2A, H2B, H3, and H4 KMP11) so antigenic proteins were selected against serum from patients with cutaneous leishmaniasis (CL) and mucocutaneous leishmaniasis (MCL) and that presented high specificity when tested against sera from patients with other diseases (Chagas disease, Systemic Lupus Erythematosus, Leprosy and Tuberculosis). To identify the effectiveness of recombinant proteins, ROC curves were used to select antigens possibly more efficient than SLA. Recombinant proteins HSP70 and H2A were selected for having high sensitivity in recognizing sera from patients with LM and LC respectively. In the last experimental stage using sera from individuals with other pathologies, it was observed that the reduced cross-reactivity against the recombinant antigen, especially for rHSP70 when compared to that observed for the SLA. Our results show the high antigenicity of rHSP70, suggesting the possibility of using this recombinant protein for serodiagnosis of Leishmaniasis. In this work, it was possible to identify and validate the use of recombinant proteins of the parasite and of the saliva of sandflies as biomarkers for serodiagnosis and assessment of exposure to Leishmaniasis. **[Keys word]** Leishmaniasis, biomarkers, serodiagnosis, sandfly, recombinant protein.

1 INTRODUÇÃO

1.1 As leishmanioses: considerações gerais

As leishmanioses são doenças transmitidas por insetos vetores, que tem como agente etiológico protozoários do gênero *Leishmania* (Filo Sarcomastigofora, Ordem Kinetoplastidae, Família Tripanosomatidae), sendo em sua maioria zoonoses de animais silvestres. (www.who.int/tdr/diseases/leish/).

Mais de 20 espécies e subespécies de *Leishmania* são capazes de infectar seres humanos, cada uma causando diferentes espectros de sintomas. As distintas formas clínicas são: a leishmaniose visceral – também conhecida como calazar, doença sistêmica, podendo acometer vários órgãos, principalmente o fígado, o baço e a medula óssea. É uma doença de evolução longa, podendo durar alguns meses ou até ultrapassar o período de um ano e se não tratada, pode apresentar elevada taxa de mortalidade; a cutânea – caracteriza-se pela presença de lesões ulceradas na pele, principalmente nas áreas do corpo mais expostas, que apresentam cura espontânea, deixando cicatrizes; a mucocutânea – forma também tegumentar da doença, apresenta lesões que podem destruir parcialmente ou totalmente as mucosas das cavidades da boca, nariz, garganta e tecidos circundantes; a forma cutânea difusa – forma rara, produz lesões cutâneas maculopapulas nodulares, distribuídas em todo o corpo, que apresentam refratariedade aos tratamentos. Estas protozoonoses despertam atenção, especialmente quanto a sua importância médica e econômica, encontrando-se a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) entre as seis doenças infecto-parasitárias listadas como de maior importância pela Organização Mundial da Saúde (www.who.int/tdr/diseases/leish/, SVS/MS 2003 e 2007).

1.2 A epidemiologia das Leishmanioses

Atualmente, as leishmanioses ocorrem em quatro continentes e são considerada endêmica em 88 países, dos quais 72 são países em desenvolvimento. É estimado que a LTA atinja cerca de 2 milhões de novos casos das diferentes formas clínicas em todo mundo, e que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de infecção por várias espécies do parasito. Mais de 90% dos casos da leishmaniose cutânea ocorrem no Irã, Afeganistão, Síria, Arábia Saudita, Brasil e Peru. Já a leishmaniose mucosa tem 90% dos casos concentrados na Bolívia, Brasil e Peru. Nas Américas a LTA está distribuída desde o extremo Sul dos Estados Unidos

até o norte da Argentina, não havendo relato de casos apenas no Canadá, Chile e Uruguai (www.who.int/tdr/diseases/leish/; SVS/MS, 2007). No Brasil, a LTA é incluída dentre as grandes endemias, sendo uma das afecções dermatológicas que merece mais atenção, pelo risco de ocorrência de deformidades que pode produzir no homem. Apresenta ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões brasileiras (SVS/MS, 2007).

Igualmente a Leishmaniose Visceral (LV) apresenta ampla distribuição, ocorrendo na Ásia, Europa, Oriente Médio, África e nas Américas. A doença é endêmica em 88 países, onde quase todos os 500 mil novos casos anuais são provenientes de epidemias recorrentes, ocorrendo nas áreas rurais da Índia, Brasil e Sudão (www.who.int/tdr/diseases/leish/). Na América Latina, a LV já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, especialmente na Região Nordeste. A LV vem se tornando uma das doenças mais importantes da atualidade, dada a sua incidência e alta letalidade, em indivíduos não tratados, crianças desnutridas e principalmente em indivíduos coinfectados com o HIV (www.who.int/tdr/diseases/leish/, SVS/MS, 2003).

1.3 Mecanismos de Transmissão das Leishmanioses

A distribuição e a incidência das Leishmanioses são afetadas por fatores ambientais. A maioria das espécies de flebotomíneos, insetos vetores das leishmanioses, vivem em florestas, cavernas ou cavidades entre pedras, embora um grande número delas também possa invadir domicílio e anexos. Apesar da maioria dos flebotomíneos realizarem a hematofagia durante o crepúsculo e/ou à noite, algumas espécies que vivem no interior das matas também realizam sua atividade no período matutino e vespertino. A localização e a atividade por parte dos flebotomíneos nos vários horários tem grande importância epidemiológica, pela possibilidade de contato com o homem e outros reservatórios silvestres e domiciliares. A maioria dos flebotomíneos é silvestre e ataca o homem e os animais domésticos quando as habitações estão próximas à mata (FORATTINI, 1973).

As leishmanioses são transmitidas a partir da picada de seu inseto vetor, os flebotomíneos. Os flebotomíneos são insetos holometábolos completos que pertencem à ordem Diptera, subordem Nematocera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. A subfamília Phlebotominae possui dois gêneros de importância médica, os gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, vetores responsáveis pela transmissão das leishmanioses, bartonelose (verruca peruana) e febre papatasi (febre dos três dias), tendo como agentes

etiológicos, respectivamente, protozoários, bactérias e arbovírus (PESSOA, 2001). Apenas as fêmeas dos flebotomíneos são hematófagas. Estas estão aptas a hematofagia no primeiro dia de vida, porém normalmente realizam após o segundo dia, tempo em que as suas peças bucais já se encontram rígidas e as glândulas salivares amadurecidas (PRATES *et al.* 2008, VOLF *et al.* 2000)

O ciclo de vida da *Leishmania* tem início quando uma fêmea ingere formas amastigotas do parasito durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado. As amastigotas são ingeridas juntamente com sangue, livres ou dentro das células hospedeiras, os macrófagos. Dentro do intestino do inseto vetor o parasito se multiplica e se desenvolve até a forma infectiva para os hospedeiros vertebrados, as promastigotas metacíclicas. A transmissão do parasito ocorre quando o flebotomíneo infectado faz um segundo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado. Neste momento as metacíclicas são inoculadas na pele do vertebrado juntamente com a saliva (**Fig. 1**) (KAYE and SCOTT 2011).

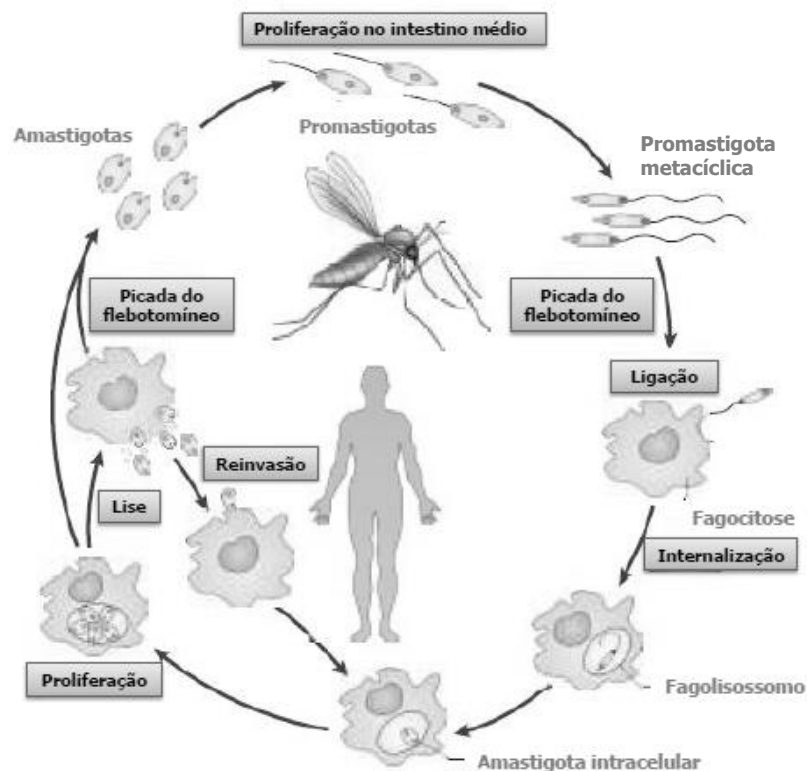


Figura 1. Ciclo de vida digenético da *Leishmania*, mostrando a fase do ciclo no hospedeiro invertebrado (flebotomíneo) e vertebrado (mamífero). Adaptado de KAYE & SCOTT, 2011.

Durante a hematofagia, a fêmea realiza várias tentativas de sondagem e sucção, até encontrar o local adequado para introduzir a probóscida. Por possuírem probóscida curta, os flebotomíneos necessitam dilacerar os vasos, causando uma pequena hemorragia, levando a

formação do “lago sanguíneo” para o sucesso da alimentação. Neste cenário a saliva cumpre um papel essencial na inibição dos mecanismos de hemostasia do hospedeiro. A hemostasia, talvez o principal empecilho para a alimentação sanguínea, compreende um conjunto de mecanismos fisiológicos utilizados pelo hospedeiro vertebrado no qual está envolvida a vasoconstricção, a agregação plaquetária e a coagulação, que em conjunto dificultam a obtenção do sangue por parte do vetor. Em resposta a estes mecanismos, os vetores hematófagos desenvolveram uma grande variedade de moléculas presentes em sua saliva com diferentes atividades farmacológicas que atuam auxiliando o repasto, isto é, neutralizando a hemostasia dos hospedeiros vertebrados (ANDRADE *et al.* 2007, COSTA *et al.* 2004, SILVA *et al.* 2005, TEIXEIRA, *et al.* 2005, TITUS and RIBEIRO 1988).

1.4 Anticorpo anti-saliva: marcadores de exposição às leishmanioses

Além dos mecanismos anti hemostásicos, a saliva dos flebotomíneos também é capaz de induzir a produção de anticorpos anti-saliva por parte do hospedeiro. BELKAID *et al.* (1998) observaram no modelo murino que a pré-exposição ao sonicação da glândula salivar (SGS) levou à produção de anticorpos anti-saliva capazes de neutralizar a capacidade do lisado em exacerbar a infecção. O efeito de anticorpos anti-saliva também foi avaliado em hamsters expostos à picada de *Phlebotomus argentipis*, nos quais se observou altos títulos de anticorpos anti componentes da saliva. O trabalho também revelou uma diminuição da atração das fêmeas de flebotomíneos à fonte alimentar, expressa com a diminuição gradual do número de fêmeas ingurgitadas, além do aumento da taxa de mortalidade durante as alimentações subsequentes (GHOSH and MUKHOPADHYAY, 1998).

A alta exposição a picadas de flebotomíneos em seres humanos também pode resultar na produção de anticorpos antissaliva. Crianças em uma área endêmica para LV que se mostraram positivas para o teste cutâneo ao antígeno de *Leishmania* apresentaram altos títulos de anticorpos antissaliva do vetor *L. longipalpis*. BARRAL *et al.* (2000) também demonstraram a presença de anticorpos IgG específicos contra o vetor do Novo Mundo, o *L. longipalpis*, em soro de crianças de uma área endêmica de LV no Brasil. Além disso, os autores verificaram uma alta frequência de reconhecimento para apenas alguns antígenos, encontrando-se as proteínas de 45, 44, 43 e a de 35 kDa entre as mais reconhecidas entre as proteínas salivares.

A composição da saliva do vetor varia entre diferentes espécies de flebotomíneos. ROHOUSOVA *et al.* (2005) demonstraram que diferentes hospedeiros (camundongo e homem) expostos a picada produzem anticorpos que reconhecem antígenos espécie-específicos da saliva. Acredita-se que a especificidade antigênica está ligada à distância filogenética entre táxons de insetos e antígenos compartilhados por espécies distintas são frequentes apenas em espécies correlatas. Soros de indivíduos residentes em uma área endêmica para LV foram testados contra o lisado da glândula salivar das espécies *L. whitmani* e *Phlebotomus papatasi*, não havendo o reconhecimento dos mesmos, reforçando a existência de uma especificidade da resposta antissaliva do *L. longipalpis* nesta área (GOMES *et al.*, 2002).

1.4.1 Proteínas recombinantes da saliva: biomarcadores de exposição aos insetos vetores

A produção de anticorpos específicos contra a saliva de flebotomíneos indica a exposição ao vetor e pode também ajudar a estimar o risco de transmissão de leishmania. Estudos epidemiológicos, que visam identificar a taxa de exposição de indivíduos em áreas endêmicas aos vetores das leishmanioses, utilizam uma grande quantidade de antígenos salivares, o que vem a ser um fator limitante para a utilização destes como biomarcadores, devido às dificuldades técnicas na obtenção e dissecação de flebotomíneos. Para avaliação de exposição à *Leishmania*, BARRAL *et al.* (2000) testaram a reatividade da proteína recombinante da saliva do *L. longipalpis* maxadilan (6,5 kDa) em soros de indivíduos de uma área endêmica, como método alternativo para a substituição da saliva total. Foi verificada uma correlação positiva entre a detecção de anticorpos anti-maxadilan e os anticorpos anti-*Leishmania*, entretanto não houve correlação com a resposta contra homogeneizado da saliva total, o que nos leva a crer que essa proteína isolada não vem a ser uma potencial candidata a utilização em estudos desta natureza.

Para outras doenças transmitidas por insetos vetores, já foram propostos diversos componentes sintéticos da saliva (obtidos através das técnicas para produção de antígenos recombinantes) como marcadores imunológicos de exposição a estes insetos vetores (FONTAINE *et al.* 2011). SANDERS *et al.* (1999), trabalhando com a proteína recombinante salivar rTC isolada do carrapato *Ixodes scapularis*, demonstraram que apesar de altamente conservada nas demais espécies de carrapatos vetores (*Amblyomma americanum* e *Dermacentor variabilis*) esta é uma importante ferramenta na avaliação do risco da transmissão da doença de Lyme nas áreas endêmicas em que a diversidade vetorial não é bem

caracterizada. Igualmente, a proteína recombinante salivar rTiSP14.6 do *Triatoma infestans* apresenta alto reconhecimento por anticorpos do soro de galinhas e porcos experimentalmente expostos à picada de triatomíneos (SCHWARZ *et al.* 2009). No entanto, o reconhecimento desta proteína não foi verificado em soros de indivíduos naturalmente expostos à picada destes vetores nas áreas endêmicas para doença de Chagas. Já a proteína recombinante da glândula salivar de *Anopheles gambiae* (gSG6), altamente conservada no gênero *Anopheles*, após ser avaliada como marcador de exposição (POINSIGNON *et al.* 2008), foi proposta como uma candidata a marcador sorológico de exposição aos vetores da malária afrotropical (RIZZO *et al.* 2011).

Concernente à saliva de flebotomíneos, houve a identificação de uma série de proteínas secretadas pela glândula salivar de *L. longipalpis*, com a construção de bibliotecas genômicas de peptídeos oriundos de várias espécies de flebotomíneos (ANDERSON *et al.* 2006, VALENZUELA *et al.* 2004). Estas bibliotecas possibilitam a clonagem e a expressão de distintas proteínas contidas na saliva desses vetores. Essas proteínas possuem sequências semelhantes a proteínas da mesma família identificada em outros dípteros (ANDERSON, *et al.* 2006). TEIXEIRA, *et al.* (2010), utilizando nove proteínas recombinantes da saliva de *L. longipalpis* fizeram uma triagem das proteínas especificamente reconhecidas por soros de cães, raposas e indivíduos provenientes de uma área endêmica para LV. Nos seres humanos, duas delas, a LJM-17 [45 kDa (*Yellow related-protein*)] e a LJM-11 [43 kDa (*Yellow related-protein*)], foram sugeridas como potenciais marcadores de exposição específica a *L. longipalpis*, vetor da *Leishmania infantum-chagasi* na América Latina.

1.5 Diagnóstico das leishmanioses: considerações gerais

Além das suspeitas clínicas bem fundamentadas, os exames laboratoriais como microscopia, sorodiagnóstico e métodos moleculares, ajudam na confirmação diagnóstica das diversas doenças infectoparasitárias (NDAO 2009). Nas leishmanioses, bem como em outras patologias, o diagnóstico efetivo e precoce é um passo determinante para tomada de decisões. O diagnóstico das leishmanioses é realizado com base em dados clínicos e epidemiológicos, associados com os resultados obtidos dos testes laboratoriais (GOTO and LINDOSO 2010)

A relação epidemiológica existente entre os indivíduos em uma área endêmica é evidente, mas, constitui uma informação importante, principalmente para o diagnóstico dos viajantes que vivem em áreas não endêmicas, que eventualmente entraram em contato com áreas endêmicas de leishmaniose. Além disso, as manifestações clínicas podem se assemelhar

com sinais e sintomas de outras doenças que apresentam lesões ulceradas e não ulceradas, a exemplo da hanseníase, paracoccidiodomicose, sífilis e tuberculose cutânea, dentre outras (REIS *et al.* 2008). Além disso, as características clínicas das leishmanioses são variadas, dependendo da espécie de leishmania envolvida e dos fatores do hospedeiro, a exemplo do estado imune (ROMERO *et al.* 2001).

1.5.1 Diagnóstico Laboratorial

Nas Leishmanioses, é desejável a obtenção do diagnóstico confirmado pelo achado do agente etiológico ou de moléculas do parasito obtidas a partir da lesão. Quando estas abordagens falham, testes imunológicos são usados para fornecer de forma indireta parâmetros para o diagnóstico.

1.5.1.1 Diagnóstico Parasitológico

Para a maioria das doenças parasitárias o padrão ouro consiste em testes utilizando a microscopia para a confirmação do agente etiológico. O diagnóstico por meio da demonstração do parasito nas leishmanioses pode ser feito em material biológico obtido através de biópsia da lesão (LTA) ou em punção aspirativa do baço, fígado, medula óssea ou linfonodo (LV). O material obtido é geralmente utilizado para a confecção de esfregaço ou impressão em lâminas. Este material também pode ser enriquecido, a fim de aumentar a sensibilidade do teste, com o isolamento em meio de cultura ou a inoculação em animais de laboratório (BOGGILD *et al.* 2007, GOTO and LINDOSO 2010, HERWALDT 1999, LUZ *et al.* 2009). No entanto, procedimentos de cultivo apresentam a desvantagem de uma possível contaminação com outros microrganismos. Igualmente a inoculação deste material em animais de laboratório, requer tempo prolongado de observações, além de estrutura e cuidados especiais com a manutenção destes animais. Ademais, os métodos parasitológicos, mesmo com alternativas que tentem aumentar a sensibilidade, esta é muito variável, pois a distribuição dos parasitas não se apresenta homogênea no mesmo tecido (GONTIJO and MELO 2004, PINERO *et al.* 1999). Somado a isso, as punções esplênicas e de medula óssea realizadas no diagnóstico da LV, são consideradas procedimentos invasivos e exigem ambientes apropriados para a coleta, não sendo procedimentos adequados para estudos epidemiológicos em larga escala (KAR 1995). Da mesma forma, a preparação de amostras

para a observação direta, sejam elas obtidas de lesões cutânea ou visceral, consomem tempo, e são dependentes de equipamentos e técnicos de laboratório qualificados.

1.5.1.2 Imunodiagnóstico

Apesar da detecção do parasito ser considerada o padrão ouro do diagnóstico das leishmanioses, nem sempre métodos baseados neste parâmetro apresenta sensibilidade satisfatória. Devido a isso, os testes indiretos, baseados na resposta imune do hospedeiro são amplamente utilizados. O teste imunodiagnóstico ideal deveria apresentar vantagem quanto a sua utilização, como ser de fácil execução, baixo custo e com resultados mais precisos. Infelizmente, apesar do baixo custo, e por vezes apresentar altos valores de sensibilidade e especificidade, muitos deles apresentam dificuldade na sua execução, principalmente quanto a reprodutibilidade dos dados. Tanto o teste de hipersensibilidade tardia (DTH), também conhecido com teste de Intradermo Reação de Montenegro (IDRM), como a sorologia anti-leishmania são usados como testes indiretos para detecção de infecções por leishmania. (BOGGILD *et al.* 2010, REED *et al.* 1986, WEIGLE *et al.* 1987).

O teste de IDRM é uma importante ferramenta para o diagnóstico das LTA, pois avalia a resposta de hipersensibilidade celular no local de inoculação do antígeno, devido a geração de células T de memória que são ativadas quando um individuo é infectado por *Leishmania*. Entretanto, este teste não distingue indivíduos infectados de indivíduos doentes, sendo por isso mais utilizado para determinar a prevalência da doença em inquéritos epidemiológicos (WEIGLE *et al.* 1987). Embora seja vastamente utilizado em diversas áreas endêmicas do mundo, não há um protocolo padrão na preparação de seu antígeno, com utilização de distintas espécies de leishmania, diferentes concentrações de inoculo e utilização de diferentes conservantes, como o timerosal e o fenol (GOTO and LINDOSO 2010, WEIGLE, *et al.* 1987, WEIGLE *et al.* 1991).

Existem vários testes sorológicos descritos para o diagnóstico das leishmanioses, sendo os mais utilizados o de Imunofluorescência Indireta (IFA) e o Ensaio Imunoenzimático (ELISA). O sorodiagnóstico é principalmente utilizado para o diagnóstico da LV, devido a grandes concentrações de anticorpos no soro dos doentes. (SARAVIA *et al.* 1989).

O IFA foi inicialmente o teste mais utilizado para o diagnóstico indireto das leishmanioses, pois apresenta vantagens em relação ao teste de IDRM, visto que as infecções

passadas tem menor influência sobre seu desempenho, apresentando melhores valores preditivos positivos e negativos (BRITO *et al.* 2001, PASSOS, *et al.* 2000). Apesar dos pacientes (especialmente os de LT) apresentarem baixos títulos de anticorpos (dependendo do tempo de doença e espécie de *Leishmania*) esta técnica permite a obtenção de melhores valores de sensibilidade, com valores superiores a 80%, chegando a alcançar até 100% de sensibilidade em alguns trabalhos (AREVALO 2011). Contudo, após o surgimento do ELISA, a IFA foi rapidamente substituída devido ao novo método apresentar melhores valores de sensibilidade, mantendo bons valores de especificidade (GOTO and LINDOSO 2010).

A técnica de ELISA é bastante utilizada para diagnosticar as leishmanioses, em especial a LV, por esta apresentar altos níveis de anticorpos circulantes no soro de pacientes quando comparados com os pacientes de LT (BRAY and LAINSON 1965, ROFFI *et al.* 1980). O uso desta técnica para o sorodiagnóstico da LT apesar da limitação descrita acima, apresenta muitas vezes sensibilidade superior aos testes parasitológicos (KAR 1995). Entre as técnicas diagnósticas indiretas, a ELISA se destaca por ser de fácil execução, além de ser um método não invasivo que permite seu uso em grande escala (MABEY *et al.* 2004).

A técnica de ELISA emprega comumente nas suas reações o antígeno solúvel de *Leishmania sp* (SLA). Apesar das técnicas realizadas com este antígeno apresentarem altos valores de sensibilidade, alguns antígenos parasitários apresentam reação cruzada com epítomos compartilhados por outros patógenos (AZAZY *et al.* 2003, DENIAU *et al.* 2003, REED, *et al.* 1986), além de nem sempre apresentarem reprodutibilidade dos resultados. Muitos pesquisadores têm se dedicado ao aumento da efetividade do ELISA usando como estratégia a busca de antígenos recombinantes de *Leishmania*. A partir do uso de antígenos isolados busca-se a eliminação da reação cruzada, combinando altos valores de sensibilidade e especificidade.

1.5.1.2.1 Sorodiagnóstico Utilizando Antígenos Recombinantes

Nas últimas décadas, um grande número de moléculas vem sendo descritas como candidatas a antígenos para o sorodiagnóstico das leishmanioses. Algumas delas são moléculas purificadas ou até mesmo frações brutas do parasito (COELHO *et al.* 2009, FERREIRA *et al.* 2003, VALE *et al.* 2009). Estas, apesar de apresentarem especificidade superior à utilização do antígeno bruto, são de difícil obtenção, o que inviabiliza sua

utilização em larga escala. Diferentemente, o uso de antígenos recombinantes são uma alternativa frente a produção laboriosa e de baixa eficiência das moléculas purificadas ou isoladas do parasito. A obtenção de molécula antigênica através da técnica de recombinação gênica permitiu a produção eficiente e controlada de proteínas recombinantes, além da produção de grandes quantidades de antígenos recombinantes (SOTO *et al.* 2009)

Muitos antígenos de superfície, proteínas ribossomais, proteínas nucleares e proteínas relacionadas a quinesina (**Fig. 2**) tem sido reconhecidos, em graus diferenciados, por anticorpos presente em soros de pacientes das diversas formas clínicas de leishmaniose. Entretanto, apesar de evidências que muitas delas já apresentarem elevada performance para o sorodiagnóstico da LV, nenhuma proteína promissora foi descrita para o sorodiagnóstico da LT.

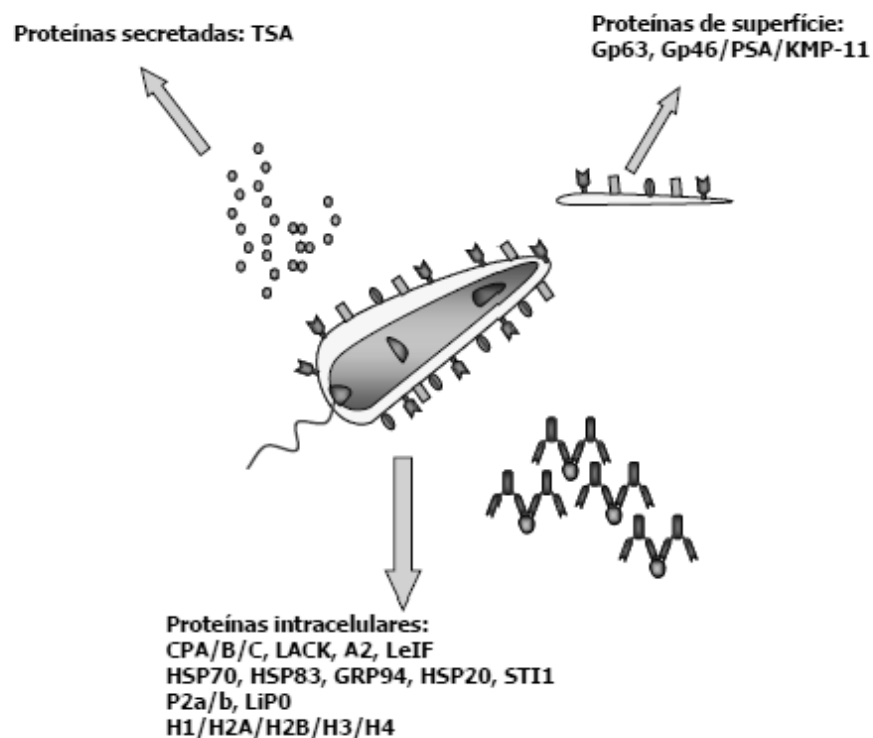


Figura 2. Diferentes categorias de proteínas recombinantes descritas como possíveis antígenos para o sorodiagnóstico das Leishmaniose.. Adaptado de SOTO *et al.*, 2009.

Dentre os antígenos secretados/excretados, a proteína TSA (*Thiol-specific antioxidant*), inicialmente isolada de sobrenadante de cultura de promastigotas e posteriormente expresso na forma recombinante, apresenta nível de reatividade intermediária, tanto para soros de pacientes de LV, quanto para soros de pacientes com LC (WEBB *et al.*

1998). Já a proteína SIR-2 (*Sirtuin-2*) apesar da alta reatividade para soros de cães com LV, apresenta também nível de reatividade intermediária para soros de pacientes com LV, não sendo demonstrado reatividade para soros de pacientes com as diferentes formas de LT (SANTAREM *et al.* 2005, SOTO *et al.* 2009) (**Quadro 01**).

Quadro 1. Relação das proteínas secretadas/excretadas descritas e sua capacidade de reconhecimento por anticorpos presentes nos soros de pacientes com leishmaniose e outras patologias.

| MOLÉCULA | Presença de anticorpos em | Sensibilidade | Reatividade cruzada | Referência |
|----------|---------------------------|--|----------------------|-------------------------------|
| TSA | LC humana | Reconhecimento por ~50% dos soros avaliados. | Ensaio não realizado | WEBB <i>et al.</i> , 1998 |
| | LV humana | Reconhecimento por ~50% dos soros avaliados. | Ensaio não realizado | WEBB <i>et al.</i> , 1998 |
| SIR-2 | LV humana | Reconhecimento por ~44,7% dos soros avaliados. | Ensaio não realizado | SANTARÉM <i>et al.</i> , 2005 |

Muitas são as proteínas de superfície demonstradas como reconhecida por anticorpos presente nos soros de pacientes das diversas formas clínicas de leishmaniose. Dentre as mais diversas proteínas de superfície, a Gp63 (*Glycoprotein of 63 kDa*) é uma das mais abundantes em promastigotas de *Leishmania sp.*, sendo bastante reconhecida por anticorpos de soros de pacientes com LV, contudo apresenta baixa antigenicidade para pacientes com LT (MAALEJ *et al.* 2003, SHREFFLER *et al.* 1993) (**Quadro 2**). Outra proteína de superfície, a KMP11 (*Kinetoplastid Membrane Protein*) foi demonstrada apresentando diferentes graus de reatividade contra soros de pacientes com leishmaniose, com maior antigenicidade quando utilizados soros de pacientes com LV (DE CARVALHO *et al.* 2003, TRUJILLO *et al.* 1999) (**Quadro 2**).

Quadro 2. Relação das proteínas de superfície descritas e sua capacidade de reconhecimento por anticorpos presentes nos soros de pacientes com leishmaniose e outras patologias.

| MOLÉCULAS | Presença de anticorpos em | Sensibilidade | Reatividade cruzada | Referência |
|-----------------|---------------------------|--|---|-----------------------------------|
| GP63 | LV humana | Reconhecimento por 84% de soros avaliados. | Baixo reconhecimento por soros de portadores de outras patologias | (SHREFFLER, <i>et al.</i> 1993) |
| | LV humana | Reconhecimento de 86% de soros avaliados. | Baixo reconhecimento por soros de portadores de outras patologias | (MAALEJ, <i>et al.</i> 2003) |
| LPG | LV humana | Reconhecimento por 92% de soros avaliados. | Baixo reconhecimento por soros de portadores de outras patologias | (MAALEJ, <i>et al.</i> 2003) |
| GBP | PKDL humana | Reconhecimento por 92-94% dos soros avaliados. | Reconhecimento por ~18% dos soros de pacientes com malária | (JENSEN <i>et al.</i> 1999) |
| | LV humana | Reconhecimento por 93-100% de soros avaliados. | Reconhecimento por ~18% dos soros de pacientes com malária | (JENSEN, <i>et al.</i> 1999) |
| | LV humana | Reconhecimento de 97% de soros avaliados. | Baixo reconhecimento por soros de portadores de outras patologias | (MAALEJ, <i>et al.</i> 2003) |
| Amastina | LC humana | Reconhecimento por 20% dos soros com doença ativa avaliados. | Ensaio não realizado | (RAFATI <i>et al.</i> 2006) |
| | LV humana | Reconhecimento por 95,2% dos soros com doença ativa avaliados. | Ensaio não realizado | (RAFATI, <i>et al.</i> 2006) |
| KMp11 | LV humana | Reconhecimento por ~79% dos soros avaliados. | Reconhecimento por soros de pacientes com malária | (JENSEN <i>et al.</i> 1998) |
| | LV humana | Reconhecimento por 100% de soros avaliados. | Sem reconhecimento por soros de pacientes com Chagas (n=15) | (PASSOS, S. <i>et al.</i> 2005) |
| | LV humana | Reconhecimento por 100% de soros com doença ativas e alguns subclínicos avaliados. | Ensaio não realizado | (DE CARVALHO, <i>et al.</i> 2003) |
| | LV humana | Reconhecimento por 76,4% dos soros avaliados. | Reconhecimento por ~44,4% dos soros de pacientes com Chagas | (TRUJILLO, <i>et al.</i> 1999) |
| | LC humana | Reconhecimento por 37,5% dos soros avaliados. | Reconhecimento por ~44,4% dos soros de pacientes com Chagas | (TRUJILLO, <i>et al.</i> 1999) |
| | LC humana | Reconhecimento por alguns soros (~50%) avaliados. | Ensaio não realizado | (DE CARVALHO, <i>et al.</i> 2003) |
| | LM humana | Reconhecimento por 60% dos soros avaliados. | Reconhecimento por ~44,4% dos soros de pacientes com Chagas | (TRUJILLO, <i>et al.</i> 1999) |

Dentre as proteínas intracelulares de *Leishmania*, muitas são indicadas como candidatas à substituição do antígeno bruto (SLA), pois apesar de serem consideradas membros de famílias conservadas (REQUENA *et al.* 2000), induzem elevada produção de anticorpos específicos nos soros de pacientes (SOTO, MANUEL, *et al.* 2009). Dentre as proteínas ribossomais ácidas descritas, uma minoria tem demonstrado antigenicidade, apresentado melhores resultados contra anticorpos de soros de pacientes de LV (SOTO, M. *et al.* 1996). (**Quadro 3**). Assim como as proteínas derivadas de histonas, apesar de extremamente conservadas (REQUENA, *et al.* 2000) apresentam elevada reatividade, especialmente a H2A e H2B, contra anticorpos de soros de pacientes com LV (MAALEJ, *et al.* 2003, PASSOS, S., *et al.* 2005), sendo pouco estudada sua reatividade frente aos soros de pacientes com LT (CARMELO *et al.* 2002) (**Quadro 4**).

Quadro 3. Relação das proteínas ribossomais ácidas descritas e sua capacidade de reconhecimento por anticorpos presentes nos soros de pacientes com leishmaniose e outras patologias.

| MOLÉCULAS | Presença de anticorpos em | Sensibilidade | Reatividade cruzada | Referência |
|------------|---------------------------|--|--|--------------------------------|
| P2A | LV humana | Reconhecimento por 50% de soros avaliados. | Reconhecimento por soros de pacientes com Chagas e Lupus | (SOTO, M., <i>et al.</i> 1996) |
| | LM humana | Reconhecimento por 76% de soros avaliados. | Reconhecimento por soros de pacientes de Chagas e Lupus | (SOTO, M., <i>et al.</i> 1996) |
| P2B | LV humana | Reconhecimento por 40% de soros avaliados. | Reconhecimento por soros de pacientes de Chagas e Lupus | (SOTO, M., <i>et al.</i> 1996) |
| | LM humana | Reconhecimento por 42% de soros avaliados. | Reconhecimento por soros de pacientes de Chagas e Lupus | (SOTO, M., <i>et al.</i> 1996) |

Quadro 4. Relação das proteínas derivadas de histonas descritas e sua capacidade de reconhecimento por anticorpos presentes nos soros de pacientes com leishmaniose e outras patologias.

| MOLÉCULAS | Presença de anticorpos em | Sensibilidade | Reatividade cruzada | Referência |
|------------|---------------------------|--|---|--------------------------------------|
| H1 | LC humana | Reconhecimento por 66% de soros avaliados. | Reconhecimento por 40% de soros Chagas | (CARMELO, <i>et al.</i> 2002) |
| | H2A | | | |
| | LV humana | Reconhecimento por 100% de soros avaliados. | Sem reconhecimento por soros de pacientes de Chagas (n=15) | (PASSOS, S., <i>et al.</i> 2005) |
| | LV humana | Reconhecimento por 100% de soros avaliados. | Baixo reconhecimento por soros de portadores de outras patologias | (MAALEJ, <i>et al.</i> 2003) |
| H2B | LV humana | Reconhecimento por 100% de soros avaliados. | Baixo reconhecimento por soros de portadores de outras patologias | (MAALEJ, <i>et al.</i> 2003) |
| | LV humana | Reconhecimento por 80,3% de soros avaliados. | Ensaio não realizado | (MEDDEB-GARNAOUI <i>et al.</i> 2010) |

Entre as proteínas intracelulares, as proteínas de choque térmico (HSP) tem demonstrado maior antigenicidade para o diagnóstico da LT, em especial a HSP70 e a HSP83, sobretudo contra soros de leishmaniose mucosa (CELESTE *et al.* 2004, SKEIKY *et al.* 1995). Para os soros de pacientes com LCD, a HSP83 apresentou alto reconhecimento, principalmente quando analisada o reconhecimento por imunoglobulina da subclasse IgG4 (SKEIKY *et al.* 1997). Apesar dos resultados promissores, os trabalhos utilizando estes antígenos recombinantes foram conduzidos em um pequeno painel de soros, não validando a efetividade destes para o sorodiagnóstico das diversas formas clínicas da LTA (**Quadro 5**).

Quadro 5. Relação das proteínas de choque térmico descritas e sua capacidade de reconhecimento por anticorpos presentes nos soros de pacientes com leishmaniose e outras patologias.

| MOLÉCULAS | Presença de anticorpos em | Sensibilidade | Reatividade cruzada | Referência |
|--------------|---------------------------|---|--|----------------------------------|
| HSP83 | LC humana | Baixo reconhecimento por soros (sem valores) avaliados. | Ensaio não realizado | (SKEIKY, <i>et al.</i> 1995) |
| | LM humana | Reconhecimento por 96% dos soros avaliados. | Ensaio não realizado | (SKEIKY, <i>et al.</i> 1995) |
| | LC humana | Reconhecimento por ~76% dos soros avaliados. | Sem reconhecimento por soros de pacientes de Chagas (n=10) | (CELESTE, <i>et al.</i> 2004) |
| | LM humana | Reconhecimento por 100% dos soros avaliados. | Sem reconhecimento por soros de pacientes de Chagas (n=10) | (CELESTE, <i>et al.</i> 2004) |
| | LCD humana | Alto reconhecimento por soros avaliados. | Ensaio não realizado | (SKEIKY, <i>et al.</i> 1997) |
| GRP94 | LV humana | Reconhecimento por ~78% dos soros avaliados. | Ensaio não realizado | (LARRETA <i>et al.</i> 2002) |
| | LM humana | Reconhecimento por ~61% dos soros avaliados. | Ensaio não realizado | (LARRETA, <i>et al.</i> 2002) |
| HSP60 | LC humana | Alto reconhecimento por soros avaliados. | Ensaio não realizado | (REY-LADINO <i>et al.</i> 1997) |
| HSP70 | LV humana | Reconhecimento por ~50% dos soros avaliados. | Sem reconhecimento por soros de pacientes de Chagas (n=20) | (MACFARLANE <i>et al.</i> 1990) |
| | LV humana | Reconhecimento por todos soros (n=4) avaliados. | Sem reconhecimento por soros de pacientes de Chagas (n=7) | (DE ANDRADE <i>et al.</i> 1992) |
| | LV humana | Reconhecimento por 78,9% de soros avaliados. | Reconhecimento por 80% de soros Chagas (n=10) | (QUIJADA <i>et al.</i> 1998) |
| | LC humana | Sem reconhecimento por soros avaliados. | Sem reconhecimento por soros de pacientes de Chagas (n=20) | (MACFARLANE, <i>et al.</i> 1990) |
| | LC humana | Reconhecimento por 100% dos soros avaliados. | Ensaio não realizado | (SKEIKY, <i>et al.</i> 1995) |
| | LC humana | Reconhecimento por 83,3% dos soros avaliados. | Reconhecimento de 18,75% por soros de pacientes de Chagas | (ZURITA <i>et al.</i> 2003) |
| | LM humana | Sem reconhecimento por soros avaliados. | Sem reconhecimento por soros de pacientes de Chagas (n=20) | (MACFARLANE, <i>et al.</i> 1990) |
| | LM humana | Reconhecimento por 100% dos soros avaliados. | Ensaio não realizado | (SKEIKY, <i>et al.</i> 1995) |
| | LM humana | Reconhecimento por 84,6% de soros avaliados. | Reconhecimento de 80% por soros de pacientes Chagas (n=10) | (QUIJADA, <i>et al.</i> 1998) |
| | LM humana | Reconhecimento de 85% dos soros avaliados. | Reconhecimento de 18,75% por soros de pacientes de Chagas | (ZURITA, <i>et al.</i> 2003) |
| HSP90 | LV humana | Reconhecimento por todos soros (n=4) avaliados. | Sem reconhecimento por soros de pacientes de Chagas (n=7) | (DE ANDRADE, <i>et al.</i> 1992) |

Outra classe de antígenos intracelulares que vem sendo descrita como possível substituto para o SLA são as CPs (*Cysteine proteinases*), similarmente à maioria dos antígenos recombinantes, estes apresentam maior reatividade contra anticorpos de soros de pacientes com LV (RAFATI *et al.* 2003, RAFATI *et al.* 2001) (**Quadro 6**).

Quadro 6. Relação das cisteínas proteases descritas e sua capacidade de reconhecimento por anticorpos presentes nos soros de pacientes com leishmaniose e outras patologias

| MOLÉCULAS | Presença de anticorpos em | Sensibilidade | Reatividade cruzada | Referência |
|-----------|---------------------------|---|---|------------------------------------|
| CPA | LV humana | Reconhecimento por 11% dos soros avaliados. | Ensaio não realizado | (RAFATI, <i>et al.</i> 2003) |
| | CL humana | Reconhecimento por 20% dos soros avaliados. | Ensaio não realizado | (RAFATI, <i>et al.</i> 2001) |
| CPB | LV humana | Reconhecimento por 76% dos soros avaliados. | Ensaio não realizado | (RAFATI, <i>et al.</i> 2003) |
| CPC | LV humana | Reconhecimento por mais de 50% dos soros avaliados. | Ensaio não realizado | (KHOSHGOO <i>et al.</i> 2008) |
| | LC humana | Baixo reconhecimento por soros avaliados. | Ensaio não realizado | (KHOSHGOO, <i>et al.</i> 2008) |
| Ldcccys1 | LV humana | Reconhecimento por 80% de soros avaliados | Com reconhecimento por soros de pacientes com tuberculose | (DE SOUZA DIAS <i>et al.</i> 2005) |

Dentre os diversos antígenos recombinantes descritos como prováveis candidatos para o sorodiagnóstico da LV, destaca-se o rK39, proteína da família das quinesinas, isolada da *L. infantum-chagasi* que a princípio apresentou alta sensibilidade e especificidade em comparação com o SLA, sendo considerado um marcador de doença ativa. Apesar de conservada em pelo menos sete espécies de *Leishmania*, este não apresenta reatividade por soros de pacientes com LM e LC (BADARO *et al.* 1996, BURNS *et al.* 1993) (**Quadro 7**).

Quadro 7. Relação das cisteínas proteases descritas e sua capacidade de reconhecimento por anticorpos presentes nos soros de pacientes com leishmaniose e outras patologias.

| MOLÉCULAS | Presença de anticorpos em | Sensibilidade | Reatividade cruzada | Referência |
|------------------|----------------------------------|---|---|-----------------------------------|
| A2 | LV humana | Reconhecimento de 77% dos soros avaliados | Sem reconhecimento por soros de cães portadores de outras patologias. | (CARVALHO, <i>et al.</i> 2002) |
| K39 | LV humana | Reconhecimento por 98% (brasileiros) e 100% (sudaneses) dos soros | Sem reconhecimento por soros de pacientes de Chagas | (BURNS, <i>et al.</i> 1993) |
| | LV humana | Reconhecimento por 99% de soros avaliados | Sem reconhecimento por soros de portadores de outras patologias | (BADARO, <i>et al.</i> 1996) |
| | LV humana | Reconhecimento por 93,3% dos soros avaliados | Sem reconhecimento para soros de Chagas e Tuberculose | (BRAZ <i>et al.</i> 2002) |
| | LV humana | Reconhecimento por 100% dos soros avaliados | Sem reconhecimento por soros de portadores de outras patologias | (MAALEJ, <i>et al.</i> 2003) |
| | LV humana | Reconhecimento por 90% dos soros avaliados | Sem reconhecimento por soros de portadores de outras patologias | (DE CARVALHO, <i>et al.</i> 2003) |
| | LV humana | Reconhecimento por 100% dos soros avaliados | Ensaio não realizado | (MOHAPATRA <i>et al.</i> 2010) |
| | LC humana | Sem reconhecimento por soros avaliados | Sem reconhecimento por soros de pacientes de Chagas | (BURNS, <i>et al.</i> 1993) |
| | LM humana | Sem reconhecimento dos soros avaliados | Sem reconhecimento por soros de pacientes de Chagas | (BURNS, <i>et al.</i> 1993) |
| K9 | LV humana | Reconhecimento por 78% de soros avaliados | Ensaio não realizado | (MOHAPATRA, <i>et al.</i> 2010) |
| K26 | LV humana | Reconhecimento por 38% de soros avaliados | Ensaio não realizado | (MOHAPATRA, <i>et al.</i> 2010) |

2 OBJETIVOS

Propomos neste estudo a validação de biomarcadores de exposição ao *L. longipalpis* e a melhoria do sorodiagnóstico da LTA através da utilização das proteínas recombinantes da saliva do *L. longipalpis* LJM17+LJM11 e das recombinantes de *L. infantum-chagasi* (H2A, H2B, H3, H4, HSP70 e KMP11). A utilização das proteínas recombinantes da saliva de flebotomíneos pode servir como indicadores úteis para verificar a distribuição espacial de flebotomíneos em uma determinada região, contribuindo assim para direcionar os esforços de controle de vetores e doenças, somado a isso, a utilização dos antígenos recombinantes da *Leishmania* pode favorecer o desenvolvimento de melhores ferramentas diagnósticas para a LTA.

2.1. Objetivos Específicos:

2.1.1 Objetivo Específico I:

Utilização de proteínas recombinantes da saliva dos flebotomíneos como biomarcadores de exposição ao vetor.

- Identificar proteínas antigênicas salivares para serem utilizadas como método alternativo ao sonicação de glândula salivar;
- Determinar a sensibilidade das proteínas recombinantes selecionadas individualmente e combinadas na detecção da exposição ao vetor;
- Determinar a especificidade dos antígenos recombinantes em distintas áreas endêmicas;
- Validar os antígenos recombinantes numa grande população de indivíduos de área endêmica.

2.1.2 Objetivo Específico II:

Utilizar proteínas recombinantes da *Leishmania infantum* como biomarcadores para obtenção do diagnóstico sorológico mais preciso da leishmaniose tegumentar humana

- Identificar proteínas antigênicas como método alternativo ao antígeno solúvel de leishmania para a obtenção de antígenos parasitários;
- Determinar a sensibilidade das proteínas recombinantes identificadas no diagnóstico da LTA;
- Testar a especificidade dos antígenos recombinantes utilizando soros de pacientes com outras patologias.

3 Metodologia empregada para a execução do objetivo específico I

3.1 Desenho do Estudo

O estudo foi dividido em três fases (**Fig. 3**). Diferentes conjuntos de amostras de soros foram selecionados aleatoriamente a partir de três levantamentos epidemiológicos independentes, previamente realizados em duas áreas endêmicas de leishmaniose (uma para LV e outra para leishmaniose cutânea). Na primeira fase, 26 amostras de soro foram obtidas de crianças com menos de 7 anos, através de um levantamento epidemiológico numa área endêmica para LV (município de São Luiz, Estado do Maranhão), área onde o vetor responsável pela transmissão é o *L. longipalpis*. Estas amostras foram selecionadas com base em resultados de soroconversão previamente realizados utilizando o SGS do *L. longipalpis*. O ponto de corte (*cut-off*) do ELISA anti-SGS foi estabelecido através do cálculo da média mais três vezes o desvio-padrão da densidade ótica (DO) das amostras de soro de 26 indivíduos de uma área urbana não-endêmica. As amostras de soro com DO acima deste *cut-off* (0.073) foram consideradas positivas para SGS. A mesma metodologia foi aplicada para avaliar os pontos de corte para as proteínas recombinantes utilizadas. O objetivo principal foi definir os valores de *cut-off* e verificar a concordância de soroconversão contra o SGS e as proteínas recombinantes.

Na segunda parte do estudo, buscou-se verificar se as proteínas recombinantes eram úteis para discriminar a positividade anti-SGS. Para isso, foram selecionadas randomicamente mais 80 pessoas da mesma área endêmica, sendo 40 positivos e 40 negativos para SGS, e então foi realizada a sorologia contra as proteínas recombinantes. Foram construídas curvas ROC (*Receiver Operator Characteristic*) para cada proteína isoladamente e para as proteínas combinadas, onde se determinou novos *cut-off's* apresentando altas sensibilidade e especificidade, a partir do maior índice de probabilidade de discriminação estabelecido pela curva. Além disso, para avaliar a especificidade em relação à reatividade a antígenos da saliva de outros flebotomíneos, utilizamos 40 amostras de soros obtidas de um inquérito epidemiológico realizado numa área endêmica para Leishmaniose Tegumentar Americana (Canoas, uma região rural, localizada perto de Santo Amaro, Bahia, Brasil). Nesta região, o *L. intermedia* representa a principal espécie de flebotomíneo, com *Leishmania braziliensis* sendo o agente etiológico da leishmaniose nesta região. O *L. intermedia* e *L. longipalpis*

normalmente vivem em diferentes ecossistemas e raramente os indivíduos são expostos a ambas as espécies (SOUZA, *et al.*, manuscrito em preparação).

A terceira parte do estudo consistiu na validação da sorologia para detecção de anticorpos contra proteínas recombinantes da saliva do *L. longipalpis* como um possível marcador da exposição ao vetor. Foi utilizado um grande painel constituído de 1.077 soros de um levantamento em outra população feito através de visitas domiciliares. Para isso, amostras de soros foram obtidas de crianças residentes em duas áreas endêmicas para a LV (Vila Nova e Bom Viver), no município de Raposa, Estado do Maranhão, Brasil. Vila Nova e Bom Viver tem uma população de aproximadamente de 2.600 e 4.307 moradores, respectivamente. Dentro desta população, um total de 1.297 crianças menores de 10 anos foram identificadas e, destas, 1.077 crianças foram incluídas no estudo (220 indivíduos retiraram o consentimento).

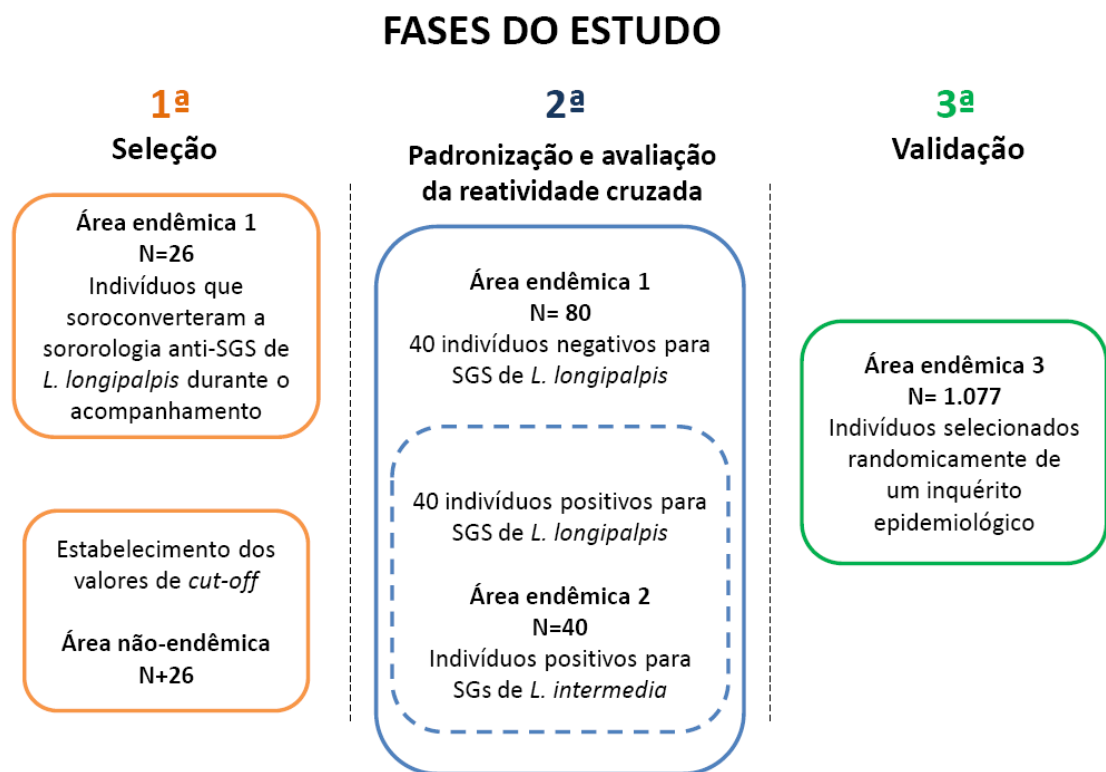


Figura 3. Fluxograma do estudo utilizando as proteínas recombinantes da saliva do *Lutzomyia longipalpis*. O estudo foi dividido em três fases. Na 1ª e 2ª fase, as amostras de soros foram obtidas de São Luís, Estado do Maranhão, no nordeste do Brasil. Na 2ª fase, também foram utilizadas 40 amostras de uma área endêmica de leishmaniose tegumentar, Canoas, região rural do Estado da Bahia, Brasil (caixa tracejada). Na 3ª fase foram utilizadas amostras de soros obtidas de crianças que residem em outras duas áreas endêmicas de leishmaniose visceral (Vila Nova e Bom Viver), no município de Raposa, Estado do Maranhão, Brasil.

3.2 Obtenção das glândulas salivares para os estudos sorológicos:

Para obtenção do antígeno solúvel das glândulas salivares, espécies de *Lutzomyia longipalpis* provenientes do município de Cavunge foram colonizadas no Centro de Pesquisas, Gonçalo Moniz-FIOCRUZ, conforme já descrito (MODI and TESH 1983). Fêmeas adultas de *L. longipalpis* em jejum sanguíneo eram mantidas apenas com solução açucarada por cerca de 5 dias (após a emergência) e tiveram suas glândulas extraídas sob uma lupa, com auxílio de pinça e estiletos entomológicos. As glândulas extraídas foram colocadas em microtubos de 1,5 mL contendo solução salina e armazenadas a -70° C até o momento do uso. Antes da utilização, as glândulas salivares foram sonicadas a uma frequência de 40 Hz com três seqüências de 20 pulsos (Branson Sonifier 450, Danbury, USA). As glândulas foram mantidas resfriadas durante todo o processo e após a sonicação foram centrifugadas a 10.000 rpm, a 4° C por 5 minutos (Eppendorf Centrifuge 5810 R). Os sobrenadantes foram coletados para os experimentos, constituindo o sonicado de glândula salivar (SGS).

3.3 Obtenção das proteínas recombinantes da saliva de *L. longipalpis* para os estudos sorológicos:

As proteínas recombinantes da saliva do *L. longipalpis* (LJL-23, LJM-17, LJL-11, LJL-04, LJL-143, LJM-111, LJM-11, LJL-13 e LJL-138) foram produzidas pelo Dr. Jesus Valenzuela (NIH, USA), que possui estreita colaboração com o nosso grupo de pesquisa. Os métodos utilizados na clonagem e expressão destas proteínas estão descritos em (TEIXEIRA, C., *et al.* 2010)

3.4 Identificação de proteínas recombinantes reconhecidas pelo soro dos indivíduos expostos à picada do *L. longipalpis* através de Dot blot.

O Dot Blot foi utilizado para selecionar as proteínas recombinantes disponíveis (LJL-13, LJL-138, LJL-23, LJM-17, LJL-11, LJL-04, LJL-143, LJM-111 e LJM-11) potencialmente candidatas à substituição do padrão ouro (SGS). Para o Dot blot, a membrana de nitrocelulose foi recortada e posta em poços de uma placa de 46 poços para a realização das incubações. Proteínas da glândula salivar do vetor *L. longipalpis* (5 pares) e das

recombinantes candidatas (1ug) foram transferidas para membranas de nitrocelulose com um volume aproximado de 10 uL. As membranas contendo os antígenos foram bloqueados com TBS Tween 0,05% mais 5% de leite desnatado durante 2 horas à 37° C. Após 3 ciclos de lavagem com TBS Tween 0,05% com duração de 5 minutos cada, os soros dos voluntários expostos à picada do *L. longipalpis* (VINHAS *et al.* 2007) na diluição 1:50 em TBS Tween 0,05% mais 5% de leite desnatado, foram colocados num volume de 600 uL por poço sobre as membranas. Os soros foram incubados durante 2 horas a 37°C. Após feitas três lavagens, foi adicionado o segundo anticorpo (anti-IgG conjugado a fosfatase alcalina – SIGMA) na diluição de 1: 1000, durante uma hora a 37°C. Após mais uma serie de lavagens, finalmente a membrana foi revelada com o substrato para fosfatase alcalina (Western Blue - Promega) (Dados não mostrados).

3.5 ELISA para detecção de anticorpos anti-saliva de flebotomíneos e anti-proteínas recombinantes:

As sorologias foram realizadas através do ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) conforme descrito por BARRAL *et al.* (2000), com algumas adaptações. Para isso, placas de 96 poços foram sensibilizadas com SGS de *L. longipalpis*, o equivalente a 5 pares de glândulas salivares/mL (aproximadamente 5 ug de proteína / ml), ou com 1ug de cada proteína recombinante/mL (usadas isoladamente ou em combinação) em tampão carbonato (NaHCO₃ 0,45M, Na₂CO₃ 0,02 M, pH 9,6) durante a noite a 4°C. Após três lavagens com PBS-Tween 0,05%, as placas foram bloqueadas por 1 hora em 37°C com PBS Tween 0,1%, mais 0,05% de BSA. Os soros foram diluídos 1:100 com PBS-Tween 0,05% e incubadas à 37°C por 1 hora. Novamente foram lavadas e, após uma última lavagem, os poços foram incubados com fosfatase alcalina, conjugada com anti-IgG humano (Sigma, Sr. Louis, MO), na diluição 1:5000 por 60 minutos, à 37°C. Mais uma vez as placas foram lavadas, e colocadas para revelar por 30 minutos com uma solução cromogênica de p-nitrofenilfosfato em tampão carbonato de sódio pH 9.6 com 1mg/mL de MgCl₂. A reação foi interrompida com NaOH 3M, e a leitura da placa foi realizada a 405 nm. As concentrações de saliva ou proteínas recombinantes utilizadas foram determinadas em um experimento de dose-resposta para avaliar um sinal ótimo mantendo-se a especificidade. Em todos os experimentos, os valores obtidos foram subtraídos dos obtidos no *background*. Os experimentos sorológicos

foram repetidos duas vezes obtendo-se resultados semelhantes. Os ensaios com as proteínas recombinantes foram realizados às cegas em relação aos resultados do ELISA anti-SGS.

3.6 Análise estatística:

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad software Prisma 5.0 (GraphPad Prism Inc., San Diego, CA). Os dados sobre os níveis de anticorpos antes e após a soroconversão para SGS foram comparados através do teste pareado de Wilcoxon. O teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn foi utilizado para comparações múltiplas estimando, assim, as diferenças de valores entre as densidades óticas dos três grupos. As curvas ROC foram utilizadas para estabelecer os valores de *cut-off* com base na identificação dos valores de sorologia, que apresentaram uma maior sensibilidade e especificidade na predição da positividade anti-SGS. As análises de correlação entre os títulos de anticorpos contra o SGS e contra as proteínas recombinantes LJM17 e LJM11 foram realizadas por meio do teste não paramétrico de Spearman. Para a validação da sorologia na terceira fase do estudo, o cálculo da sensibilidade, especificidade e valores preditivos foram feitos por meio de tabelas de contingência. Em todos os casos, os valores apresentaram diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4 Resultados do Objetivo Específico I

Após a avaliação da reatividade das sete proteínas recombinante da saliva do *L. longipalpis* utilizadas (LJL04 [13,8 kDa (protein SL1)], LJL143 [32,4 kDa Hypothetical protein (*P. falciparum*)], LJM111 [42,9 kDa (Yellow related-protein)], LJM11 [43,2 kDa (Yellow related-protein)], LJM17 [45,2 kDa (Yellow related-protein)] e LJL11 [60,5 kDa (5' Nucleotidase)] LJL-13[26,5 kDa (*D7 salivary protein*)], LJL-23 [35,1 kDa (Putative apyrase)], LJL-138 [43,7 kDa (agCP9602)] foram selecionadas as rLJM17 e rLJM11 por apresentarem alto reconhecimento nos soros de voluntários expostos à picada do *L. longipalpis*, similar ao reconhecimento observado para o SGS (dados não mostrados). Além disso, estas proteínas não foram reconhecidas no *pool* de soros controles de áreas não endêmicas.

Após a seleção, as proteínas rLJM17 e rLJM11 foram testadas, a fim de verificarmos a associação destas com a exposição ao *L. longipalpis*. Para isso, examinamos a reatividade da SGS total, rLJM17 e rLJM11 utilizando amostras de soros de 26 crianças que apresentaram soroconversão ao SGS em um período de seis meses. A **Figura 4A** mostra os níveis de anticorpos anti-SGS no tempo 0 e 6 meses, demonstrando um aumento significativo na densidade ótica (DO) das amostras. Utilizando os mesmos soros, foram realizados novos ensaios, agora com as proteínas rLJM17, rLJM11 ou com a combinação das duas proteínas. Tanto a rLJM17 quanto a rLJM11 foram capazes de identificar a soroconversão para SGS em um número variável de amostras (**Fig. 4B-C**). Quando combinamos as duas proteínas, observamos um consideravelmente aumento da detecção da soroconversão anti-SGS, uma vez que apenas quatro amostras foram negativas dentre aquelas positivas para SGS (**Fig. 4D**). Além disso, de acordo com estes resultados, os valores de DO anti-rLJM11 e anti-rLJM17 foram menores em comparação com anti-SGS (**Fig. 4E**). Já as sorologias utilizando as duas proteínas recombinantes combinadas apresentaram maiores valores de DO, semelhante ao padrão observado para anti-SGS (**Fig. 4E**). A análise de amostras de soro por Western-blot mostrou que algumas delas reconhecem apenas a rLJM17, enquanto outras reconhecem apenas a rLJM11 (dados não mostrados).

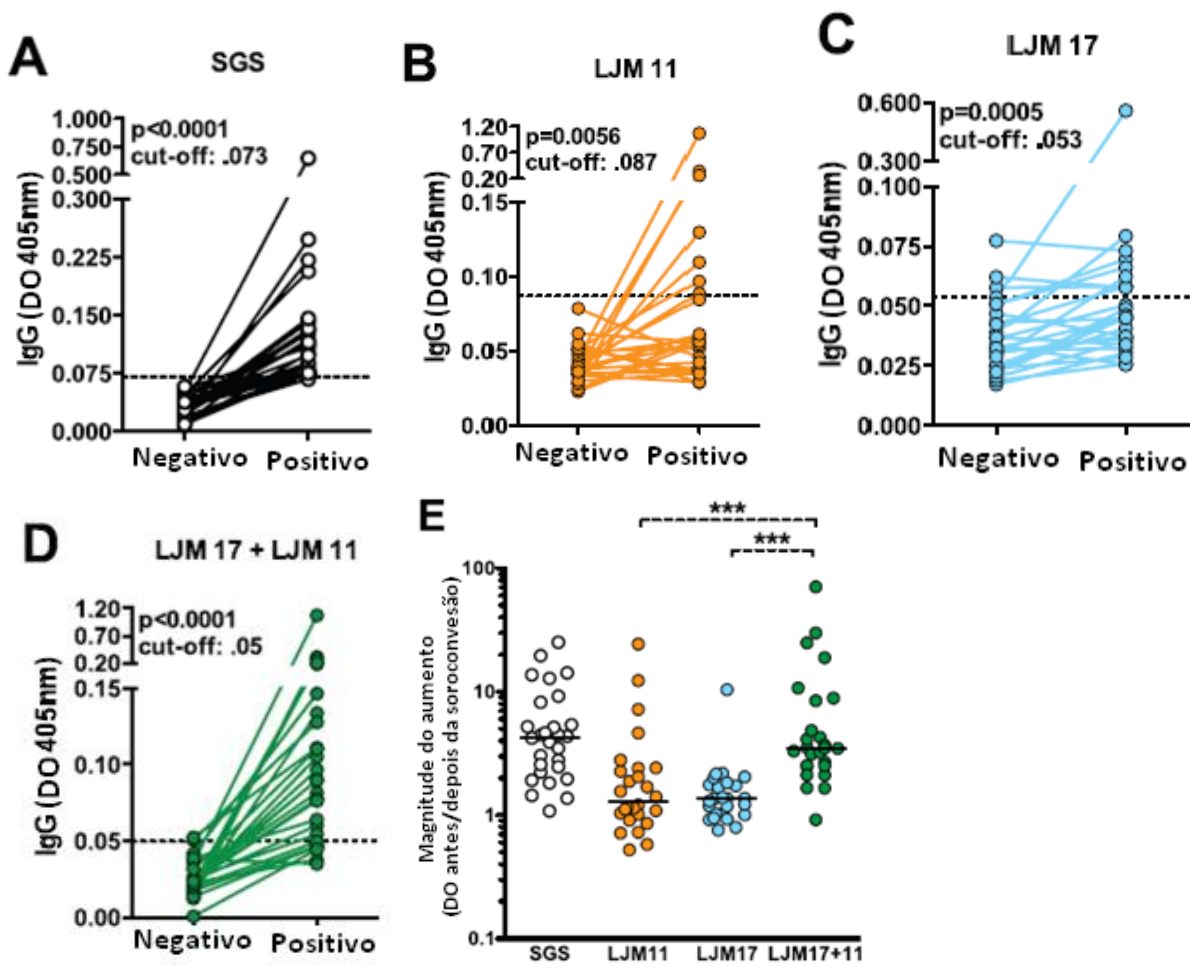


Figura 4. Proteínas recombinantes salivares de *L. longipalpis* como marcador de exposição ao vetor. Soros de indivíduos residentes em uma área endêmica de LV ($n = 26$) foram testadas através do ELISA contra SGS, rLJM11, rLJM17 e rLJM11 + rLJM17. A, títulos de anticorpos anti-SGS em indivíduos antes e depois da soroconversão ao SGS (*cut-off*: 0,073). B, títulos de anticorpos anti-rLJM11 antes e depois da soroconversão ao SGS (*cut-off*: 0,087). C, títulos de anticorpos anti-rLJM17 antes e depois da soroconversão ao SGS (*cut-off*: 0,053). D, títulos de anticorpos contra rLJM11 + rLJM17 antes e depois da soroconversão ao SGS (*cut-off*: 0,05). E, para cada indivíduo, a magnitude da soroconversão foi estimada pela razão entre os níveis de anticorpos antes e depois da soroconversão. Os dados sobre os níveis de anticorpos antes e após a soroconversão para SGS foram comparados através do teste pareado de Wilcoxon. As razões foram comparadas através do teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn para comparações múltiplas. Não houve diferença estatística entre os valores das medianas dos grupos SGS e rLJM17 + rLJM11. Além disso, os grupos rLJM11 e rLJM17 não apresentaram diferenças entre si, porém, ambos apresentaram razões significativamente menores quando comparados ao grupo SGS ($p < 0.0001$ para ambas as comparações). *** $p < 0.0001$.

Também foi avaliada a eficácia das proteínas recombinantes em prever a soroconversão anti-SGS utilizando um maior número de indivíduos ($n = 80$), em que 40 eram negativos e 40 eram positivos para anti-SGS. A combinação da rLJM17 e rLJM11 aumentou a eficácia do teste em relação ao rLJM17 (8%) e rLJM11 (17%) quando testadas sozinhas, o que pôde ser estimado através de uma maior área sob a curva (**Fig. 5A**). Assim, a sorologia utilizando-se a combinação destes dois antígenos salivares (rLJM17 + rLJM11) é adequada para uma maior discriminação de indivíduos expostos à saliva do *L. longipalpis* (AUC: 0,89; $p < 0,0001$; *cut-off*: 0,054; razão de probabilidade: 8,34) em comparação com o uso de LJM17 (AUC = 0,81; $p < 0,0001$; *cut-off*: 0,022; razão de probabilidade: 5,69) ou LJM11 (AUC: 0,72; $p = 0,035$; *cut-off*: 0,063; razão de probabilidade: 2,16) separadamente (**Fig. 5B**).

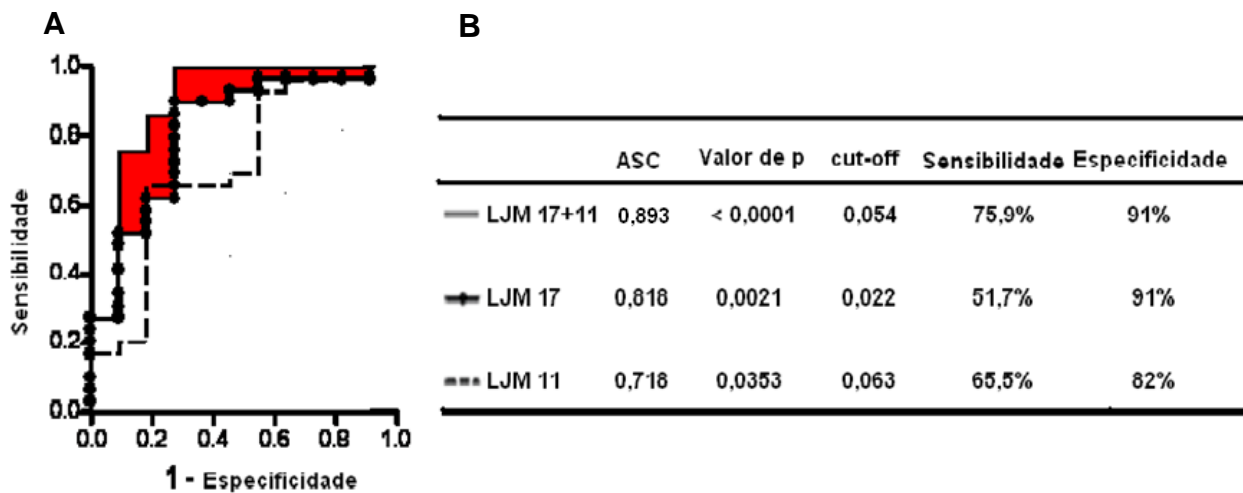


Figura 5. Curvas ROC dos níveis de anticorpos limiars para predição da positividade contra SGS. A, As curvas ROC foram construídas utilizando os dados relativos aos níveis séricos de anticorpos de 40 indivíduos que soroconverteram e 40 que não sofreram soroconversão contra diferentes proteínas recombinantes da saliva, como descritos na Figura 1. A área preenchida representa o aumento da sensibilidade e da especificidade obtidos a partir dos resultados utilizando rLJM17 + rLJM11 comparado com o melhor resultado para estes antígenos sozinhos. B, informações detalhadas obtidas de cada curva ROC (área sob a curva, os valores de p , os valores de *cut-off* escolhidos, a sensibilidade e especificidade com o intervalo de confiança de 95%).

Buscando validar tanto o SGS quanto as proteínas recombinantes salivares como marcadores de exposição à *L. longipalpis*, foi avaliada a especificidade, através de um teste de reatividade cruzada para indivíduos expostos à outra espécie vetora. Assim, testaram-se amostras de soro de uma área endêmica para leishmaniose tegumentar (Canoa, Bahia, Brasil), em que a principal espécie de flebotomíneo é o *Lutzomyia intermedia*. O *L. longipalpis* e o *L. intermedia* normalmente vivem em diferentes ecossistemas e raramente os indivíduos são

expostos aos dois vetores. Foram utilizados soros de 40 indivíduos expostos a *L. intermedia* obtidos em um inquérito epidemiológico anterior (DE MOURA *et al.* 2007) para analisar a reatividade cruzada frente ao SGS total e à combinação da rLJM17 e rLJM11. Além disso, foram realizadas sorologias anti-SGS de *L. intermedia* de 40 indivíduos que viviam em uma área endêmica para *L. longipalpis* (**Fig. 6**). Quase todos os indivíduos da área endêmica de *L. longipalpis* apresentam sorologia positiva para este vetor, mas nenhum deles foi positivo para o anti-SGS de *L. intermedia* (**Fig. 6**). Trinta e oito dos 40 indivíduos da área endêmica de *L. intermedia* apresentaram sorologia positiva para a saliva deste vetor, sendo que seis também reconheceram o SGS de *L. Longipalpis*, um reconheceu a rLJM11, dois reconheceram a rLJM17 (dados não mostrados), sendo que os mesmos dois reconheceram a combinação das duas proteínas recombinantes (**Fig. 6**). Assim, ao final da segunda fase do estudo verificou-se que tanto SGS quanto as proteínas recombinantes salivares de *L. Longipalpis* apresentam baixa reatividade cruzada contra um vetor de área endêmica diferente e que também possui ampla distribuição, como é o caso do *L. intermedia*.

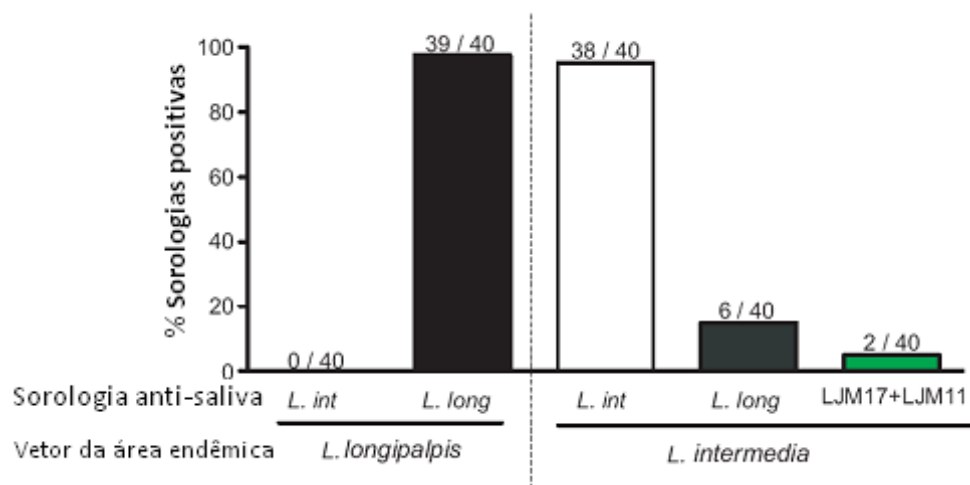


Figura 6. Avaliação da especificidade do SGS do *L. longipalpis* e das proteínas recombinantes salivares. A, amostras de 40 indivíduos de uma área endêmica para *L. longipalpis* foram testado para sorologia contra o SGS do *L. intermedia*. Além disso, 40 indivíduos de uma área endêmica para *L. intermedia* foram testados para sorologia contra *L. longipalpis*.

Além disso, foi possível estabelecer a combinação das duas proteínas recombinante como um bom preditor de exposição à *L. longipalpis*, uma vez que a análise da curva ROC mostrou uma sensibilidade de 91% e uma especificidade de 76% com o valor de *cut-off* de 0,054 para as densidades óticas das sorologias anti- proteínas recombinantes, e com razão de probabilidade de 8,34. A etapa final do estudo validou a utilização destes antígenos salivares

como um marcador confiável de exposição à *L. longipalpis*. Para isso, testamos um grande painel de 1.077 amostras de soros de crianças de outra área endêmica de LV. Soros positivo contra LJM17 + LJM11 exibiam uma correlação positiva com níveis de IgG anti-SGS (Spearman $r = 0,379$, $p < 0,0001$) (Fig. 7A). Entre os 1.077, quando foram considerados apenas os indivíduos que soroconverteram ao SGS ($n = 200$), essa correlação se tornou mais forte (Spearman $r = 0,491$; $p < 0,0001$) (Fig. 7B).

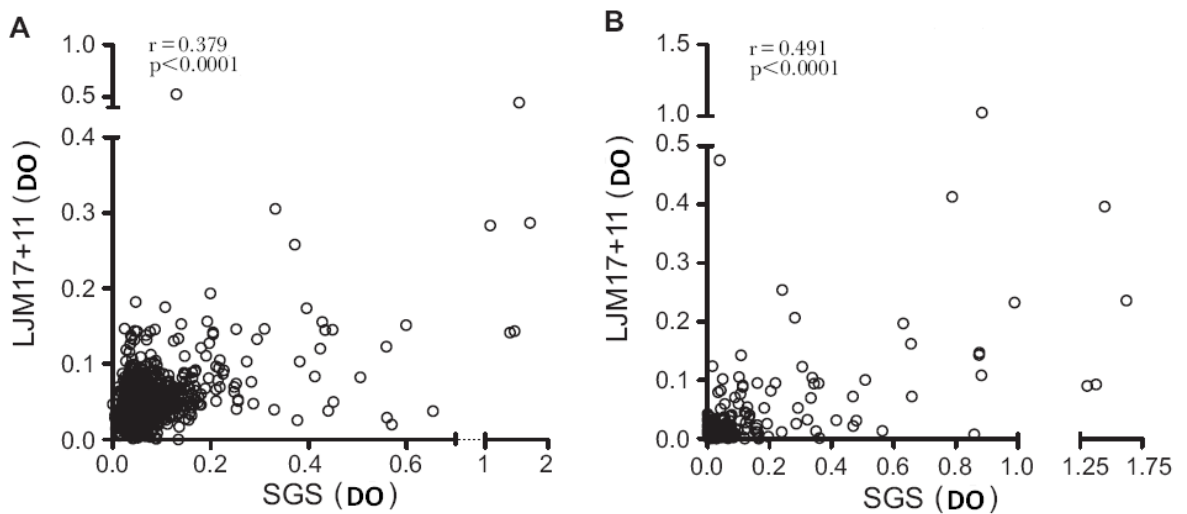


Figura 7. Correlação entre a produção de anticorpos contra saliva total e rLJM11+rLJM17. A, Níveis de anticorpos (DO) foram correlacionados dentre os 1.077 indivíduos de uma área endêmica de LV. B, A mesma correlação foi realizada no subgrupo de 200 indivíduos dos 1.077, que soroconverteram para anti-SGS durante o estudo. Os dados foram analisados usando o teste de Spearman. Os valores de r e p estão plotados em cada gráfico.

O desempenho global da sorologia utilizando as proteínas recombinantes combinadas foi satisfatório, com sensibilidade de 77% (IC 95%: 70,5-82,6), especificidade de 88% (IC 95%: 85,7-90,1), valor preditivo positivo de 60% (IC 95%: 53,2-65,5) valor preditivo negativo de 94,4% (IC 95%: 92,6-95,9) e razão de probabilidade de 6,43 (Fig. 8). Os resultados sorológicos com SGS positivo foram então estratificados de acordo com os valores de DO, a fim de verificar se a eficiência da sorologia sofre alguma variação nos indivíduos com altos títulos de anticorpos contra a SGS (Fig. 8A). Resultados concordantes e discordantes da sorologia combinada de LJM17+LJM11 foram calculados para cada quartil (Figura 6B). O ensaio usando antígenos salivares combinados apresentou uma tendência geral, com maior eficácia em prever indivíduos com altos títulos de anticorpos anti-SGS (Fig. 8B). Assim, o uso de proteínas recombinantes salivares foi eficaz na estimativa da exposição ao *L. longipalpis* (Fig. 8C).

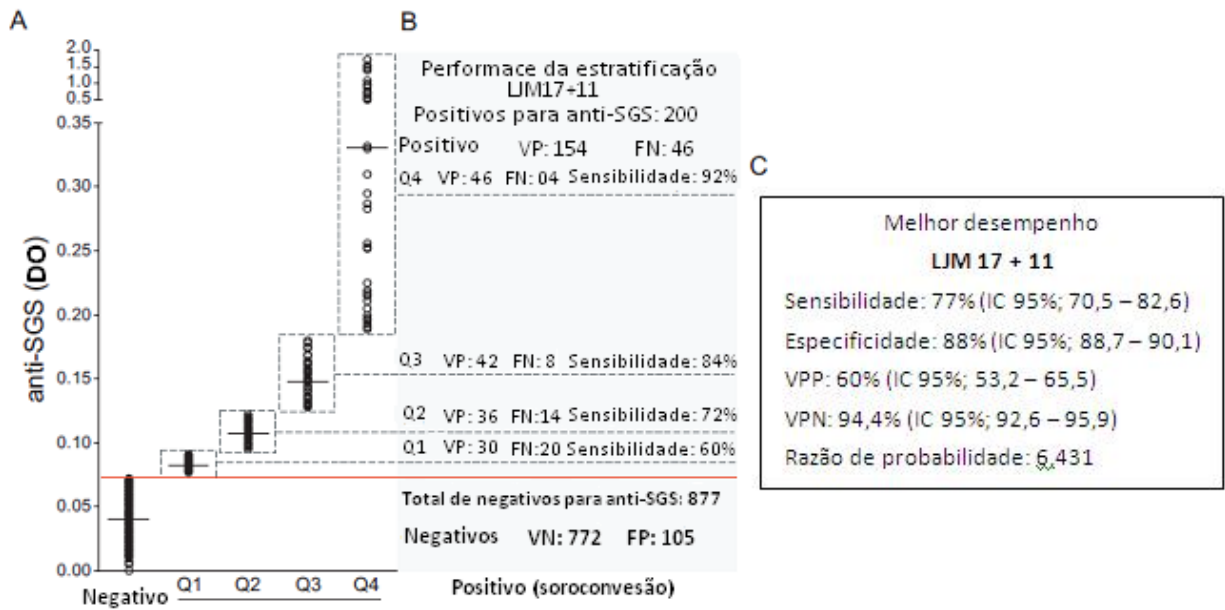


Figura 8. Validação da combinação da rLJM17 e rLM11 para a estimativa da exposição humana a saliva de *L. longipalpis*. Um total de 1.077 indivíduos da área endêmica para Leishmaniose Visceral foram testados para anti-SGS e para as proteínas recombinantes combinadas (rLJM17+rLJM11). A, títulos anti-SGS (DO). De acordo com os níveis de anticorpos as amostras positivas foram agrupadas em quartis (Q). B e C, estimativa da performance geral das sorologias utilizando as proteínas recombinantes em prever a positividade para a resposta anti-SGS, e também a sensibilidade de acordo com a análise das amostras positivas por quartis. VP, verdadeiro positivo; FP, falso positivo; VN, verdadeiro negativo; FN, falso negativo; VPP, valor preditivo positivo; VPN, valor preditivo negativo. IC, intervalo de confiança.

5 Metodologia empregada para a execução do objetivo específico II

5.1 Desenho do Estudo

Este estudo foi dividido em duas fases (**Fig. 9**). Um grande painel de soros com diagnóstico parasitológico confirmado para leishmaniose foi selecionado aleatoriamente a partir do banco de soros pré-existentes de levantamentos epidemiológicos independentes, previamente realizados através de pacientes ambulatoriais de áreas endêmicas de leishmaniose (para LC e para LM).

Inicialmente, objetivando comparar a eficácia dos antígenos recombinantes de *Leishmania* para o sorodiagnóstico da LT, amostras de soro de LC (n=49) e de LM (n=53) foram selecionadas e utilizadas através da técnica de ELISA. O ponto de corte (*cut-off*) do ELISA anti-proteínas de *Leishmania* foi estabelecido a partir da média mais três desvios-padrão da densidade ótica (DO) das amostras de soro de indivíduos saudáveis de uma área endêmica (n=39) e não endêmicas (n=49). As amostras de soro com DO acima deste *cut-off* foram considerados positivas para os antígenos. O objetivo principal desta etapa foi averiguar a sensibilidade destas proteínas e definir os valores de *cut-off* verificando a concordância das respostas anti-SLA e anti-proteínas recombinantes.

Na segunda parte do estudo, buscou-se verificar a especificidade das proteínas recombinantes, averiguando se as mesmas eram úteis para discriminar indivíduos doentes de indivíduos sadios. Para isso, foram construídas curvas ROC (*Receiver Operator Characteristic*) para cada proteína isoladamente, onde se determinou novos valores de *cut-off's* combinando maiores níveis de sensibilidade e especificidade, a partir do maior índice de probabilidade de discriminação estabelecido pela curva. Para avaliar a especificidade das proteínas recombinantes, utilizamos também amostras de soros de indivíduos com outras patologias (doença de Chagas (n=30), lúpus eritematoso sistêmico (n=10), hanseníase (n=30) e tuberculose (n=22) obtidas de inquéritos epidemiológico realizados previamente pelo grupo. Além disso, curvas ROC foram novamente construídas para as proteínas mais promissoras, utilizando agora como controles soros de indivíduos com diagnóstico parasitológico negativos para leishmaniose, porém, doente para outras patologias, a fim de selecionar as proteínas que apresentam menor reatividade cruzada. A performance dos antígenos parasitários foi

estabelecida a partir dos parâmetros obtidos através das curvas ROC como área sob a curva (AUC), valor de probabilidade (p) e razão de probabilidade.

FASES DO ESTUDO



Figura 9. Fluxograma do estudo utilizando as proteínas recombinantes da *Leishmania infantum*. O estudo foi dividido em duas fases. Em ambas as fases as amostras foram obtidas de pacientes com LM (n=53) e LC (n=49) (caixa tracejada). Na 1ª etapa foi avaliada a sensibilidade das proteínas recombinantes. Na 2ª fase foi avaliada a especificidade das proteínas recombinantes, para isso também foram utilizadas amostras de soros de indivíduos com doença de Chagas (n=30) lúpus (n=10), hanseníase (n=30) e tuberculose (n=22).

5.2 Obtenção das amostras de soros:

Todos os soros utilizados no estudo foram anteriormente obtidos durante a execução de outros projetos em nosso laboratório (BOAVENTURA *et al.* 2010, OLIVEIRA *et al.* 2011). Todos os pacientes tiveram diagnóstico confirmado em pelo menos dois dos seguintes testes: teste cutâneo de Montenegro, histopatologia da lesão, sorologia anti-*Leishmania* ou resposta ao tratamento. Os soros dos pacientes com leishmaniose (LC e LM) foram selecionados aleatoriamente, independente do resultado sorológico anti-*Leishmania*. Foram utilizados 49 amostras de soro de pacientes com LC – provenientes de áreas endêmicas do estado da Bahia e de Cuiabá, e 53 soros de pacientes com LM provenientes de áreas endêmicas do estado da Bahia. Além disso, foram selecionados soros de indivíduos controles de área endêmica e não endêmica provenientes de Florestal e Salvador respectivamente. As características epidemiológicas dos indivíduos envolvidos no estudo estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Características epidemiológicas dos indivíduos incluídos no estudo.

| GRUPO | IDADE [media (extremos)] | MASCULINO [n (%)] | FEMININO [n (%)] |
|-----------------------------|-----------------------------|----------------------|---------------------|
| Leishmaniose cutânea | 29,6 (8-72) | 30 (61,2) | 19 (38,8) |
| Leishmaniose mucosa | 37,8 (12-75) | 35 (66) | 18 (34) |
| Controles endêmicos | 35,5 (15-65) | 20 (51) | 19 (49) |
| Controles não endêmicos | 33,6 (20-58) | 28 (57) | 21 (43) |
| Doença de Chagas | 39,9 (22-56) | 16 (53,3) | 14 (46,7) |
| Lúpus Eritematoso Sistêmico | 34,5 (22-66) | 0 | 10 (100) |
| Hanseníase | 37,7 (15-75) | 13 (43,4) | 17(15-75) |
| Tuberculose | 39,5 (18-85) | 14 (63,6) | 8 (36,4) |

5.3 Obtenção dos antígenos recombinantes parasitário para os estudos sorológicos:

Uma coleção de diferentes proteínas recombinantes da *Leishmania* (rH2A, rH2B, rH3, rH4, rKMP11, rHSP70) cedidos gentilmente pelo Dr. Manuel Soto (Universidad Autonoma de Madrid) foi empregada neste estudo. Todas elas foram baseados em antígenos de *L. infantum* anteriormente descrito, sendo clonados, expressos e purificados como descrito por IBORRA *et al.* (2004) para histonas recombinantes e FUERTES *et al.* (2001) para rKMP11. A rHSP70 de *L. infantum* foi expressa no plasmídeo de expressão em procarioto pQE30. As inserções de DNA contendo a região codificadora foram obtidas por amplificação por PCR utilizando os seguintes oligonucleótidos: *forward* 5'-GCGGATCCATGACATTCGAAGGCGCCAT-3' e *5'-reverse* GGAAGCTTTTAGTCGACCTCCTCGACCTTGG - 3' e para controle das reações foi utilizado DNA extraído da *L. infantum* (Paciente MCAN / ES / 96/BCN150). A proteína foi expressa e purificada como as quatro histonas nucleosomais conforme descrito por IBORRA, *et al.* (2004).

5.4 Obtenção do antígeno bruto parasitário para os estudos sorológicos:

Para obtenção do antígeno solúvel parasitário, a cepa de *L. infantum-chagasi* (MCAN/BR/00/BA262) foi mantida em meio de cultura Schneider (Sigma) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, 100 U/ml de penicilina e 100 ug/ml de estreptomicina (Gibco). Para a aquisição do antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) os parasitos foram inicialmente submetidos a 10 ciclos alternados de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e banho-Maria e posteriormente centrifugados (1600xg, 4°C, 15'). O sobrenadante contendo o SLA foi coletado e quantificado através do Micro BCA TM Protein assay Reagent Kit (Pearce).

5.5 ELISA para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*:

As sorologias anti-*Leishmania* foram realizadas através do ELISA conforme descrito por BARRAL *et al.* (2000), com algumas adaptações. Para isso, placas de 96 poços foram

sensibilizadas com SLA (10 ug/mL) ou proteínas recombinantes de *Leishmania* (1 ug/ml) em tampão carbonato (NaHCO_3 0,45M, Na_2CO_3 0,02 M, pH 9,6) durante a noite a 4°C. Depois de três lavagens com PBS-Tween 0,5%, as placas foram bloqueadas por 1 hora em 37°C com PBS Tween 0,5%, mais 5% de leite desnatado. Os soros foram diluídas 1:100 com PBS-Tween 0,5% mais 5% de leite desnatado e incubadas por 2 horas em temperatura ambiente sob agitação. Após uma última série de lavagem, os poços foram incubados com anti-IgG humano conjugado a fosfatase alcalina (Sigma, Sr. Louis, MO), na diluição 1:2500 com PBS-Tween 0,5% mais 5% de leite desnatado e incubadas por 1 horas em temperatura ambiente sob agitação. Novamente as placas foram lavadas, e colocadas para revelar por 30 minutos com uma solução cromogênica de p-nitrofenilfosfato em tampão carbonato de sódio pH 9.6 com 1mg/mL de MgCl_2 . A reação foi interrompida com NaOH 3M, e a leitura da placa foi realizada a 405 nm. As concentrações do antígeno bruto ou proteínas recombinantes utilizadas foram determinadas em um experimento de dose-resposta para avaliar um sinal ótimo sem perder a especificidade (dados não mostrados). Em todos os experimentos, os valores obtidos foram subtraídos dos obtidos no *background*. Os experimentos sorológicos foram repetidos duas vezes obtendo-se resultados semelhantes. Os ensaios com as proteínas recombinantes foram realizados às cegas em relação aos resultados do ELISA anti-SLA.

4.2.6 Análise estatística:

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad software Prisma 5.0 (GraphPad Prism Inc., San Diego, CA). As diferenças de valores dos níveis de anticorpos entre os grupos foram comparados através do teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn. As curvas ROC foram utilizadas para estabelecer os valores de *cut-off* com base na identificação dos valores de sorologia, que apresentaram uma maior sensibilidade e especificidade na predição de positividade anti-SLA.

6 Resultados do Objetivo Específico II

Primeiramente, a reatividade das proteínas recombinantes de *Leishmania infantum-chagasi* foi analisada contra um painel de soros de pacientes LC e LM. As amostras de soro de indivíduos saudáveis de área endêmica e não endêmica foram utilizados a fim de estabelecer o ponto de corte para determinar a concordância das respostas sorológicas ao diagnóstico clínico. Uma maior reatividade foi observada no soro de pacientes com LM quando comparados com pacientes de LC, principalmente quando utilizados os antígenos SLA (**Fig. 10A**) e rHSP70 (**Fig. 10B**). No que diz respeito aos soros controles (área endêmica e não endêmica), um maior número de resultados falso positivos foi observado quando se utilizou o antígeno solúvel (**Fig. 10A**) quando comparados com as proteínas recombinantes (**Fig. 10B-G**), especialmente quando utilizada a proteína rH2A (**Fig. 10C**) que não apresentou resultados falso positivos. Em relação ao soros de pacientes com LT (LC e LM), o antígeno SLA reconheceu mais de 42 e 80% dos soros de pacientes LC e LM respectivamente (**Fig. 10A**). Para as proteínas recombinantes, uma melhor eficiência no reconhecimento foi obtida quando se utilizou a rHSP70, com reconhecimento de 46% e 58% dos soros de pacientes de LC e LM respectivamente (**Fig. 10B**). Entre as proteínas recombinantes derivadas de histonas, o melhor reconhecimento foi observado para a rH2A, com 20,4 e 34,5% de positividade para os soros de pacientes de LC e LM respectivamente (**Fig. 10C**). As demais proteínas recombinantes derivadas de histonas foram pobremente reconhecidas (menos de 6% de positividade) pelos soros de pacientes com LC e LM (**Fig. 10D-F**). Apesar do rKMP11 ser reconhecido por uma significativa porcentagem (35%) dos soros de pacientes com LM, este antígeno apresentou um baixo reconhecimento (2%) por soros de pacientes com LC (**Fig. 10G**).

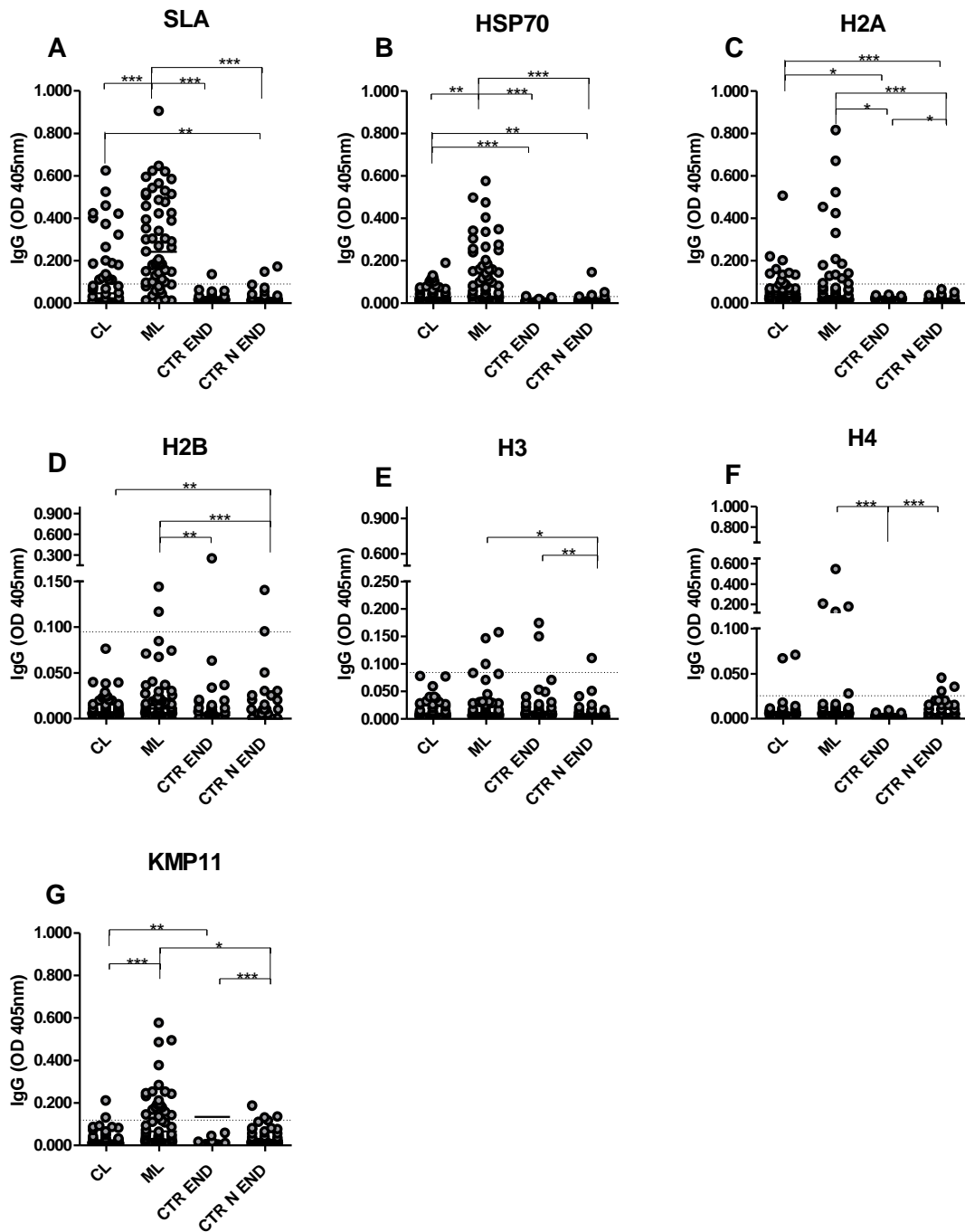


Figura 10. Reatividade dos antígenos parasitários. Níveis de anticorpos IgG anti- *Leishmania* em soros de pacientes de Leishmaniose Mucosa (LM [n=55]) e com Leishmaniose Cutânea (LC [n=52]), e indivíduos sadios de área endêmica (CTR END [n=39]) e não endêmica (CTR N END [n=49]) contra os antígenos SLA (A), rHSP70 (B), rH2A (C), rH2B (D), rH3 (E), rH4 (F) e rKMP11 (G). Os *cut-off* foram estabelecidos como a média mais três desvios-padrão da densidade ótica (DO) das amostras de soro de indivíduos de uma área endêmica e não-endêmica (linha pontilhada). As linhas contínuas representam a mediana dos grupos de soros. Cada ponto representa a média da duplicata dos valores do mesmo soro com desvio padrão menor que 20%. Os dados sobre os níveis de anticorpos para os diferentes grupos de soros foram comparados através do teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn para comparações múltiplas. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$.

Baseado nos resultados dos ELISAs, curvas ROC foram construídas para avaliar a capacidade do SLA e de cada antígeno recombinante do parasita em discriminar pacientes com LT de voluntários saudáveis (área endêmica e não endêmica). As comparações eram feitas considerando todos os pacientes com LT, bem como pacientes de LC e LM separadamente. Como mostrado na figura **11A**, para pacientes com LT (incluindo pacientes com LC e LM) os melhores desempenhos foram observados para o antígeno rHSP70 (ASC: 0,827; $p < 0,0001$; razão de probabilidade: 8,18) e rH2A (ASC: 0,789; $p < 0,0001$, razão de probabilidade: 2,31), seguido pelo SLA (ASC: 0,787; $p < 0,0001$; razão de probabilidade: 7,88) (**Fig. 11A**). As demais proteínas recombinantes (rH2B, rH3, rH4 e rKMP11) apresentaram valores mais baixos de ASC e razão de probabilidade. Quando soros de LM foram avaliados separadamente, o SLA apresentou o melhor desempenho (ASC: 0,927; $p < 0,0001$; razão de probabilidade: 5,85 - **Fig. 11B**). Para estes mesmos soros, a rHSP70 apresentou a melhor performance entre as proteínas recombinantes, com os valores dos parâmetros semelhantes aos encontrados para o antígeno bruto (AUS: 0,894; $p < 0,0001$; razão de probabilidade: 4,57 - **Fig. 11B**). Para os soros de pacientes com LC, os melhores parâmetros obtidos foram os das proteínas recombinantes rH2A (ASC: 0,808; $p < 0,0001$; razão de probabilidade: 2,52 - **Fig. 11C**), seguido da rHSP70 (ASC: 0,760; $p < 0,0001$; razão de probabilidade: 2,70 - **Fig. 11C**) e rH2B (ASC: 0,676; $p = 0,0004$; razão de probabilidade: 2,01 - **Fig. 11C**), desempenho estes superiores ao observado para o antígeno bruto (ASC: 0,630; $p = 0,0129$; razão de probabilidade: 1,57 - **Fig. 11C**).

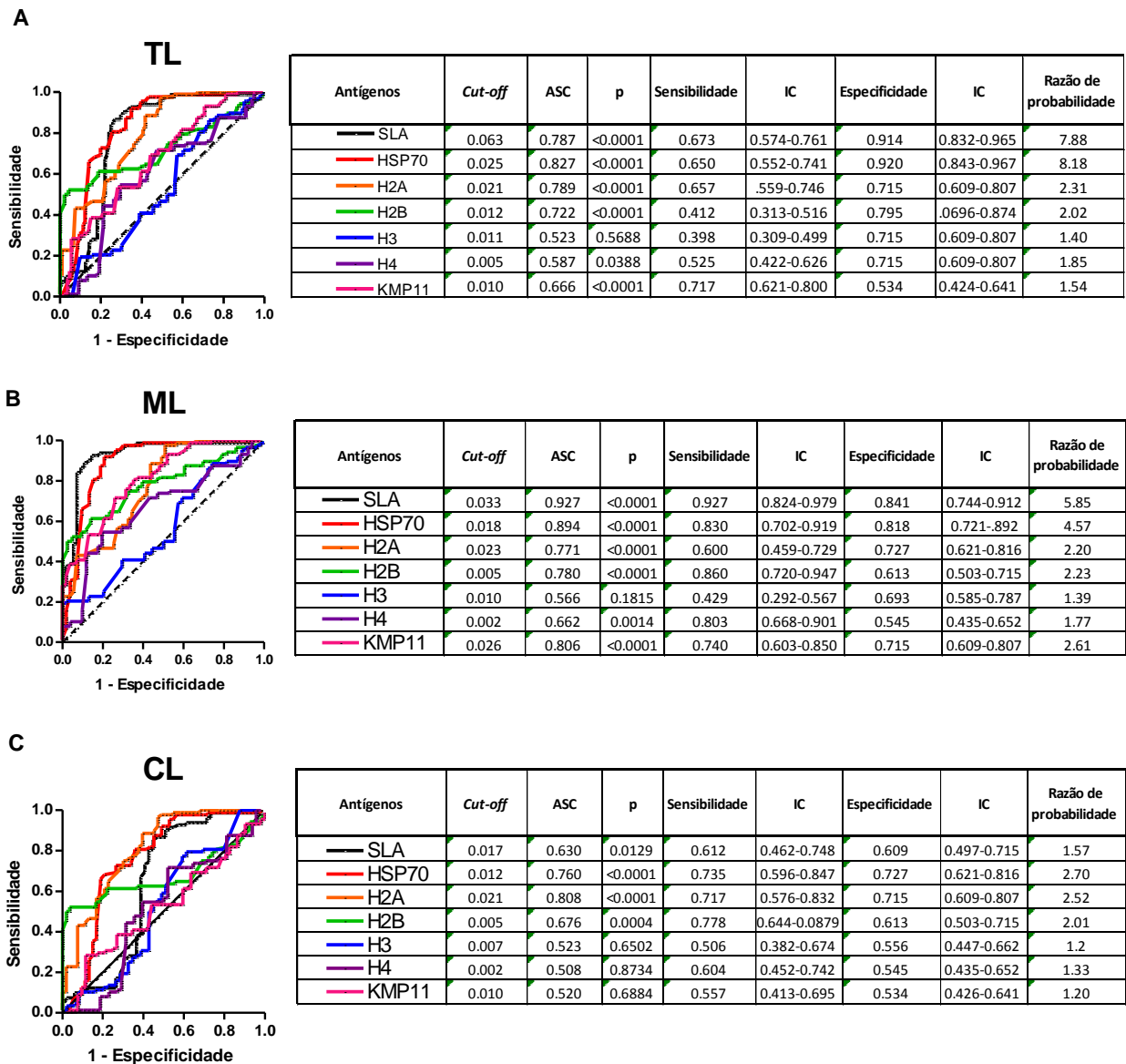


Figura 11. Curvas ROC dos níveis de anticorpos limiars para detecção de pacientes com Leishmaniose. Curvas ROC foram construídas através da comparação dos níveis séricos de IgG dos pacientes de LT (A) ou estratificados entre as formas clínicas LC (n=49) (B) e LM (n = 53) (C). Para o grupo controle foram utilizados os resultados das sorologias dos indivíduos saudáveis de área endêmica (39) e não endêmica (49). As sorologias foram realizadas contra o antígeno bruto (SLA) ou as proteínas recombinantes de Leishmania rHSP70, H2A, H2B, H3, H4 e KMP11. As linhas sólidas representam a área sob a curva (ASC) e as linhas pontilhadas representam a linha de identidade das curvas. As tabelas apresentam as informações detalhadas obtidas de cada curva ROC (*cut-off*, área sob a curva, o valor de p, sensibilidade, especificidade, intervalo de confiança de 95%, e o razão de probabilidade).

A fim de confirmar a eficácia dos antígenos recombinantes como possíveis marcadores para o imunodiagnóstico, avaliou-se a especificidade de cada um dos antígenos, por meio de um teste de reatividade cruzada com soros de pacientes com outras patologias. Deste modo, amostras de soro de pacientes com doença de Chagas, hanseníase, tuberculose e lúpus eritematoso sistêmico (LES) foram testados contra os diversos antígenos parasitários (SLA e proteínas recombinantes). O SLA apresentou alta reação cruzada contra soros de pacientes chagásicos (63%), entretanto, este mesmo antígeno apresentou baixa reatividade contra soros de pacientes com LES (20%) e tuberculose (4,5%), não apresentando reconhecimento cruzado contra os soros de pacientes com hanseníase (**Fig. 12A**). Para a proteína rHSP70, a maior reatividade cruzada foi observada para os soros de pacientes com LES (20%) e chagas (10%). Para os demais grupos de pacientes, a rHSP70 apresentou um baixo reconhecimento, sendo observado apenas 3,3% de positividade para soros de pacientes com tuberculose, e não havendo reação cruzada para os soros de pacientes com hanseníase (**Fig. 12B**). Todas as proteínas derivadas de histonas foram altamente reconhecidas por soros de pacientes com LES, especialmente a rH2A que apresentou reação cruzada em 100% dos soros testados (**Fig. 12C-F**). Por outro lado, a rH2A não foi reconhecida nos soros de pacientes com hanseníase, enquanto as demais rH2B (23,3% - **Fig. 12D**), rH3 (3,3% - **Fig. 12E**) e rH4 (10% - **Fig. 12F**) apresentaram uma pequena taxa de reconhecimento cruzado para estes mesmos soros. Estas proteínas apresentaram também uma baixa reatividade para os soros de pacientes chagásicos: 13,3% para rH2B (**Fig. 12D**); 6,6% para rH2A (**Fig. 12C**) e 10% para rH4 (**Fig. 12F**). Nenhuma reatividade cruzada foi observada para a proteína rH3 frente aos soros de pacientes de Chagas (**Fig. 12E**). As histonas também apresentaram uma baixa reatividade (rH2A [13,6% - **Fig. 12C**], rH4 [9,5% - **Fig. 12F**] e rH2B [13% - **Fig. 12D**]) ou até mesmo ausência de reação cruzada para a rH3 (**Fig. 12E**) para os soros de pacientes de tuberculose. Para todos os antígenos testados, o rKMP11 apresentou a maior reatividade cruzada, chegando a 86,7%, 76,6%, 50% e 40% de reconhecimento quando utilizados os soros de pacientes chagásicos, com hanseníase, LES e tuberculose, respectivamente (**Fig. 12G**). Notavelmente, os antígenos rHSP70 e rH2A exibiram a melhor especificidade de todos os antígenos testados, apresentando menor reação-cruzada quando ensaiadas com os soros de pacientes que sofrem de outras patologias que não leishmaniose.

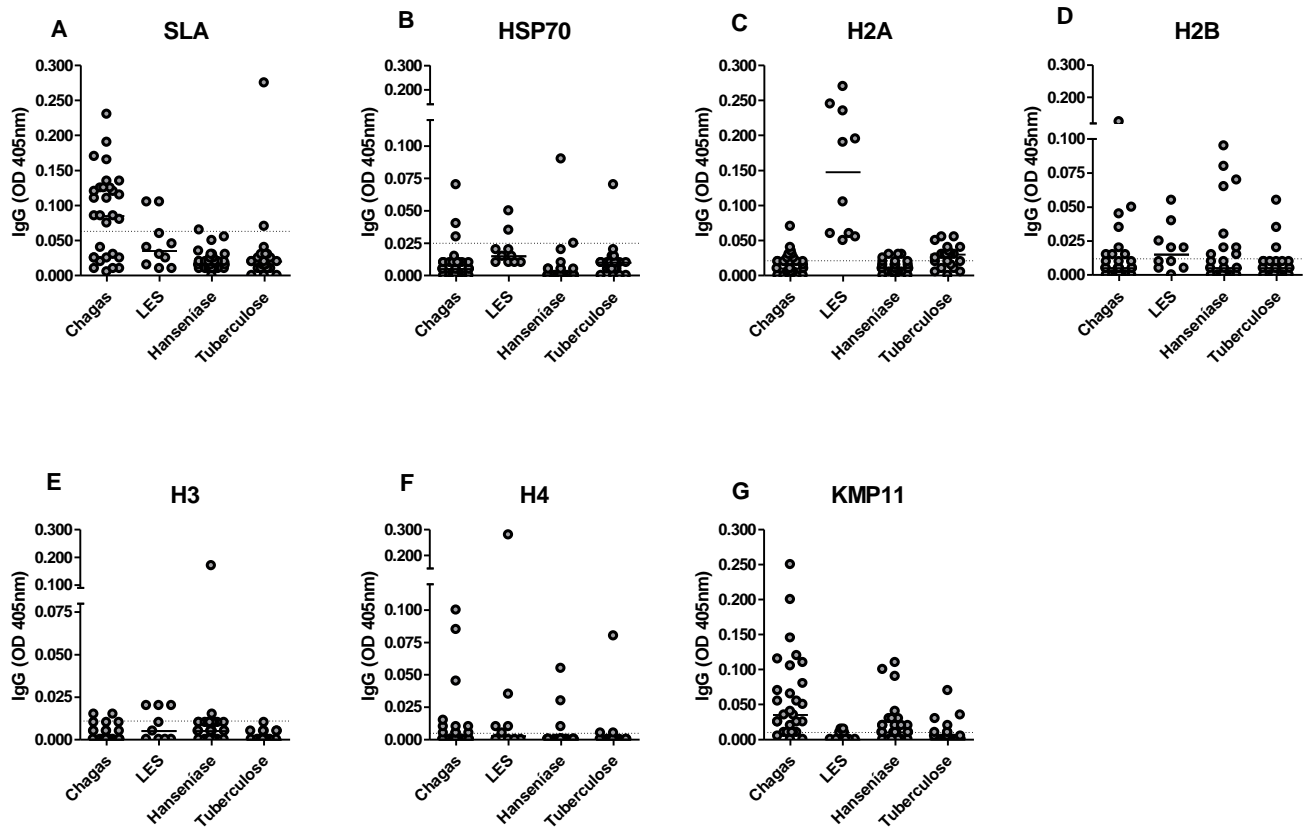


Figura 12. Avaliação da especificidade dos antígenos recombinantes. Soros de pacientes de doença de Chagas (n = 30), Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES [n = 10]), hanseníase (n = 30) e tuberculoses (n = 22) foram testados contra os antígenos SLA (A), rHSP70 (B), rH2A (C), rH2B (D), rH3 (E) rH4 (F) e rKMP11 (G). Os valores de *cut-off* foram estabelecidos a partir da curvas ROC dos pacientes de LT (Fig. 11) (linha pontilhada). As linhas sólidas representam os valores da mediana do grupo de soros. Cada ponto representa a media dos valores da duplicata do mesmo soro testado com desvio padrão menor que 20%.

Baseados nos resultados anteriores, o SLA (padrão ouro) e rHSP70 e rH2A (antígenos que apresentavam a melhor sensibilidade e especificidade) foram selecionados com o objetivo de avaliar através das curvas ROC o desempenho destes antígenos parasitários em discriminar pacientes com leishmaniose de indivíduos com outras patologias. Curvas ROC construídas comparando pacientes com LT e outras patologias mostraram melhores valores de parâmetros quando utilizada a rHSP70 (ASC: 0,869; $p < 0,0001$; razão de probabilidade: 7,81) seguido do SLA (ASC: 0,722; $p < 0,0001$; razão de probabilidade: 2,42) e da rH2A (ASC: 0,723; $p < 0,0001$; razão de probabilidade: 1,91) (**Fig. 13A**). Para os soros de pacientes com LM, os melhores parâmetros foram obtidos para a rHSP70 (ASC: 0,922; $p < 0,0001$; razão de probabilidade: 10,42) seguido do SLA (ASC: 0,887; $p < 0,0001$; razão de probabilidade: 3,28) (**Fig. 13B**). Também para soros de pacientes de LC, os maiores parâmetros foram obtidos utilizando a rHSP70 (ASC: 0,817; $p < 0,0001$; razão de probabilidade: 4,92) seguido do rH2A (ASC: 0,734; $p < 0,0001$; razão de probabilidade: 2,12) (**Fig. 13C**). Entre as proteínas recombinantes testadas, a rHSP70 apresentou o melhor desempenho, como pode ser observado por os valores dos parâmetros obtidos a partir da análise da curva ROC, especialmente quanto à razão de probabilidade apresentado por este antígeno (**Fig.13A-C**).

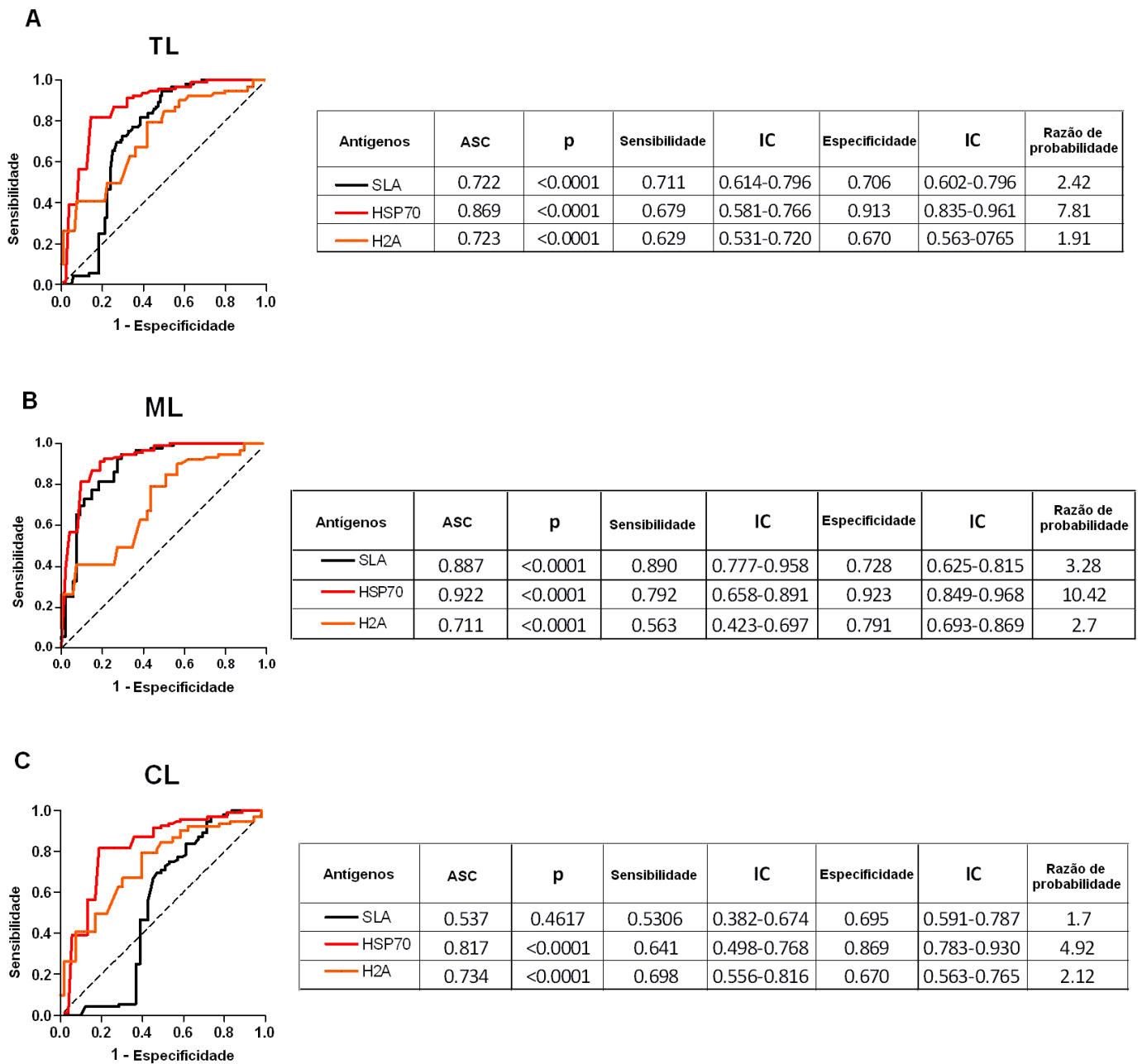


Figura 13. Curvas ROC dos níveis de anticorpos limiars para identificação de pacientes com Leishmaniose entre indivíduos portadores de outras patologias. Curvas ROC foram construídas através da comparação dos níveis séricos de IgG dos pacientes de LT (A) ou estratificados entre as formas clínicas LC (n=49) (B) e LM (n = 53) (C). Para o grupo controle foram utilizados os resultados das sorologias dos indivíduos portadores de outras patologias (doença de Chagas [30], tuberculose [22], hanseníase [30] e Lúpus [10]). As sorologias foram realizadas contra o antígeno bruto (SLA) ou as proteínas recombinantes de Leishmania rHSP70 e H2A. As linhas sólidas representam a área sob a curva (ASC) e as linhas pontilhadas representam a linha de identidade das curvas. As tabelas apresentam as informações detalhadas obtidas de cada curva ROC (área sob a curva, o valor de p, sensibilidade e especificidade com intervalo de confiança de 95%, e o razão de probabilidade).

7 DISCUSSÃO

Buscando alcançar a vigilância e controle da leishmaniose, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu entre as estratégias o controle das populações de flebotomíneos, contenção das epidemias nas fases iniciais e facilitação do diagnóstico precoce dos indivíduos parasitados. Devido à dificuldade na obtenção de uma vacina efetiva, a profilaxia das leishmanioses, bem como outras doenças transmitidas por insetos vetores, tem-se como mecanismo primário para proteção dos indivíduos a prevenção à picadas pelos vetores infectados. Isto pode ser conseguido por uma combinação de medidas de proteção individual e estratégias de controle vetoriais, com base no comportamento do vetor (FONTAINE, *et al.* 2011). Estes métodos têm sido bem sucedidos na redução e/ou eliminação da transmissão de algumas doenças transmitidas por vetores (GIDWANI *et al.* 2011). No entanto para determinar a eficácia das medidas anti vetoriais na redução da transmissão de doenças transmitidas por artrópodes, devem ser realizadas algumas avaliações, a exemplo da verificação da incidência e/ou mortalidade da doença e pesquisas entomológicas controlados na área (FONTAINE, *et al.* 2011).

A densidade vetorial dos flebotomíneos numa área endêmica é geralmente mensurada pela captura destes vetores nas proximidades das habitações humanas. No entanto, em termos de execução e supervisão, este método é muito laborioso e depende das habilidades do coletor, podendo variar de acordo com as condições climáticas (BARATA *et al.* 2004, XIMENES MDE *et al.* 2006). Além disso, observa-se variação na densidade vetorial dentro de pequenas áreas de captura (ELNAIEM *et al.* 1999), o que dificulta a extrapolação dos resultados para áreas maiores. Adicionalmente, essas ferramentas não diferenciam vetores de espécie antropofílica de zoofílica, não avaliando com precisão o contato destes artrópodes hematófagos e o homem.

Uma alternativa para o monitoramento das áreas endêmicas é a utilização de anticorpos contra os componentes da glândula salivar dos insetos hematófagos (SCHWARZ *et al.* 2010, SOUZA *et al.* 2010). Estes anticorpos específicos podem ser utilizados como marcadores epidemiológicos de exposição ao vetor, como demonstrado para diversas doenças, dentre elas as leishmanioses (SOUZA, *et al.* 2010, TEIXEIRA, *et al.* 2010), doença de Lyme (SANDERS, *et al.* 1999, SCHWARTZ *et al.* 1990), doença de Chagas (SCHWARZ *et al.* 2011, SCHWARZ, *et al.* 2010), doença do sono (POINSIGNON *et al.* 2008) e Malária (ORLANDI-PRADINES *et al.* 2007, REMOUE *et al.* 2006). A realização de estudos epidemiológicos de grande porte, utilizando antígenos de glândulas salivares, são limitados

pela dificuldade na obtenção de grandes quantidades destes antígenos. Neste estudo relatamos a detecção de soros reativos ao SGS através da utilização de duas proteínas recombinantes da saliva de *L. longipalpis*, rLJM17 e rLJM11, ambas descritas como proteínas da família da Yellow, família bastante conservada entre os insetos hematófagos. Além disso, quando as mesmas foram utilizadas combinadas, rLJM17 + rLJM11 apresentaram correlação positiva entre os resultados obtidos quando utilizou-se o SGS como antígeno.

Além da possibilidade de serem produzidas em grandes quantidades, as proteínas recombinantes salivares trazem outra vantagem para os testes sorológicos, uma vez que os mesmos podem ser produzidos em grande escala e sua utilização em ensaios laboratoriais controlados apresentando resultados mais reproduzíveis. Sabe-se que o perfil das proteínas da saliva dos flebotomíneos, bem como a concentração destas proteínas, varia a depender da idade do inseto, bem como o estágio alimentar do inseto. PRATES *et al.* (2008) verificaram que o conteúdo proteico da glândula salivar das fêmeas em jejum aumenta significativamente com a idade, além disso, foi observado que o conteúdo proteico diminui acentuadamente após a alimentação sanguínea, com um aumento gradual de concentração nos dias subsequentes ao repasto. Esta variação é um entrave para a utilização destas proteínas obtidas do SGS, uma vez que as mesmas não podem ser totalmente controladas, mesmo quando utilizados insetos colonizados em condições padronizadas.

Apesar das proteínas recombinantes, quando utilizadas de forma isolada, serem capazes de identificar a soroconversão das amostras em relação ao SGS em um número variável de amostras, a combinação das mesmas levou a um consideravelmente aumento da detecção de anticorpos anti SGS. O uso combinado das proteínas recombinantes se justifica uma vez que nem todos os soros reativos para o SGS reconhecem as mesmas bandas de proteínas. Um trabalho conduzido por GOMES *et al.* (2002), verificou que a frequência de reconhecimento de antígenos salivares do *L. longipalpis* difere em soros de crianças de uma área endêmica de LV, dentre as proteínas avaliadas, a mais reconhecidas foi a de 45 kDa (85% dos soros), seguido da de 44, 43 e 35 kDa (57% dos soros cada). No presente estudo, algumas amostras de soro reconheceram apenas uma das duas proteínas recombinantes, ambas testados por ELISA, sendo este reconhecimento confirmado através do reconhecimento de bandas pela técnica de Western blot (dados não mostrados). Tal reconhecimento diferencial pode explicar o melhor desempenho do teste quando se utilizou os antígenos rLJM17 e rLJM11 combinados.

Um critério importante para a escolha de antígenos recombinantes selecionados para utilização em sorologia é a especificidade destas moléculas. Biomarcadores de exposição aos

flebotomíneos não devem reagir de forma cruzada com proteínas salivares de outros vetores de espécies não flebotomínicas, o que poderia levar a resultados falso positivos. A fim de testar a especificidade, avaliamos a especificidade da rLJM-17 e rLJM-11 contra soros de uma área endêmica onde *L. longipalpis* é altamente predominante e uma outra esta espécie não é encontrada. Uma grande pesquisa entomológica em toda a Ilha de São Luís do Maranhão, incluindo os três municípios que compõem as áreas 1 e 3 do presente trabalho, após captura de 22.581 espécimes de flebotomíneos, a espécie *L. longipalpis* correspondia a 66,4% do total destes insetos capturados, seguido por *L. whitmani* (24%) e *L. evandroi* (5,9%), com os 3,7% restantes sendo representados por outras 29 diferentes espécies (REBELO *et al.* 1999). Por outro lado, no povoado de Canoas (área 2 deste estudo) a pesquisa entomológica realizadas durante a coleta dos soros evidenciou uma nítida predominância da espécie *L. intermedia*, representando 94% dos espécimes capturados, com um pequeno número de *Lutzomyia migonei* e outras espécies de *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *sp.* (FOLLADOR *et al.* 1999). A análise comparativa da sequência das proteínas LJM17 de *L. longipalpis* e da homóloga LJM-17 do *L. intermedia* mostrou algumas áreas de alta conservação de aminoácidos (resultados não publicados). No entanto, a reatividade cruzada com o SGS do *L. longipalpis* não foi observada em animais experimentalmente expostos ao SGS do *L. intermedia* (DE MOURA, *et al.* 2007). Provavelmente, a conformação terciária da proteína LJM17 do *L. longipalpis* é distinta da LJM-17 do *L. intermedia*, o que explica a especificidade observada no ensaio. ROHOUSOVA *et al.* (2005) demonstram que os constituintes proteicos da saliva de flebotomíneos podem variar entre as diferentes espécies, sugerindo a existência de diferentes componentes salivares imunogênicos. De fato, neste mesmo trabalho foi demonstrado que diferentes hospedeiros (camundongo e homem) expostos a picadas de flebotomíneos produzem anticorpos que reconhecem antígenos espécie-específicos da saliva *Phlebotomus sergenti* e *Phlebotomus papatasi*, sugerindo que a especificidade antigênica esteja ligada a distância filogenética entre os táxons de insetos (ROHOUSOVA, *et al.* 2005)

Concernente à facilitação do diagnóstico precoce das leishmanioses, o diagnóstico da leishmaniose tegumentar é bastante dificultado, devido às suas manifestações clínicas, bem como as áreas endêmicas serem as mesmas apresentadas em outras patologias, tais como infecção fúngica e micobacteriana. Metodologias de diagnóstico parasitológico tem uma sensibilidade muito limitada, devido à distribuição dos parasitas não se apresentar homogênea nas lesões (PINERO, *et al.* 1999). Somado a isso, a preparação de amostras para o diagnóstico

parasitológico, sejam elas obtidas de biopsia ou aspirado, consomem tempo, e são dependentes de equipamentos e técnicos de laboratório qualificados (WEIGLE, *et al.* 1987).

Nas últimas décadas, um número crescente de proteínas recombinantes tem sido descritas como candidatas para substituição do antígeno solúvel de *Leishmania* para o sorodiagnóstico das leishmanioses (DE SOUZA *et al.* 2012, DE SOUZA DIAS, *et al.* 2005, RAFATI, *et al.* 2006, SOTO, M., *et al.* 1996, SOTO, M. *et al.* 1998). No presente estudo, decidimos testar a viabilidade do uso de antígenos recombinantes derivados de *L. infantum-chagasi* para o diagnóstico sorológico da LT. Apesar destas proteínas serem derivadas de outra espécie de *Leishmania* que não a *L. braziliensis*, é sabido, que estas proteínas pertencem a famílias bastante conservadas entre as diferentes espécies de *Leishmania* (DE OLIVEIRA *et al.* 2009), o que não inviabiliza a sua utilização para o sorodiagnóstico da LT. Neste estudo, ELISAs foram realizados a fim de avaliar a reatividade de soros de pacientes com leishmaniose tegumentar a seis proteínas recombinantes da *Leishmania infantum-chagasi* e ao SLA sob as mesmas condições experimentais. Vários desses antígenos foram previamente descritos como bons antígenos para o sorodiagnóstico da LV, entretanto, até agora, poucos estudos avaliaram a reatividade destes utilizando um grande painel de soros de pacientes com LT.

Neste estudo, todas as seis proteínas recombinantes foram reconhecidas pelos soros de pacientes com LT com diferentes títulos de anticorpos (diferentes DO). Referente aos diferentes espectros clínicos da LT, os pacientes LC tinham títulos de anticorpos anti-*Leishmania* significativamente mais baixos quando comparados com a reatividade apresentada pelos soros dos pacientes com LM. A maior reatividade observada para os soros dos pacientes de LM pode ser explicado pelo prolongado curso da doença, que leva a maior intensidade da resposta de anticorpos encontrada nesta forma clínica de leishmaniose tegumentar (CARVALHO *et al.* 1995, SARAIVA, *et al.* 1989).

Entre os seis antígenos recombinantes testados, a proteína de choque térmico (rHsp70) apresentou o melhor desempenho entre as demais proteínas. Esta proteína recombinante foi reconhecida em mais de 50% dos soros de pacientes de LT. Ademais, esta mesma proteína apresentou a mais baixa reatividade cruzada entre os antígenos estudados, quando os soros de indivíduos saudáveis e soros de pacientes com doença autoimune e associadas a outros patógenos foram utilizados. Além disso, para soros de pacientes com LC, esta proteína apresentou o melhor desempenho com reconhecimento de um maior número de soros quando comparado com o observado para o antígeno solúvel (SLA). A natureza antigênica das

proteínas de choque térmico para soros de pacientes com leishmaniose, em especial a proteína HSP70, não é surpreendente, uma vez que anticorpos contra esta proteína têm sido observado em soros de pacientes com diferentes doenças parasitárias (ARDESHIR *et al.* 1987, HEDSTROM *et al.* 1987, ZUGEL and KAUFMANN 1999). Do mesmo modo, outros autores descreveram que HSP70 é um antígeno bastante preeminente durante a leishmaniose (CARRILLO *et al.* 2008, CELESTE, *et al.* 2004, DE ANDRADE, *et al.* 1992, REY-LADINO, *et al.* 1997, SKEIKY, *et al.* 1997). Apesar do elevado grau de homologia, a HSP70 de *Leishmania* mostrou um 73% de identidade da sequência em relação a sua proteína ortóloga humana (REQUENA, *et al.* 2000). Já sendo demonstrado que os anticorpos anti HSP70 produzidos durante a infecção por *Leishmania* reconhecem especificamente a proteína HSP70 do parasita, sem reatividade cruzada com a HSP70 do hospedeiro (QUIJADA *et al.* 1996, SKEIKY, *et al.* 1995). Além da reatividade da proteína HSP70 de *Leishmania* contra sua homóloga HSP70 humana, a reatividade cruzada já foi estudada contra soros de pacientes infectados por *Trypanosoma cruzi*, uma vez que a HSP70 de ambas as espécies são altamente conservadas (85% de identidade de sequência). MacFARLANE *et al.* (1990) observaram a presença de anticorpos específicos contra a proteína rHSP70 isoladas da espécie *L. donovani* em mais de 50% dos soros de pacientes de LV testados, porém, anticorpos não foram detectados quando utilizaram soros de pacientes com LC e doença de Chagas. Por outro lado, anticorpos específicos contra as proteínas rHSP70 e rHSP83 de *L. braziliensis* foram encontrados em 95% dos soros de pacientes LM e LC por SKEIKY *et al.* (1995). Do mesmo modo, Zurita *et al.* (2003) mostraram um alto reconhecimento da proteína rHSP70 de *L. braziliensis* (84%) utilizando soros de pacientes com LC e LM, e um menor reconhecimento quando utilizou soros de pacientes Chagásicos (18,75%). Além disso, Quijada *et al.* (1998) demonstraram que 84,6% dos soros de pacientes com LM e 78,9% dos soros de pacientes com LV reconheceram a proteína rHSP70 da espécie *L. infantum*. Neste último estudo, uma elevada reação cruzada foi observada entre a proteína HSP70 de leishmania e soros de pacientes chagásicos, embora o reconhecimento tenha sido maior nos soros dos pacientes com leishmaniose. Sugerimos que neste trabalho, a sensibilidade do teste de ELISA possa explicar a reatividade cruzada encontrada entre soros de pacientes chagásicos e a proteína rHSP70. No nosso trabalho, o valor de *cut-off* aumentou a precisão do ensaio de ELISA, podendo explicar a menor reatividade cruzada observada. Nosso estudo reforça a antigenicidade da proteína HSP70 do parasita, indicado pela presença de anticorpos anti-HSP70 detectados em soros de pacientes tanto de LC quanto de LM. A menor sensibilidade demonstrada no nosso estudo para a proteína rHSP70, deve-se provavelmente a utilização de um maior número de soros

utilizados, principalmente, devido a seleção dos pacientes terem sido feitas de forma independentemente do resultado da sorologia anti SLA. Ademais, a análise da curva ROC demonstrou alto desempenho desta proteína para o sorodiagnóstico humano da LT.

Outras proteínas recombinantes de *Leishmania* imunogênicas utilizadas em nosso estudo foram as proteínas nucleossomais formadoras das histonas. As histonas têm sido extensivamente testadas contra soros de LV humana e canina, apresentando grande especificidade e sensibilidade, sendo sugeridas como antígenos úteis para o sorodiagnóstico destas doenças (MAALEJ, et al. 2003, MEDDEB-GARNAOUI, et al. 2010, SOTO, M. et al. 1995, SOTO, M. et al. 1996, SOTO, M. et al. 1999). No entanto, até agora, apenas dois estudos foram realizados para avaliar a resposta humoral induzida por estas proteínas em pacientes com LC e LM. MONTOYA et al. (1997) trabalhando com soros de pacientes LC, demonstraram que 58% dessas amostras de soros possuem anticorpos específicos que reagem com a proteína rH2B isolada da espécie *L. peruviana*. Igualmente, CARMELO et al. (2002), utilizando como antígeno a proteína recombinante H1 da espécie *L. braziliensis*, observou 66% de reatividade contra as amostras de soro de pacientes com LC. Além disso, estes autores evidenciaram que esta histona foi reconhecida por 40% dos soros de doentes de Chagas. No presente estudo, observamos que as proteínas recombinantes nucleossomais utilizadas são reconhecidas por uma pequena porcentagem dos soros dos pacientes com LC e LM, apresentando moderada reatividade cruzada contra os soros testados de pacientes com outras patologias que não as leishmanioses, exceto quando testadas contra soros de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico onde foi observado um alto reconhecimento. Entre as quatro histonas recombinantes da *L. infantum* testadas, a rH2A foi a que apresentou um melhor reconhecimento, reagindo com 34,5% e 20,4% dos soros de pacientes LM e LC, respectivamente.

Vários autores avaliaram a antigenicidade da proteína recombinante KMP11, especialmente contra soros de cães e pacientes com LV (CARRILLO, et al. 2008, DE CARVALHO, et al. 2003, INIESTA et al. 2008, PASSOS, S., et al. 2005). Neste estudo, a proteína rKMP11 da espécie *L. infantum* apresentou um baixo desempenho, uma vez que praticamente não foi reconhecida por soros de pacientes com LC. Além disso, este antígeno tem sido observado reconhecendo altos níveis de anticorpos em soros de pacientes com outras doenças que não a leishmaniose, especialmente quando analisado soros de pacientes com doença de Chagas (TRUJILLO, et al. 1999). Os nossos resultados são semelhantes a outros anteriormente descritos em que a rKMP11 foi reconhecida pela maioria dos soros dos pacientes de LV e LM, com baixa sensibilidade observada para os soros de pacientes de LC e

alto reconhecimento cruzado para soros de pacientes com doença de Chagas, o que limita o papel deste antígeno no diagnóstico da LT.

A reação cruzada observada no sorodiagnóstico entre antígenos de *Leishmania* e soros de pacientes com outras patologias é geralmente causada por determinantes antigênicos comuns à estes patógenos (NDAO, 2009). A reatividade cruzada leva a ocorrência de resultados falso-positivos, sendo estes considerados um problema, especialmente em regiões onde mais de um parasita é endêmico. Nossos dados demonstram que a proteína rHSP70 de *Leishmania infantum-chagasi* é uma promissora ferramenta para o diagnóstico sorológico da Leishmaniose Tegumentar Americana utilizando antígenos recombinantes. As proteínas rHSP70 e rH2A apresentaram sensibilidade semelhante ao SLA (mais elevado no caso de rHSP70), e além disso, apresentam maior especificidade. Numa tentativa de aumentar a sensibilidade obtida utilizando os antígenos recombinantes contra soros de pacientes com LC, comparamos o desempenho da combinação das proteínas rHSP70+rH2A. A análise sorológica e das curvas ROC utilizando as proteínas conjugadas apresentou um aumento insignificante em comparação com a utilização do antígeno rHSP70 isolado. Além disso, os valores dos parâmetros das curvas ROC diminuíram para os soros de pacientes LM (dados não mostrados). Por outro lado, os demais antígenos recombinantes (KMP-11, H2B, H3 e H4) não substituíram satisfatoriamente o SLA, devido a menor sensibilidade e/ou especificidade apresentada. Portanto, rHSP70 ou, possivelmente, as combinações com diferentes proteínas merecem ser melhor avaliadas em outras áreas endêmicas, especialmente em regiões onde outras doenças, como infecções fúngicas e por micobacterias se sobrepõem geograficamente, para certificação de seu papel como uma valiosa ferramenta de diagnóstico para o sorodiagnóstico da leishmaniose tegumentar.

8 CONCLUSÃO

- As proteínas recombinantes da saliva do *L. longipalpis* rLJM11+rLJM17 representam uma ferramenta promissora epidemiológica que pode auxiliar na implementação de medidas de controle contra a leishmaniose nas áreas endêmicas da Leishmaniose Visceral.
- A elevada antigenicidade da rHSP70 sugere a possibilidade da utilização desta proteína recombinante para o sorodiagnóstico da Leishmaniose Tegumentar.
- Neste trabalho foi possível validar o uso de proteínas recombinantes do parasito e da saliva dos flebotomíneos como importantes biomarcadores para o sorodiagnóstico e avaliação da exposição às leishmanioses.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, J. M., OLIVEIRA, F., KAMHAWI, S., MANS, B. J., REYNOSO, D., SEITZ, A. E., LAWYER, P., GARFIELD, M., PHAM, M. and VALENZUELA, J. G. Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis. *BMC Genomics* 7 (2006), 52.
- ANDRADE, B. B., DE OLIVEIRA, C. I., BRODSKYN, C. I., BARRAL, A. and BARRAL-NETTO, M. Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. *Scand J Immunol* 66, 2-3 (Aug-Sep 2007), 122-127.
- ARDESHIR, F., FLINT, J. E., RICHMAN, S. J. and REESE, R. T. A 75 kd merozoite surface protein of Plasmodium falciparum which is related to the 70 kd heat-shock proteins. *EMBO J* 6, 2 (Feb 1987), 493-499.
- AREVALO, J. *Diagnóstico Labortorial da Infecção por Leishmania sp.*, Salvador,(2011).
- AZAZY, A. A., NASHER, S. T., ISHAQ, A., BIN-MUHANNA, M. and CHANCE, M. L. Detection of antileishmanial IgG antibodies and Leishmania-specific antigens in sera from Yemeni patients with visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 97, 7 (Oct 2003), 689-695.
- BADARO, R., BENSON, D., EULALIO, M. C., FREIRE, M., CUNHA, S., NETTO, E. M., PEDRAL-SAMPAIO, D., MADUREIRA, C., BURNS, J. M., HOUGHTON, R. L., DAVID, J. R. and REED, S. G. rK39: a cloned antigen of Leishmania chagasi that predicts active visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 173, 3 (Mar 1996), 758-761.
- BARATA, R. A., SILVA, J. C., COSTA, R. T., FORTES-DIAS, C. L., PAULA, E. V., PRATA, A., MONTEIRO, E. M. and DIAS, E. S. Phlebotomine sand flies in Porteirinha, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99, 5 (Aug 2004), 481-487.
- BARRAL, A., HONDA, E., CALDAS, A., COSTA, J., VINHAS, V., ROWTON, E. D., VALENZUELA, J. G., CHARLAB, R., BARRAL-NETTO, M. and RIBEIRO, J. M. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? *Am J Trop Med Hyg* 62, 6 (Jun 2000), 740-745.
- BELKAID, Y., KAMHAWI, S., MODI, G., VALENZUELA, J., NOBEN-TRAUTH, N., ROWTON, E., RIBEIRO, J. and SACKS, D. L. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of Leishmania major infection in the mouse ear dermis. *J Exp Med* 188, 10 (Nov 16 1998), 1941-1953.

- BOAVENTURA, V. S., SANTOS, C. S., CARDOSO, C. R., DE ANDRADE, J., DOS SANTOS, W. L., CLARENCIO, J., SILVA, J. S., BORGES, V. M., BARRAL-NETTO, M., BRODSKYN, C. I. and BARRAL, A. Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *Eur J Immunol* 40, 10 (Oct 2010), 2830-2836.
- BOGGILD, A. K., MIRANDA-VERASTEGUI, C., ESPINOSA, D., AREVALO, J., ADAUI, V., TULLIANO, G., LLANOS-CUENTAS, A. and LOW, D. E. Evaluation of a microculture method for isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions of patients in Peru. *J Clin Microbiol* 45, 11 (Nov 2007), 3680-3684.
- BOGGILD, A. K., RAMOS, A. P., ESPINOSA, D., VALENCIA, B. M., VELAND, N., MIRANDA-VERASTEGUI, C., AREVALO, J., LOW, D. E. and LLANOS-CUENTAS, A. Clinical and demographic stratification of test performance: a pooled analysis of five laboratory diagnostic methods for American cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 83, 2 (Aug 2010), 345-350.
- BRAY, R. S. and LAINSON, R. The immunology and serology of leishmaniasis. I. The fluorescent antibody staining technique. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 59, 5 (Sep 1965), 535-544.
- BRAZ, R. F., NASCIMENTO, E. T., MARTINS, D. R., WILSON, M. E., PEARSON, R. D., REED, S. G. and JERONIMO, S. M. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. *Am J Trop Med Hyg* 67, 4 (Oct 2002), 344-348.
- BRITO, M. E., MENDONCA, M. G., GOMES, Y. M., JARDIM, M. L. and ABATH, F. G. Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95, 2 (Mar-Apr 2001), 203-206.
- BURNS, J. M., JR., SHREFFLER, W. G., BENSON, D. R., GHALIB, H. W., BADARO, R. and REED, S. G. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2 (Jan 15 1993), 775-779.
- CARMELO, E., MARTINEZ, E., GONZALEZ, A. C., PINERO, J. E., PATARROYO, M. E., DEL CASTILLO, A. and VALLADARES, B. Antigenicity of *Leishmania braziliensis* histone H1 during cutaneous leishmaniasis: localization of antigenic determinants. *Clin Diagn Lab Immunol* 9, 4 (Jul 2002), 808-811.
- CARRILLO, E., CRUSAT, M., NIETO, J., CHICHARRO, C., THOMAS MDEL, C., MARTINEZ, E., VALLADARES, B., CANAVATE, C., REQUENA, J. M., LOPEZ, M. C.,

ALVAR, J. and MORENO, J. Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 26, 15 (Mar 28 2008), 1902-1911.

CARVALHO, E. M., CORREIA FILHO, D., BACELLAR, O., ALMEIDA, R. P., LESSA, H. and ROCHA, H. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 53, 3 (Sep 1995), 273-277.

CARVALHO, F. A. A., CHAREST, H., TAVARES, C. A. P., MATLASHEWSKI, G., VALENTE, E. P., REBELLO, A., GAZZINELLI, R. T., FERNANDES, A. P. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in human and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 43 (2002) 289-295.

CELESTE, B. J., ANGEL, S. O., CASTRO, L. G., GIDLUND, M. and GOTO, H. *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 37, 11 (Nov 2004), 1591-1593.

COELHO, E. A., RAMIREZ, L., COSTA, M. A., COELHO, V. T., MARTINS, V. T., CHAVEZ-FUMAGALLI, M. A., OLIVEIRA, D. M., TAVARES, C. A., BONAY, P., NIETO, C. G., ABANADES, D. R., ALONSO, C. and SOTO, M. Specific serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis using *Leishmania* species ribosomal protein extracts. *Clin Vaccine Immunol* 16, 12 (Dec 2009), 1774-1780.

COSTA, D. J., FAVALI, C., CLARENCIO, J., AFONSO, L., CONCEICAO, V., MIRANDA, J. C., TITUS, R. G., VALENZUELA, J., BARRAL-NETTO, M., BARRAL, A. and BRODSKYN, C. I. *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. *Infect Immun* 72, 3 (Mar 2004), 1298-1305.

DE ANDRADE, C. R., KIRCHHOFF, L. V., DONELSON, J. E. and OTSU, K. Recombinant *Leishmania* Hsp90 and Hsp70 are recognized by sera from visceral leishmaniasis patients but not Chagas' disease patients. *J Clin Microbiol* 30, 2 (Feb 1992), 330-335.

DE CARVALHO, L. P., SOTO, M., JERONIMO, S., DONDJI, B., BACELLAR, O., LUZ, V., ORGE ORGE, G., ALONSO, C., JESUS, A. R. and CARVALHO, E. M. Characterization of the immune response to *Leishmania infantum* recombinant antigens. *Microbes Infect* 5, 1 (Jan 2003), 7-12.

DE MOURA, T. R., OLIVEIRA, F., NOVAIS, F. O., MIRANDA, J. C., CLARENCIO, J., FOLLADOR, I., CARVALHO, E. M., VALENZUELA, J. G., BARRAL-NETTO, M., BARRAL, A., BRODSKYN, C. and DE OLIVEIRA, C. I. Enhanced *Leishmania braziliensis* infection following pre-exposure to sandfly saliva. *PLoS Negl Trop Dis* 1, 2 (2007), e84.

DE OLIVEIRA, C. I., NASCIMENTO, I. P., BARRAL, A., SOTO, M. and BARRAL-NETTO, M. Challenges and perspectives in vaccination against leishmaniasis. *Parasitology international* 58, 4 (Dec 2009), 319-324.

DE SOUZA, C. M., SILVA, E. D., ANO BOM, A. P., BASTOS, R. C., NASCIMENTO, H. J. and DA SILVA JUNIOR, J. G. Evaluation of an ELISA for canine leishmaniasis immunodiagnostic using recombinant proteins. *Parasite Immunol* 34, 1 (Jan 2012), 1-7.

DE SOUZA DIAS, S., DA COSTA PINHEIRO, P. H., KATZ, S., DOS SANTOS, M. R. and BARBIERI, C. L. A recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* suitable for serodiagnosis of American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 72, 2 (Feb 2005), 126-132.

DENIAU, M., CANAVATE, C., FARAUT-GAMBARELLI, F. and MARTY, P. The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. *Ann Trop Med Parasitol* 97 Suppl 1 (Oct 2003), 115-133.

ELNAIEM, D. A., HASSAN, H. K. and WARD, R. D. Associations of *Phlebotomus orientalis* and other sandflies with vegetation types in the eastern Sudan focus of kala-azar. *Med Vet Entomol* 13, 2 (May 1999), 198-203.

FERREIRA, W. A., MAYRINK, W., DOS MARES-GUIA, M. L. and TAVARES, C. A. Detection and characterization of leishmania antigens from an American cutaneous leishmaniasis vaccine for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 45, 1 (Jan 2003), 35-43.

FOLLADOR, I., ARAUJO, C., CARDOSO, M. A., TAVARES-NETO, J., BARRAL, A., MIRANDA, J. C., BITTENCOURT, A. and CARVALHO, E. M. [Outbreak of American cutaneous leishmaniasis in Canoa, Santo Amaro, Bahia, Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop* 32, 5 (Sep-Oct 1999), 497-503.

FONTAINE, A., DIOUF, I., BAKKALI, N., MISSE, D., PAGES, F., FUSAI, T., ROGIER, C. and ALMERAS, L. Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions. *Parasit Vectors* 4 (2011), 187.

FORATTINI, O. P. *Entomologia médica. Psychodidae, Phlebotominae, Leishmanioses, Bartonelose.*, Ed. Univ. S.Paulo, São Paulo, (1973).

FUERTES, M. A., PEREZ, J. M., SOTO, M., LOPEZ, M. C. and ALONSO, C. Calcium-induced conformational changes in *Leishmania infantum* kinetoplastid membrane protein-11. *J Biol Inorg Chem* 6, 1 (Jan 2001), 107-117.

- GHEDIN, E., ZHANG, W. W., CHAREST, H., SUNDAR, S., KENNEY, R. T. and MATLASHEWSKI, G. Antibody response against a *Leishmania donovani* amastigote-stage-specific protein in patients with visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 4, 5 (Sep 1997), 530-535.
- GHOSH, K. N. and MUKHOPADHYAY, J. The effect of anti-sandfly saliva antibodies on *Phlebotomus argentipes* and *Leishmania donovani*. *Int J Parasitol* 28, 2 (Feb 1998), 275-281.
- GIDWANI, K., PICADO, A., RIJAL, S., SINGH, S. P., ROY, L., VOLFOVA, V., ANDERSEN, E. W., URANW, S., OSTYN, B., SUDARSHAN, M., CHAKRAVARTY, J., VOLF, P., SUNDAR, S., BOELAERT, M. and ROGERS, M. E. Serological markers of sand fly exposure to evaluate insecticidal nets against visceral leishmaniasis in India and Nepal: a cluster-randomized trial. *PLoS Negl Trop Dis* 5, 9 (Sep 2011), e1296.
- GONTIJO, C. M. F. and MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 7 (2004), 338-349.
- GOTO, H. and LINDOSO, J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8, 4 (Apr 2010), 419-433.
- HEDSTROM, R., CULPEPPER, J., HARRISON, R. A., AGABIAN, N. and NEWPORT, G. A major immunogen in *Schistosoma mansoni* infections is homologous to the heat-shock protein Hsp70. *J Exp Med* 165, 5 (May 1 1987), 1430-1435.
- HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. *Lancet* 354, 9185 (Oct 2 1999), 1191-1199.
- IBORRA, S., SOTO, M., CARRION, J., ALONSO, C. and REQUENA, J. M. Vaccination with a plasmid DNA cocktail encoding the nucleosomal histones of *Leishmania* confers protection against murine cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 22, 29-30 (Sep 28 2004), 3865-3876.
- INIESTA, V., CORRALIZA, I., CARCELEN, J., GOMEZ GORDO, L., FERNANDEZ-COTRINA, J., PAREJO, J. C., CARRION, J., SOTO, M., ALONSO, C. and GOMEZ NIETO, C. *Leishmania* major infection in susceptible and resistant mice elicit a differential humoral response against a total soluble fraction and defined recombinant antigens of the parasite. *Parasitol Res* 102, 5 (Apr 2008), 887-893.
- JENSEN, A. T., GASIM, S., ISMAIL, A., GAAFAR, A., KURTZHALS, J. A., KEMP, M., EL HASSAN, A. M., KHARAZMI, A. and THEANDER, T. G. Humoral and cellular immune responses to synthetic peptides of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11. *Scand J Immunol* 48, 1 (Jul 1998), 103-109.

JENSEN, A. T., GASIM, S., MOLLER, T., ISMAIL, A., GAAFAR, A., KEMP, M., EL HASSAN, A. M., KHARAZMI, A., ALCE, T. M., SMITH, D. F. and THEANDER, T. G. Serodiagnosis of *Leishmania donovani* infections: assessment of enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant *L. donovani* gene B protein (GBP) and a peptide sequence of *L. donovani* GBP. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93, 2 (Mar-Apr 1999), 157-160.

KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Crit Rev Microbiol* 21, 2 (1995), 123-152.

KAYE, P. and SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol* 9, 8 (Aug 2011), 604-615.

KHOSHGOO, N., ZAHEDIFARD, F., AZIZI, H., TASLIMI, Y., ALONSO, M. J. and RAFATI, S. Cysteine proteinase type III is protective against *Leishmania infantum* infection in BALB/c mice and highly antigenic in visceral leishmaniasis individuals. *Vaccine* 26, 46 (Oct 29 2008), 5822-5829.

LARRETA, R., GUZMAN, F., PATARROYO, M. E., ALONSO, C. and REQUENA, J. M. Antigenic properties of the *Leishmania infantum* GRP94 and mapping of linear B-cell epitopes. *Immunol Lett* 80, 3 (Mar 1 2002), 199-205.

LUZ, Z. M., SILVA, A. R., SILVA FDE, O., CALIGIORNE, R. B., OLIVEIRA, E. and RABELLO, A. Lesion aspirate culture for the diagnosis and isolation of *Leishmania* spp. from patients with cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104, 1 (Feb 2009), 62-66.

MAALEJ, I. A., CHENIK, M., LOUZIR, H., BEN SALAH, A., BAHLOUL, C., AMRI, F. and DELLAGI, K. Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 68, 3 (Mar 2003), 312-320.

MABEY, D., PEELING, R. W., USTIANOWSKI, A. and PERKINS, M. D. Diagnostics for the developing world. *Nat Rev Microbiol* 2, 3 (Mar 2004), 231-240.

MACFARLANE, J., BLAXTER, M. L., BISHOP, R. P., MILES, M. A. and KELLY, J. M. Identification and characterisation of a *Leishmania donovani* antigen belonging to the 70-kDa heat-shock protein family. *Eur J Biochem* 190, 2 (Jun 20 1990), 377-384.

MEDDEB-GARNAOUI, A., TOUMI, A., GHELIS, H., MAHJOUB, M., LOUZIR, H. and CHENIK, M. Cellular and humoral responses induced by *Leishmania* histone H2B and its divergent and conserved parts in cutaneous and visceral leishmaniasis patients, respectively. *Vaccine* 28, 7 (Feb 17 2010), 1881-1886.

MODI, G. B. and TESH, R. B. A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. *J Med Entomol* 20, 5 (Oct 5 1983), 568-569.

MOHAPATRA, T. M., SINGH, D. P., SEN, M. R., BHARTI, K. and SUNDAR, S. Comparative evaluation of rK9, rK26 and rK39 antigens in the serodiagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries* 4, 2 (Feb 2010), 114-117.

MONTOYA, Y., LEON, C., TALLEDO, M., NOLASCO, O., PADILLA, C., MUNOZ-NAJAR, U. and BARKER, D. C. Recombinant antigens for specific and sensitive serodiagnosis of Latin American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91, 6 (Nov-Dec 1997), 674-676.

NDAO, M. Diagnosis of parasitic diseases: old and new approaches. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009 (2009), 278246.

OLIVEIRA, F., BAFICA, A., ROSATO, A. B., FAVALI, C. B., COSTA, J. M., CAFE, V., BARRAL-NETTO, M. and BARRAL, A. Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 85, 1 (Jul 2011), 70-73.

ORLANDI-PRADINES, E., ALMERAS, L., DENIS DE SENNEVILLE, L., BARBE, S., REMOUE, F., VILLARD, C., CORNELIE, S., PENHOAT, K., PASCUAL, A., BOURGOUIN, C., FONTENILLE, D., BONNET, J., CORRE-CATELIN, N., REITER, P., PAGES, F., LAFFITE, D., BOULANGER, D., SIMONDON, F., PRADINES, B., FUSAI, T. and ROGIER, C. Antibody response against saliva antigens of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti* in travellers in tropical Africa. *Microbes Infect* 9, 12-13 (Oct 2007), 1454-1462.

PASSOS, S., CARVALHO, L. P., ORGE, G., JERONIMO, S. M., BEZERRA, G., SOTO, M., ALONSO, C. and CARVALHO, E. M. Recombinant leishmania antigens for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 12, 10 (Oct 2005), 1164-1167.

PASSOS, V. M., BARRETO, S. M., ROMANHA, A. J., KRETTLI, A. U., VOLPINI, A. C. and LIMA E COSTA, M. F. American cutaneous leishmaniasis: use of a skin test as a predictor of relapse after treatment. *Bull World Health Organ* 78, 8 (2000), 968-974.

PINERO, J., MARTINEZ, E., PACHECO, R., ARAGON, Z., DE ARMAS, F., DEL CASTILLO, A. and VALLADARES, B. PCR-ELISA for diagnosis of mucocutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 73, 1 (May 25 1999), 21-29.

POINSIGNON, A., CORNELIE, S., MESTRES-SIMON, M., LANFRANCOTTI, A., ROSSIGNOL, M., BOULANGER, D., CISSE, B., SOKHNA, C., ARCA, B., SIMONDON,

F. and REMOUE, F. Novel peptide marker corresponding to salivary protein gSG6 potentially identifies exposure to *Anopheles* bites. *PLoS One* 3, 6 (2008), e2472.

POINSIGNON, A., REMOUE, F., ROSSIGNOL, M., CORNELIE, S., COURTIN, D., GREBAUT, P., GARCIA, A. and SIMONDON, F. Human IgG antibody response to *Glossina* saliva: an epidemiologic marker of exposure to *Glossina* bites. *Am J Trop Med Hyg* 78, 5 (May 2008), 750-753.

PRATES, D. B., SANTOS, L. D., MIRANDA, J. C., SOUZA, A. P., PALMA, M. S., BARRAL-NETTO, M. and BARRAL, A. Changes in amounts of total salivary gland proteins of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) according to age and diet. *J Med Entomol* 45, 3 (May 2008), 409-413.

QUIJADA, L., REQUENA, J. M., SOTO, M. and ALONSO, C. During canine viscerocutaneous leishmaniasis the anti-Hsp70 antibodies are specifically elicited by the parasite protein. *Parasitology* 112 (Pt 3) (Mar 1996), 277-284.

QUIJADA, L., REQUENA, J. M., SOTO, M. and ALONSO, C. Analysis of the antigenic properties of the *L. infantum* Hsp70: design of synthetic peptides for specific serodiagnosis of human leishmaniasis. *Immunol Lett* 63, 3 (Oct 1998), 169-174.

RAFATI, S., HASSANI, N., TASLIMI, Y., MOVASSAGH, H., ROCHETTE, A. and PAPADOPOULOU, B. Amastin peptide-binding antibodies as biomarkers of active human visceral leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol* 13, 10 (Oct 2006), 1104-1110.

RAFATI, S., NAKHAEI, A., TAHERI, T., GHASHGHAI, A., SALMANIAN, A. H., JIMENEZ, M., MOHEBALI, M., MASINA, S. and FASEL, N. Expression of cysteine proteinase type I and II of *Leishmania infantum* and their recognition by sera during canine and human visceral leishmaniasis. *Exp Parasitol* 103, 3-4 (Mar-Apr 2003), 143-151.

RAFATI, S., SALMANIAN, A. H., HASHEMI, K., SCHAFF, C., BELLI, S. and FASEL, N. Identification of *Leishmania* major cysteine proteinases as targets of the immune response in humans. *Mol Biochem Parasitol* 113, 1 (Mar 2001), 35-43.

REBELO, J. M., DE ARAUJO, J. A., CARVALHO, M. L., BARROS, V. L., SILVA, F. S. and DE OLIVEIRA, S. T. [*Phlebotomus* (Diptera, Phlebotominae) from Saint Luis Island, Maranhao Gulf region, Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop* 32, 3 (May-Jun 1999), 247-253.

REED, S. G., BADARO, R., MASUR, H., CARVALHO, E. M., LORENCO, R., LISBOA, A., TEIXEIRA, R., JOHNSON, W. D., JR. and JONES, T. C. Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 35, 1 (Jan 1986), 79-85.

REIS, L. D. C., BRITO, M. E. F. D., ALMEIDA, É. L. D., FÉLIX, S. M., MEDEIROS, Â. C. R., SILVA, C. J. and PEREIRA, V. R. A. Clinical, epidemiological and laboratory aspects of patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41 (2008), 439-443.

REMOUE, F., CISSE, B., BA, F., SOKHNA, C., HERVE, J. P., BOULANGER, D. and SIMONDON, F. Evaluation of the antibody response to Anopheles salivary antigens as a potential marker of risk of malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100, 4 (Apr 2006), 363-370.

REQUENA, J. M., ALONSO, C. and SOTO, M. Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during Leishmania infections. *Parasitol Today* 16, 6 (Jun 2000), 246-250.

REY-LADINO, J. A., JOSHI, P. B., SINGH, B., GUPTA, R. and REINER, N. E. Leishmania major: molecular cloning, sequencing, and expression of the heat shock protein 60 gene reveals unique carboxy terminal peptide sequences. *Exp Parasitol* 85, 3 (Mar 1997), 249-263.

RIZZO, C., RONCA, R., FIORENTINO, G., VERRA, F., MANGANO, V., POINSIGNON, A., SIRIMA, S. B., NEBIE, I., LOMBARDO, F., REMOUE, F., COLUZZI, M., PETRARCA, V., MODIANO, D. and ARCA, B. Humoral response to the Anopheles gambiae salivary protein gSG6: a serological indicator of exposure to Afrotropical malaria vectors. *PLoS One* 6, 3 (2011), e17980.

ROFFI, J., DEDET, J. P., DESJEUX, P. and GARRE, M. T. Detection of circulating antibodies in cutaneous leishmaniasis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Am J Trop Med Hyg* 29, 2 (Mar 1980), 183-189.

ROHOUSOVA, I., OZENSOY, S., OZBEL, Y. and VOLFF, P. Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. *Parasitology* 130, Pt 5 (May 2005), 493-499.

ROMERO, G. A., VINITIUS DE FARIAS GUERRA, M., GOMES PAES, M. and DE OLIVEIRA MACEDO, V. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to Leishmania (Viannia) braziliensis and L. (V.) guyanensis in Brazil: clinical findings and diagnostic approach. *Clin Infect Dis* 32, 9 (May 1 2001), 1304-1312.

SANDERS, M. L., GLASS, G. E., NADELMAN, R. B., WORMSER, G. P., SCOTT, A. L., RAHA, S., RITCHIE, B. C., JAWORSKI, D. C. and SCHWARTZ, B. S. Antibody levels to recombinant tick calreticulin increase in humans after exposure to Ixodes scapularis (Say) and are correlated with tick engorgement indices. *Am J Epidemiol* 149, 8 (Apr 15 1999), 777-784.

SANTAREM, N., TOMAS, A., OUAISSI, A., TAVARES, J., FERREIRA, N., MANSO, A., CAMPINO, L., CORREIA, J. M. and 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* 101, 1 (Oct 15 2005), 18-23.

SARAVIA, N. G., VALDERRAMA, L., LABRADA, M., HOLGUIN, A. F., NAVAS, C., PALMA, G. and WEIGLE, K. A. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. *J Infect Dis* 159, 4 (Apr 1989), 725-735.

SCHWARTZ, B. S., RIBEIRO, J. M. and GOLDSTEIN, M. D. Anti-tick antibodies: an epidemiologic tool in Lyme disease research. *Am J Epidemiol* 132, 1 (Jul 1990), 58-66.

SCHWARZ, A., HELLING, S., COLLIN, N., TEIXEIRA, C. R., MEDRANO-MERCADO, N., HUME, J. C., ASSUMPÇÃO, T. C., MARCUS, K., STEPHAN, C., MEYER, H. E., RIBEIRO, J. M., BILLINGSLEY, P. F., VALENZUELA, J. G., STERNBERG, J. M. and SCHAUB, G. A. Immunogenic salivary proteins of *Triatoma infestans*: development of a recombinant antigen for the detection of low-level infestation of triatomines. *PLoS Negl Trop Dis* 3, 10 (2009), e532.

SCHWARZ, A., JUAREZ, J. A., RICHARDS, J., RATH, B., MACHACA, V. Q., CASTRO, Y. E., MALAGA, E. S., LEVY, K., GILMAN, R. H., BERN, C., VERASTEGUI, M. and LEVY, M. Z. Anti-triatomine saliva immunoassays for the evaluation of impregnated netting trials against Chagas disease transmission. *Int J Parasitol* 41, 6 (May 2011), 591-594.

SCHWARZ, A., MEDRANO-MERCADO, N., BILLINGSLEY, P. F., SCHAUB, G. A. and STERNBERG, J. M. IgM-antibody responses of chickens to salivary antigens of *Triatoma infestans* as early biomarkers for low-level infestation of triatomines. *Int J Parasitol* 40, 11 (Sep 2010), 1295-1302.

SHREFFLER, W. G., BURNS, J. M., JR., BADARO, R., GHALIB, H. W., BUTTON, L. L., MCMASTER, W. R. and REED, S. G. Antibody responses of visceral leishmaniasis patients to gp63, a major surface glycoprotein of *Leishmania* species. *J Infect Dis* 167, 2 (Feb 1993), 426-430.

SILVA, F., GOMES, R., PRATES, D., MIRANDA, J. C., ANDRADE, B., BARRAL-NETTO, M. and BARRAL, A. Inflammatory cell infiltration and high antibody production in BALB/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. *Am J Trop Med Hyg* 72, 1 (Jan 2005), 94-98.

SKEIKY, Y. A., BENSON, D. R., COSTA, J. L., BADARO, R. and REED, S. G. Association of *Leishmania* heat shock protein 83 antigen and immunoglobulin G4 antibody titers in Brazilian patients with diffuse cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 65, 12 (Dec 1997), 5368-5370.

SKEIKY, Y. A., BENSON, D. R., GUDERIAN, J. A., WHITTLE, J. A., BACELAR, O., CARVALHO, E. M. and REED, S. G. Immune responses of leishmaniasis patients to heat shock proteins of *Leishmania* species and humans. *Infect Immun* 63, 10 (Oct 1995), 4105-4114.

SOTO, M., RAM, #237, REZ, L., PINEDA, M. A., GONZ, #225, LEZ, V. M., ENTRINGER, P. F., DE OLIVEIRA, C. I., NASCIMENTO, I. P., SOUZA, A. P., CORVO, L., ALONSO, C., BONAY, P., BRODSKYN, C., BARRAL, A., BARRAL-NETTO, M. and IBORRA, S. Searching Genes Encoding *Leishmania* Antigens for Diagnosis and Protection. *Scholarly Research Exchange* 2009 (2009).

SOTO, M., REQUENA, J. M., QUIJADA, L. and ALONSO, C. Specific serodiagnosis of human leishmaniasis with recombinant *Leishmania* P2 acidic ribosomal proteins. *Clin Diagn Lab Immunol* 3, 4 (Jul 1996), 387-391.

SOTO, M., REQUENA, J. M., QUIJADA, L. and ALONSO, C. Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 36, 1 (Jan 1998), 58-63.

SOTO, M., REQUENA, J. M., QUIJADA, L., GARCIA, M., GUZMAN, F., PATARROYO, M. E. and ALONSO, C. Mapping of the linear antigenic determinants from the *Leishmania infantum* histone H2A recognized by sera from dogs with leishmaniasis. *Immunol Lett* 48, 3 (Dec 1995), 209-214.

SOTO, M., REQUENA, J. M., QUIJADA, L., GOMEZ, L. C., GUZMAN, F., PATARROYO, M. E. and ALONSO, C. Characterization of the antigenic determinants of the *Leishmania infantum* histone H3 recognized by antibodies elicited during canine visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 106, 3 (Dec 1996), 454-461.

SOTO, M., REQUENA, J. M., QUIJADA, L., PEREZ, M. J., NIETO, C. G., GUZMAN, F., PATARROYO, M. E. and ALONSO, C. Antigenicity of the *Leishmania infantum* histones H2B and H4 during canine viscerocutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 115, 2 (Feb 1999), 342-349.

SOUZA, A. P., ANDRADE, B. B., AQUINO, D., ENTRINGER, P., MIRANDA, J. C., ALCANTARA, R., RUIZ, D., SOTO, M., TEIXEIRA, C. R., VALENZUELA, J. G., DE OLIVEIRA, C. I., BRODSKYN, C. I., BARRAL-NETTO, M. and BARRAL, A. Using recombinant proteins from *Lutzomyia longipalpis* saliva to estimate human vector exposure in visceral Leishmaniasis endemic areas. *PLoS Negl Trop Dis* 4, 3 (2010), e649.

SVS/MS - **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde 2003.

SVS/MS - **Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2 ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde 2007.

TEIXEIRA, C., GOMES, R., COLLIN, N., REYNOSO, D., JOCHIM, R., OLIVEIRA, F., SEITZ, A., ELNAIEM, D. E., CALDAS, A., DE SOUZA, A. P., BRODSKYN, C. I., DE OLIVEIRA, C. I., MENDONCA, I., COSTA, C. H., VOLF, P., BARRAL, A., KAMHAWI, S. and VALENZUELA, J. G. Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum chagasi* in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis* 4, 3 (2010), e638.

TEIXEIRA, C. R., TEIXEIRA, M. J., GOMES, R. B., SANTOS, C. S., ANDRADE, B. B., RAFFAELE-NETTO, I., SILVA, J. S., GUGLIELMOTTI, A., MIRANDA, J. C., BARRAL, A., BRODSKYN, C. and BARRAL-NETTO, M. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. *J Immunol* 175, 12 (Dec 15 2005), 8346-8353.

TITUS, R. G. and RIBEIRO, J. M. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* 239, 4845 (Mar 11 1988), 1306-1308.

TRUJILLO, C., RAMIREZ, R., VELEZ, I. D. and BERBERICH, C. The humoral immune response to the kinetoplastid membrane protein-11 in patients with American leishmaniasis and Chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes. *Immunol Lett* 70, 3 (Dec 1 1999), 203-209.

VALE, A. M., FUJIWARA, R. T., DA SILVA NETO, A. F., MIRET, J. A., ALVAREZ, D. C., DA SILVA, J. C., CAMPOS-NETO, A., REED, S., MAYRINK, W. and 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* 56, 1 (Feb 2009), 41-48.

VALENZUELA, J. G., GARFIELD, M., ROWTON, E. D. and PHAM, V. M. Identification of the most abundant secreted proteins from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, vector of *Leishmania chagasi*. *J Exp Biol* 207, Pt 21 (Oct 2004), 3717-3729.

VINHAS, V., ANDRADE, B. B., PAES, F., BOMURA, A., CLARENCIO, J., MIRANDA, J. C., BAFICA, A., BARRAL, A. and BARRAL-NETTO, M. Human anti-saliva immune response following experimental exposure to the visceral leishmaniasis vector, *Lutzomyia longipalpis*. *Eur J Immunol* 37, 11 (Nov 2007), 3111-3121.

VOLF, P., TESAROVA, P. and NOHYNKOVA, E. N. Salivary proteins and glycoproteins in phlebotomine sandflies of various species, sex and age. *Med Vet Entomol* 14, 3 (Sep 2000), 251-256.

WEBB, J. R., CAMPOS-NETO, A., OVENDALE, P. J., MARTIN, T. I., STROMBERG, E. J., BADARO, R. and REED, S. G. Human and murine immune responses to a novel *Leishmania major* recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. *Infect Immun* 66, 7 (Jul 1998), 3279-3289.

WEIGLE, K. A., DE DAVALOS, M., HEREDIA, P., MOLINEROS, R., SARAVIA, N. G. and D'ALESSANDRO, A. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. *Am J Trop Med Hyg* 36, 3 (May 1987), 489-496.

WEIGLE, K. A., VALDERRAMA, L., ARIAS, A. L., SANTRICH, C. and SARAVIA, N. G. Leishmanin skin test standardization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of reaction and sensitization. *Am J Trop Med Hyg* 44, 3 (Mar 1991), 260-271.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, disponível em www.who.int/tdr/diseases/leish/ acesso em 29/06/2012.

XIMENES MDE, F., CASTELLON, E. G., DE SOUZA MDE, F., MENEZES, A. A., QUEIROZ, J. W., MACEDO E SILVA, V. P. and JERONIMO, S. M. Effect of abiotic factors on seasonal population dynamics of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in northeastern Brazil. *J Med Entomol* 43, 5 (Sep 2006), 990-995.

ZUGEL, U. and KAUFMANN, S. H. Immune response against heat shock proteins in infectious diseases. *Immunobiology* 201, 1 (Sep 1999), 22-35.

ZURITA, A. I., RODRIGUEZ, J., PINERO, J. E., PACHECO, R., CARMELO, E., DEL CASTLLO, A. and VALLADARES, B. Cloning and characterization of the *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* Hsp70 gene. Diagnostic use of the C-terminal fragment rLb70(513-663). *J Parasitol* 89, 2 (Apr 2003), 372-378.

APÊNDICE

Trabalhos desenvolvidos no período do doutorado.

- **MANUSCRITO I: Publicado.**

Using Recombinant Proteins from *Lutzomyia longipalpis* Saliva to Estimate Human Vector Exposure in Visceral Leishmaniasis Endemic Areas

- *Plos Neglected Tropical Diseases*

- **MANUSCRITO II: Em submissão**

Towards a more precise serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis using *Leishmania* recombinant proteins.

- *Plos One*.

Outros trabalhos em colaboração desenvolvidos no período do doutorado.

- **MANUSCRITO I: Publicado.**

Searching Genes Encoding *Leishmania* Antigens for Diagnosis and Protection.

- *Scholarly Research Exchange*

- **MANUSCRITO II: Publicado.**

Discovery of Markers of Exposure Specific to Bites of *Lutzomyia longipalpis*, the Vector of *Leishmania infantum chagasi* in Latin America

- *Plos Neglected Tropical Diseases*

- **MANUSCRITO III: Publicado.**

Vaccination with the *Leishmania major* recombinant ribosomal proteins L3 and L5 plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against two different *Leishmania* species in BALB/c mice.

- *Vaccine*