CAMILA APARECIDA DE CARVALHO

**DETECÇÃO DE ANTÍGENOS CIRCULANTES COMO ABORDAGEM
DIAGNÓSTICA EM LEISHMANIOSE VISCERAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2017

CAMILA APARECIDA DE CARVALHO

**DETECÇÃO DE ANTÍGENOS CIRCULANTES COMO ABORDAGEM
DIAGNÓSTICA EM LEISHMANIOSE VISCERAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador: Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Junior.

Versão Corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na biblioteca do ICB quanto na biblioteca digital de teses e dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

de Carvalho, Camila Aparecida
Detecção de antígenos circulantes como abordagem
diagnóstica em leishmaniose visceral / Camila
Aparecida de Carvalho; orientador Heitor Franco de
Andrade Jr.. -- São Paulo, 2017.
142 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Leishmaniose visceral. 2. Antígenos. 3.
Imunocomplexos. 4. IgG. 5. Carboidratos. I. Franco
de Andrade Jr., Heitor, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Camila Aparecida de Carvalho

Título da Tese: Detecção de antígenos circulantes como abordagem diagnóstica em leishmaniose visceral.

Orientador(a): Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Jr.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470

CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil

Telefone: (55-11) 3061-7066 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e
3062-2174

São Paulo, 08 de maio de 2008.

Ilmo (a)

Sr (a) Camila Aparecida Carvalho

Em reunião na presente data, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo analisou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número **CE-IMT/002/29042008** e intitulado "Avaliação da presença e influência de antígenos parasitários na sorologia da leishmaniose visceral", sob a responsabilidade do Dr. Heitor Franco de Andrade Junior.

Atenciosamente

Dra. Eufrosina Setsu Umezawa
Coordenadora do CEP-IMT

Dra. Eufrosina Setsu Umezawa
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa
IMTSP-USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Sales Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-6405
e-mail: cep@icb.usp.br
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 569/12, referente ao projeto intitulado: *"Detecção de antígenos circulantes como abordagem diagnóstica em Leishmaniose visceral"* sob a responsabilidade de **Camila Aparecida de Carvalho**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008.

São Paulo, 10 de dezembro de 2012.

Prof. Dr. Wornan Tavares de Lima
Coordenador da CEUA-ICB/USP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8406
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 12 de dezembro de 2012.

PARECER 1098/CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, na sessão realizada no dia 12.12.2012, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Defecção de antígenos circulantes como abordagem diagnóstica em leishmaniose visceral*", dos pesquisadores Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Junior e a aluna Camila Aparecida de Carvalho.

Cabe a Pesquisadora executante elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX, 2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em 12.12.2013.

Atenciosamente,

Prof. Dra. PAOLO M.A. ZANOTTO

Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 182 nas fls. 139 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do) **Heitor Franco de Andrade Jr.**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Deteção de antígenos circulantes como abordagem diagnóstica em leishmaniose visceral*" do qual participam o(s) aluno(s), **Camila Aparecida de Carvalho**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **02.01.2013**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 08 de janeiro de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil
Telefone: (55-11) 3061-8650/7193 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e
3062-2174
e-mail: cpq-imt@usp.br

São Paulo, 04 de abril de 2013.

Ilmo (a)

Dr. Heitor Franco de Andrade Junior

(aos cuidados de Camila Aparecida de Carvalho)

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética e Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa, do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, analisou e aprovou, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número **CPE-IMT/164** "Detecção de antígenos circulantes como abordagem diagnóstica em Leishmaniose visceral", sob a sua responsabilidade.

Atenciosamente,

Dr. Jorge Casseb
Presidente

Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP

Ao meu esposo e companheiro de todas as horas Tiago, pelo incentivo incondicional, muita paciência e amor.

Aos meus pais Osvaldo e Elizabeth, pela fé e amor em todos os momentos.

A minha irmã Caroline e sobrinhas Rafaela e Sophia, por todo carinho, amor e alegria.

AGRADECIMENTOS

Meu sincero agradecimento ao Prof. Heitor Franco de Andrade, pelo incentivo, confiança e paciência durante esse período, o que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho. Por sua alegria, perseverança, preocupação, força e fé, requisitos que embasaram e fortaleceram nossa relação profissional e pessoal, e minha admiração e respeito.

Aos colegas da “Leish” da Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Thiago Fidelis Ferrão e Flávia Regina, pela ajuda nos experimentos. Em especial ao Thiago, por sua dedicação ao grupo e a este trabalho. Pelos bons momentos passados juntos.

As amigas do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo Andrea e Jaqueline, por todo apoio técnico, intelectual e emocional. Pela revisão deste trabalho. Pelas muitas conversas e risadas.

Aos pesquisadores do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Andrés Jimenez Galisteo e Luciana Regina Meirelles, por todo suporte necessário para o desenvolvimento deste trabalho e pela amizade.

Ao colega Dennis Minoru Fujita do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, pelo incentivo e oportunidade de trabalho em conjunto na área de Saúde Internacional e Turismo. Pela amizade.

Ao Dr. Roberto Mitsuyoshi Hiramoto do Instituto Adolfo Lutz – São Paulo, pelas amostras de cães cedidas, pelo incentivo, pelas conversas e informações sobre LV.

A Dra. Anette Kelsei Partata do Instituto Tocantinense Presidente Antônio Carlos e Dra. Nanci do Nascimento (*in memoriam*) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, pelas amostras humanas cedidas e colaboração.

Ao Dr. Patrick Spencer do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, pela ajuda na caracterização de amostras de antígenos em cromatografia.

As colegas do laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo: Aline, Bárbara, Bruna, Elizama, Gisele, Kaiuan, Nahiara e Thalita, por toda ajuda e amizade.

Aos funcionários dos Laboratórios de Protozoologia e Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Luciano Monteiro, Mônica e Sônia, pela ajuda e amizade.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Laboratório de Investigação Médica 49 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM 49 HCFMUSP), pelo suporte técnico e compra de materiais necessários para a realização desse projeto.

Aos funcionários da Biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas, pelo auxílio na formatação desta tese, em especial Tereza e Renata.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas, por toda ajuda.

AGRADECIMENTO

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudo (processo 16062920128) e auxílio financeiro, que possibilitaram a dedicação exclusiva ao programa de Pós-Graduação e desenvolvimento deste estudo.

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se a ver a vida passar, é melhor tentar, ainda que em vão, que sentir-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver.”

Martín Luther King

RESUMO

Carvalho CA. Detecção de antígenos circulantes como abordagem diagnóstica em leishmaniose visceral [Tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2017.

A leishmaniose visceral é uma doença parasitária caracterizada por altos níveis de anticorpos IgG, importantes para o diagnóstico da infecção, mas sem discriminar doença ativa. Sem papel efetivo durante a resposta imune, estes anticorpos participam na formação de imunocomplexos circulantes, indicando a presença de antígenos circulantes. Apesar da alta especificidade diagnóstica, a detecção de antígenos em soro é pouco explorada na leishmaniose visceral. A detecção de antígenos e imunocomplexos dependem tanto da especificidade de anticorpos como das características dos antígenos, que podem ser desde grandes proteínas ou pequenos polissacarídeos. Neste estudo, avaliamos a detecção de antígenos circulantes livres ou em imunocomplexos, e as características e especificidade antigênica de anticorpos IgG a proteínas ou carboidratos de *L. (L.) infantum chagasi* em leishmaniose visceral experimental. Amostras de hamster com infecção experimental por *L. (L.) infantum chagasi* foram avaliadas aos 15, 30, 45, 60 e 90 dias de infecção. Altas concentrações de anticorpos IgG específicos foram detectadas em amostras com leishmaniose visceral experimental e natural, sempre com alta avididade, mesmo em períodos iniciais da infecção. A purificação por imunoafinidade de IgG de baixa avididade também confirmou esta alta concentração. Proteínas e carboidratos foram isolados do extrato antigênico total de promastigotas por cromatografia de exclusão molecular ou precipitação com etanol e marcadas com biotina para aminas ou açúcares. Para uso em ELISA, carboidratos foram conjugados a BSA, o que permitiu a detecção de altos níveis de anticorpos IgG específicos para carboidratos. A presença de carboidratos antigênicos também foi demonstrada através da detecção de incremento de IgG em amostras com infecção experimental, o que confirmou a presença de imunocomplexos circulantes específicos a carboidratos. Nossos dados sugerem, que a participação da resposta imune humoral na leishmaniose visceral deve ter o envolvimento de carboidratos do parasita. O desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas para a detecção de carboidratos antigênicos pode permitir a identificação de imunocomplexos e antígenos circulantes na leishmaniose visceral.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral. Antígenos. Imunocomplexos. IgG. Carboidratos.

Abstract

Carvalho CA. Detection of circulating antigens as a diagnostic approach in visceral leishmaniasis [PhD thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2017.

Visceral leishmaniasis is a parasitic disease characterized by high levels of IgG antibodies, important for the diagnosis of the infection, but without discriminating active disease. Without effective role during the immune response, these antibodies participate in the formation of circulating immune complexes, indicating the presence of circulating antigens. Despite the high diagnostic specificity, the detection of antigens in serum is poorly explored in visceral leishmaniasis. The detection of antigens and immunocomplexes depend on both the specificity of antibodies and the characteristics of the antigens, which may be from large proteins or small polysaccharides. In this study, we evaluated the detection of free circulating antigens or immunocomplexes, the characteristics and antigenic specificity of IgG antibodies to proteins or carbohydrates of *L. (l) infantum* in experimental visceral leishmaniasis. Hamster samples with experimental infection by *L. (L.) infantum chagasi* was evaluated at 15, 30, 45, 60 and 90 days of infection. High concentrations of specific IgG antibodies were detected in samples with experimental and natural visceral leishmaniasis, always with high avidity, even in initial periods of infection. Immunoaffinity purification of low avidity IgG also confirmed this high concentration. Proteins and carbohydrates were isolated from the total antigenic extract of promastigotes by molecular exclusion chromatography or ethanol precipitation and labeled with biotin for amines or sugars. For use in ELISA, carbohydrates were conjugated to BSA, which allowed the detection of high levels of carbohydrate-specific IgG antibodies. The presence of antigenic carbohydrates was also demonstrated by the detection of IgG increase in samples with experimental infection, which confirmed the presence of circulating immunocomplexes specific to carbohydrates. Our data suggest that the involvement of the humoral immune response in visceral leishmaniasis should have the involvement of carbohydrates of the parasite. The development of new diagnostic tools for the detection of antigenic carbohydrates may allow the identification of immunocomplexes and circulating antigens in visceral leishmaniasis.

Keywords: Visceral leishmaniasis. Antigens. Immune complexes. IgG. Carbohydrates.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fotos do parasito <i>L. (L.) infantum chagasi</i> , exemplos das formas amastigota e promastigotas.....	35
Figura 2 - Ciclo biológico da LV. Esquema representativo das fases restritas ao inseto vetor e a hospedeiros vertebrados.....	37
Figura 3 - Representação esquemática da ligação do <i>crosslinker</i> BS ³ com os sítios de amina primárias das partículas magnéticas via ligação NHS-éster e reação com os grupos aminas de moléculas a serem acopladas.....	58
Figura 4 - Detecção de anticorpos IgG por amostras de extrato total de promastigotas obtidas por sonicação (linha contínua e círculo fechado) e por ação de tampão químico (linha tracejada e círculo aberto). A detecção de anticorpos foi realizada em concentrações decrescentes de antígeno.....	69
Figura 5 - Eletroforese em SDS PAGE. PM – Padrão molecular; 1 – 8 diferentes concentrações de extrato total de promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> (16, 12, 8, 4, 2, 1, 0,5 e 0,24 µg/poço)	70
Figura 6 - Detecção de anticorpos IgG anti-leishmania por <i>Western-Blotting</i> em amostras de soro com infecção experimental, natural e imunização. Avaliação de antigenicidade de extrato total de promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	71
Figura 7 - Detecção de anticorpos IgG anti-leishmania. A - Cada ponto refere-se a uma medida de sorologia individual em amostras de cão, homem, hamster e coelhos. A linha tracejada separa amostras positivas de negativas. B – Detecção de anticorpos IgG em hamsteres experimentalmente infectados aos 15, 30, 45, 60 e 90 dias de infecção e cada ponto representa a sorologia de um período de infecção.....	73
Figura 8 - Detecção de anticorpos IgG anti-leishmania por ELISA. A linha contínua com quadrado representa níveis de IgG pH 7,2 e a linha contínua com triângulo representa níveis de IgG pH 5,0. O controle da reação está representado pela linha tracejada, equivalente a amostra de soro de coelho hiperimune para <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	75
Figura 9 - Detecção de anticorpos IgG anti-leishmania em ELISA. As linhas e seus respectivos pontos referem-se a concentrações de IgG detectadas por extrato antigênico total de promastigotas em amostra de soro hiperimune de coelho (1/200) representada pela linha tracejada e em amostras de IgG eluídas após seleção em pH 7,2 e pH 5,0 representadas pelas linhas contínuas com quadrado e triângulo, respectivamente.....	76
Figura 10 - Curva de detecção de antígenos do extrato total de promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> por anticorpos IgG selecionados em pH 7,2 e 5,0 em ELISA. Os pontos referem-se às concentrações de antígeno. As linhas	

contínuas representam amostras de IgG pH 7,2 e o círculo, quadrado e hexágono fechados, equivalem as concentrações de 1, 0,1 e 0,01 µg, respectivamente e as linhas pontilhadas representam amostras de IgG pH 5,0 e a pirâmide invertida, círculo e quadrado abertos, equivalem as concentrações de 1, 0,1 e 0,01µ, respectivamente..... 78

Figura 11 - Captura de antígenos circulantes por anticorpos IgG anti-leishmania purificados por afinidade em ELISA. Cada ponto representa uma amostra de soro de hamster experimentalmente infectados aos 15, 30, 45, 60, 90 dias após a infecção. O intervalo no eixo y representa o *cut-off* da reação..... 80

Figura 12 - Detecção de imunocomplexos circulantes em amostras de soro de hamster infectados experimentalmente com *L. (L.) infantum chagasi*. Cada ponto representa uma amostra e o intervalo no eixo y o *cut-off* da reação..... 81

Figura 13 - Presença de imunocomplexos circulantes aos 15, 30, 45, 60 e 90 dias após infecção. Cada ponto representa uma amostra e o intervalo no eixo y o *cut-off* da reação..... 82

Figura 14 - Evolução média de IgG anti-leishmania em hamsteres infectados experimentalmente com *L. (L.) infantum chagasi* em associação com valores médios de avidéz. Símbolos redondo e linha tracejada mostram a evolução da sorologia para anticorpos IgG e o símbolo quadrado e linha contínua mostram valores para avidéz. As barras representam o desvio padrão das amostras testadas..... 84

Figura 15 - Avidéz de anticorpos IgG anti-leishmania em diluições progressivas de amostras de soros em diferentes períodos da infecção experimental em hamster (A-15, B-30, C-45, D-60 e D-90 dias após infecção). Os pontos representam cada diluição testada (1/100, 1/200, 1/400 e 1/800). As amostras em destaque apresentaram aumento na porcentagem de avidéz para a diluição final em comparação a diluição inicial testada..... 86

Figura 16 - Avidéz de anticorpos IgG anti-leishmania em amostras de soro de cães com infecção natural. As amostras de soro foram testadas em uma curva de diluição, cada ponto representa uma diluição (1/100, 1/200, 1/400 e 1/800), as linhas representam a curva para cada amostra. A – Grupo de amostras com manutenção de avidéz; B – Grupo de amostras com aumento de avidéz e C – Grupo de amostras com queda de avidéz..... 89

Figura 17 - Perfil cromatográfico em coluna Sephadex G25 de extrato total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*. Linha preta contínua representa absorbância por ultravioleta (UV 260nm) e linha tracejada vermelha representa a condutividade da amostra..... 91

Figura 18 - Determinação e quantificação de proteínas e carboidratos em frações do extrato total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* obtidas por cromatografia de exclusão molecular. A linha preta contínua representa a determinação de proteínas pelo método de Bradford e a linha vermelha tracejada representa a determinação de carboidratos pelo método de Schiff. Os pontos representam as frações provenientes da cromatografia..... 92

Figura 19 - Perfil cromatográfico em coluna Bio gel P2 de fração de baixo peso molecular do extrato total de promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> obtido em cromatografia G25. Linha preta contínua representa absorbância por UV 260nm e linha tracejada vermelha representa a condutividade da amostra.....	93
Figura 20 - Detecção de proteínas e carboidratos biotinilados presentes no extrato total de promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> . Cada ponto representa um ponto de diluição. A linha contínua com pontos fechados representa proteínas biotiniladas com NHS e a linha tracejada com pontos abertos representa carboidratos biotinilados com hidrazida.....	95
Figura 21 - Detecção de proteínas e carboidratos biotinilados presentes no extrato total de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> por ELISA de captura. Os pontos representam a curva de diluição testada para as amostras. A linha contínua com pontos fechados representa a amostra de proteínas biotiniladas e a linha tracejada com pontos abertos representa a amostra de carboidratos biotinilados.....	96
Figura 22 - Captura de carboidratos antigênicos biotinilados especificamente com biotina NHS e hidrazida em ELISA. As linhas representam a curva de diluição utilizada. Os pontos e a linha tracejada representam a fração antigênica composta por carboidratos conjugados a biotina Hidrazida e os quadrados e a linha contínua representam a fração antigênica composta por carboidratos conjugados a biotina NHS.....	98
Figura 23 - Eletroforese em gel de acrilamida 12%. PM – Padrão molecular; 1 – Carboidrato conjugado a BSA corado com Prata; 2 – Carboidrato conjugado a BSA corado com Schiff.....	99
Figura 24 - Detecção de anticorpos IgG anti-leishmania em amostras de soro de coelho imunizado. Os pontos representam a curva de diluição usada na sensibilização da amostra de carboidrato conjugado a BSA. EAT – Extrato antigênico total de promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> , utilizado como controle.....	100
Figura 25 - Detecção de anticorpos IgG anti-leishmania e avaliação de reatividade de amostras de soro de hamster entre frações antigênicas isoladas compostas por proteínas e carboidratos. Os pontos fechados representam a reatividade a fração antigênica proteica e pontos abertos representam reatividade a fração antigênica composta por carboidratos. A – Comparação de reatividade total; B – Comparação entre amostras mais reativas ao antígeno composto por carboidratos e C – Comparação entre amostras mais reativas ao antígeno proteico.....	102
Figura 26 - Detecção de anticorpos IgG anti-leishmania em soro de hamster experimentalmente infectados. Cada ponto representa uma amostra testada aos 15, 30, 45, 60 e 90 dias pós infecção. Círculos fechados representam fração de proteínas e os círculos abertos representam fração de carboidratos conjugados a BSA.....	103

Figura 27 - Determinação da avidéz de anticorpos IgG anti-leishmania em amostras de soro de hamster com infecção experimental ao 15, 30, 45, 60 e 90 dias de infecção. Cada ponto representa a média da porcentagem de avidéz de IgG para cada período após infecção. A linha contínua com pontos abertos representa a avidéz de IgG para carboidratos e a linha contínua com pontos fechados representa a avidéz de IgG para proteínas.....	104
Figura 28 - Correlação de resultados de ELISAc e ELISAd, mostrando a distribuição das amostras de hamster. ELISAd – detecção de anticorpos IgG após dissociação (incremento de IgG) e ELISAc detecção de anticorpos IgG.....	106
Figura 29 - Comparação entre resultados de amostras de soro de hamster experimentalmente infectados com incremento de IgG, os pontos representam os períodos após infecção (15, 30, 45, 60 e 90 dias) e as médias das amostras. A linha com círculos abertos representa a detecção de IgG em ELISA convencional, a linha com pontos fechados representa a detecção de IgG em ELISA dissociativo e a linha tracejada com triângulos representa a porcentagem de incremento de IgG nas amostras.....	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição do perfil de avidéz de anticorpos IgG anti- <i>Leishmania</i> em amostras de soro de hamster em diferentes períodos de infecção (15, 30, 45, 60 e 90 dias). As amostras foram classificadas de acordo com os resultados de avidéz obtidos após avaliação da diluição testada.....	87
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A2 - Antigen 2

BS³ - Bis[sulfosuccinimidyl] suberate -

BSA - Bovine serum albumin

C3 - Proteína 3 do sistema complemento

CD - Cluster of Differentiation

CO₂ - Gás carbônico

DAB - 3,3 diaminobenzidina tetrahidroclorato

DAT - Direct agglutination test (Teste de aglutinação direta)

DMSO - Dimetilsulfóxido

EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid

ELISA - Enzyme linked immunosorbent assay

GILP - Glicoinositolfosfolípidios

Gp63 – Glicoproteína de 63 kilodaltons

GPI - Glicosilfosfatidilinositol

HIV - Human immunodeficiency vírus (Vírus da imunodeficiência humana)

HCL – Ácido clorídrico

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

HSP70 - Heat shock proteins 70 kDa

HSP83 - Heat shock proteins 83 kDa

IgA- Immunoglobulin A (Imunoglobulina A)

IgE - Immunoglobulin E (Imunoglobulina E)

IgG - Immunoglobulin G (Imunoglobulina G)

IgM - Immunoglobulin M (Imunoglobulina M)

IL-4 - Interleucina 4

IL - 5 – Interleucina 5

IL-10 - Interleucina 10

IL-12 - Interleucina 12

IL-13 - Interleucina 13

IFN- γ - Interferon gama

k39 – Antígeno 39

kDa - Kilodalton

KMP11 - Kinetoplastid membrane protein-11

LPG - Lipofosfoglicano

LPLC - Low Pressure Liquid Chromatography

LPS – Lipopolissacaride

LV - Leishmaniose visceral

NH36 - Nucleoside hydrolase 36

NHS-éster - N hydroxysulfosuccinimide

NK – Natural Killer

OPD - Ofenilodiamina

PBS - Phosphate Buffered Saline

PCR - Polymerase chain reaction

PPG - Proteofosfoglicanos

PMSF - Phenylmethylsulfonyl fluoreide

PSA-2 - Promastigote surface antigen 2

PSG - Promastigote secretory gel (Gel secretado de promastigota)

qPCR - Quantitative polymerase chain reaction

rA2 - Recombinant antigen 2

rGBP - Recombinant gene B protein

rgp63 – Recombinant glicoprotein 63 kDa

rHsp 70 - Recombinant heat-shock protein 70 kDa

RIFI - Reação de imunofluorescência indireta

rk39 - Antígeno recombinante 39

rk28 - Antígeno recombinante 28

RPM - Rotações por minuto

SDS - Sodium dodecyl sulfate

TGF- β - Transforming growth factor beta (Fator de crescimento transformador beta)

TH - T helper cells (célula T auxiliadora)

TH1 - T helper cells type 1 (célula T auxiliadora tipo 1)

TH2 - T helper cells type 2 (célula T auxiliadora tipo 2)

TH3 - T helper cells type 3 (célula T auxiliadora tipo 3)

TH17 - T helper cells type 17 (célula T auxiliadora tipo 17)

TMB - 3,3',5, 5' – Tetramethylbenzidine

TNF- α - Tumor necrosis factor alfa (Fator de necrose tumoral alfa)

Treg - T cells regulatory (célula T regulatória)

UV - Ultravioleta

WHO - World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	27
2 OBJETIVOS.....	30
2.1 Gerais.....	30
2.2 Específicos.....	30
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	31
3.1 Leishmaniose visceral.....	31
3.1.1 <u>Aspectos gerais</u>	31
3.2 Agente etiológico.....	34
3.3 Ciclo biológico.....	35
3.4 Interação parasita, vetor e resposta imune.....	37
3.5 Diagnóstico.....	41
3.5.1 <u>Métodos parasitológicos</u>	41
3.5.2 <u>Métodos moleculares</u>	42
3.5.3 <u>Métodos sorológicos</u>	43
3.5.3.1 <u>Antígenos</u>	43
3.5.3.2 <u>Deteccção de anticorpos</u>	45
3.5.3.3 <u>Deteccção de antígenos</u>	48
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
4.1 Amostras.....	50
4.2 Manutenção <i>in vivo</i> de parasitos <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	51
4.2.1 <u>Determinação de carga parasitária em hamster</u>	51
4.3 Manutenção <i>in vitro</i> de promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	52
4.4 Produção de extrato antigênico total.....	52
4.4.1 <u>Tampão de lise</u>	53
4.4.2 <u>Sonicação</u>	53
4.5 Quantificação de proteínas do extrato antigênico total de promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	54
4.6 Caracterização eletroforética de proteínas do extrato antigênico total de promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	54
4.7 Ensaio de antigenicidade do perfil eletroforético por <i>Western-Blotting</i>	55
4.8 Deteccção de anticorpos IgG anti-leishmania em ELISA.....	56
4.9 Seleção de anticorpos IgG por afinidade ao extrato antigênico total de promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	56
4.9.1 <u>Precipitação de proteínas do extrato antigênico total por etanol a frio</u>	56
4.9.2 <u>Seleção de anticorpos IgG por afinidade ao extrato antigênico total acoplado a partículas magnéticas</u>	57
4.10 Deteccção de antígenos de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> em ELISA.....	59
4.11 Deteccção de imunocomplexos circulantes em amostras de soro de hamster com leishmaniose visceral experimental.....	60
4.12 Determinação de avidéz de anticorpos IgG anti-leishmania em amostras com leishmaniose visceral experimental e natural.....	60
4.13 Isolamento de frações contendo moléculas de alto e baixo peso do extrato antigênico total de promastigotas.....	61
4.13.1 <u>Dosagem de carboidratos presentes no extrato antigênico total</u>	61
4.14 Isolamento de moléculas de baixo peso	62

4.15 Biotinilação de proteínas e carboidratos isolados do extrato antigênico total de promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	62
4.15.1 Biotinilação de proteínas.....	62
4.15.2 Biotinilação de carboidratos.....	63
4.16 Detecção de proteínas e carboidratos biotinilados em ELISA.....	64
4.17 Avaliação da antigenicidade de proteínas e carboidratos biotinilados em ELISA.....	64
4.18 Conjugação de carboidratos do extrato antigênico total de promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> a moléculas de BSA.....	64
4.19 Caracterização eletroforética de carboidratos do extrato antigênico total de promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> conjugados a moléculas de BSA.....	65
4.20 Antigenicidade de fração de carboidratos conjugados a moléculas de BSA....	66
4.21 Detecção de anticorpos IgG anti-leishmania reativos a proteínas e carboidratos.....	66
4.22 Determinação de incremento de anticorpos IgG para carboidratos antigênicos de promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	66
4.23 Análise estatística.....	67
5 RESULTADOS	68
5.1 Caracterização de extrato antigênico total de promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	68
5.1.2 <u>Comparação de eficiência antigênica de extrato total obtidos por sonicação e ação de tampão químico</u>	68
5.1.3 <u>Caracterização eletroforética de proteínas de promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i></u>	69
5.1.4 <u>Antigenicidade de perfil eletroforético de extrato antigênico total de promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> em grupos controles de amostras com infecção experimental, natural e imunização</u>	71
5.1.5 <u>Detecção de anticorpos IgG anti-leishmania em grupos controles de amostras com infecção experimental, natural e imunização</u>	72
5.2 Seleção de anticorpos IgG anti-leishmania em soro de coelho imunizado com extrato total de promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	74
5.3 Detecção de antígenos do extrato antigênico total de promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> em ELISA sandwich.....	77
5.4 Detecção de antígenos circulantes em amostras de soro de hamsteres com infecção experimental em ELISA sandwich	79
5.5 Detecção direta de imunocomplexos circulantes em amostras de soro de hamster com infecção experimental em ELISA sandwich	80
5.6 Aidez de anticorpos IgG anti-leishmania.....	83
5.6.1 <u>Aidez de anticorpos IgG em amostras de soro de hamster com leishmaniose visceral experimental</u>	83
5.6.2 <u>Avaliação da influência de altas concentrações de anticorpos IgG anti-leishmania na determinação da aidez em amostras de soro de hamsteres experimentalmente infectados</u>	85
5.6.3 <u>Avaliação da influência de altas concentrações de anticorpos IgG anti-leishmania na determinação de aidez em amostras de soros de cães com infecção natural</u>	88
5.7 Isolamento e identificação de perfis de proteínas e carboidratos presentes no extrato total de promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i>	90
5.7.1 <u>Perfil cromatográfico do extrato total de promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i></u>	90

5.7.2 <u>Identificação e quantificação de proteínas e carboidratos em frações do extrato total de promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> processadas em cromatografia de exclusão molecular</u>	91
5.7.3 <u>Perfil cromatográfico de fração de baixo peso molecular do extrato total de promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i></u>	93
5.7.4 <u>Caracterização de proteínas e carboidratos presentes no extrato total de promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i></u>	94
5.7.5 <u>Deteção de proteínas e carboidratos biotinilados</u>	94
5.8 <u>Antigenicidade de proteínas e carboidratos biotinilados</u>	96
5.9 <u>Captura de antígenos biotinilados (NHS) em amostra de fração composta por carboidratos</u>	97
5.10 <u>Caracterização eletroforética de moléculas de BSA conjugadas a carboidratos</u>	99
5.11 <u>Antigenicidade de carboidratos conjugados a BSA</u>	100
5.12 <u>Deteção de anticorpos IgG anti-leishmania contra frações isoladas de proteínas e carboidratos presentes no extrato total de promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> em amostras de soro de hamster com infecção experimental...</u>	101
5.13 <u>Determinação da presença de imunocomplexos circulantes em amostras de soro de hamster experimentalmente infectados com promastigotas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> usando fração de antigênica composta por carboidratos</u>	105
6 DISCUSSÃO	108
7 CONCLUSÕES	125
7.1 Gerais.....	125
7.2. Específicas.....	125
REFERÊNCIAS	127

1 INTRODUÇÃO

A LV é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania* e tem como agente etiológico as espécies *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e *Leishmania (Leishmania) donovani* (Von Stebut, 2015). A transmissão ocorre através da picada de fêmeas contaminadas das espécies *Phlebotomus* e *Lutzomia* (Sacks, Kamhawi, 2001). Os principais fatores de risco associados a LV humana são: condições socioeconômicas desfavoráveis, desnutrição, migração populacional e mudanças climáticas e ambientais (da Costa et al., 2015), vale ressaltar o importante papel do cão doméstico no ciclo de transmissão da doença (Nunes et al., 2010). Essa relação entre a presença do inseto vetor, o cão doméstico e o homem, somada a casos positivos em meio a população canina, aumenta o risco para o desenvolvimento e em geral precedem o relato de casos de LVH (Belo et al., 2013).

Após a transmissão de formas promastigotas a um hospedeiro suscetível, ocorre a disseminação hematogênica e concentração parasitária em órgãos específicos, como baço, fígado, linfonodos e medula óssea, e após o período de incubação o hospedeiro apresenta sintomas clássicos da doença como emagrecimento, febre e hepatoesplenomegalia (Roberts, 2006). As manifestações clínicas da LV podem se apresentar de diferentes formas, podendo ser assintomática e até letal (Kevric et al., 2015). A evolução da infecção está relacionada a suscetibilidades, como o estado imunológico e nutricional do hospedeiro, em que casos graves são observados principalmente em crianças e indivíduos imunocomprometidos (Neuber, 2008).

O diagnóstico da LV é considerado complexo, pois tanto na doença humana, como na doença canina, a sintomatologia não é específica, em que uma avaliação abrangente é necessária, a qual deve compreender aspectos como o diagnóstico clínico e laboratorial (Solano-Gallego et al., 2009). A complexidade encontrada no diagnóstico deve-se em parte ao fato de seus sintomas e características clínicas serem compartilhados por uma série de doenças, como por exemplo, malária, esquistossomose e tuberculose (Sundar, Rai, 2002).

O diagnóstico laboratorial da LV pode ser realizado através de diferentes metodologias, em que a escolha de um método deve considerar aspectos como as

diferentes formas de execução, parâmetros como sensibilidade e especificidade, presença de sintomas e condições de saúde do paciente (Maia, Campino, 2008).

A conduta para o diagnóstico laboratorial da LV, baseia-se na execução de testes imunológicos e do teste parasitológico (Ministério da Saúde, 2016). Entre os testes imunológicos são recomendados a RIFI, os testes rápidos imunocromatográficos e o ELISA para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* (Ministério da Saúde, 2016). Outra abordagem diagnóstica utilizada é o exame parasitológico, que é considerado referência, pois permite o isolamento de formas amastigotas a partir de amostras de medula óssea, linfonodo e baço (Ministério da Saúde, 2016). Entretanto, a execução deste tipo de diagnóstico deve ser avaliada com cautela, já que sua coleta pode desencadear a ocorrência de episódios hemorrágicos (Chappuis et al., 2007; Sakkas et al., 2016).

Entre os diversos mecanismos de resposta imunológica observados durante a LV, destaca-se a elevada presença de anticorpos IgG específicos (hipergamaglobulinemia), entretanto essa condição não possui papel efetivo no controle e eliminação da doença (Singh, 2006; Baneth et al., 2008). A LV se caracteriza pela persistência do parasita no hospedeiro, o que desencadeia diversos mecanismos de defesa, entre os quais, se destaca o processo de formação de imunocomplexos circulantes através da interação entre anticorpos e antígenos específicos (Lambert et al., 1981).

A formação de imunocomplexos circulantes em fluídos biológicos é dependente de concentrações de anticorpos e antígenos circulantes e de uma possível associação entre os mesmos, sua presença pode mascarar a verdadeira proporção de antígenos e anticorpos presentes em uma amostra sorológica, dificultando assim sua detecção em testes sorológicos convencionais (Gustaw et al., 2008). Em condições que permitem dissociação do imunocomplexo, a interação antígeno-anticorpo é quebrada, permitindo uma maior exatidão de suas concentrações (Gustaw et al., 2008). A identificação de imunocomplexos circulantes em amostras sorológicas indica a presença de antígeno circulante na mesma, o que tem como consequência um diagnóstico mais preciso e pode elucidar resultados sorológicos conflitantes, nos quais a sintomatologia da doença é evidente, porém os testes podem se mostrar indeterminados ou negativos.

A detecção de antígenos pode fornecer melhores resultados laboratoriais, pois os níveis de antígenos podem ser relacionados a carga parasitária de um indivíduo com LV

(Kaur, Kaur, 2013). Entretanto a detecção de antígenos por ELISA é pouco usada devido a sua baixa sensibilidade e a interferência causada por imunocomplexos circulantes, podendo ocasionar resultados falsos negativos (Ferrua et al., 2009). O estudo e desenvolvimento de testes para antígenos circulantes na LV, mostra-se como ferramenta útil para o diagnóstico laboratorial, principalmente em casos específicos onde a sorologia convencional apresenta resultados conflitantes.

Neste trabalho, avaliamos em teste sorológico durante a LV experimental do hamster, a presença de antígenos circulantes livres ou em imunocomplexos, suas características químicas e as características e especificidade dos anticorpos IgG envolvidos. A disponibilidade de antígenos circulantes está relacionada a diversas características encontradas durante a doença, entre as quais, destacam-se a presença de anticorpos IgG e características como sua concentração, avidéz e afinidade à antígenos específicos. Esse conjunto de informações está intrinsecamente relacionado a formação de imunocomplexos circulantes e eliminação de antígenos, os quais influenciam diretamente em resultados de testes laboratoriais usados para o diagnóstico da LV, o que reforça a dependência do desenvolvimento de testes laboratoriais mais específicos, que devem ser avaliados em conjunto com informações relacionadas a resposta imune humoral desenvolvida durante a doença.

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

- ✓ Avaliar a presença de antígenos de leishmania em amostras de soro com infecção experimental e natural, considerando a influência de características de anticorpos IgG, tais como sua presença, avidéz e especificidade, e a presença e formação de imunocomplexos circulantes, utilizando como ferramentas de avaliação testes sorológicos.

2.2 Específicos

- ✓ Selecionar anticorpos IgG anti-leishmania por afinidade à antígenos de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* e avaliar sua reatividade em testes de captura;
- ✓ Detectar anticorpos IgG anti-leishmania, antígenos e imunocomplexos circulantes em amostras com LV;
- ✓ Avaliar a avidéz de anticorpos IgG na LV experimental e natural, considerando a presença de altos níveis anticorpos específicos;
- ✓ Isolar e identificar perfis de antígenos presentes em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* e avaliar aspectos de especificidade em testes de detecção e avidéz de anticorpos IgG anti-leishmania e na detecção de imunocomplexos circulantes.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Leishmaniose visceral

3.1.1 Aspectos gerais

Segundo a Organização Mundial de Saúde cerca de 310 milhões de pessoas estão em risco de contrair LV e cerca de 50.000 – 90.000 novos casos ocorrem anualmente (*World Health Organization* (WHO), 2017). É considerada uma doença negligenciada devido à alta prevalência de casos em áreas tropicais e subtropicais, afetando principalmente populações pobres, que vivem em condições inadequadas de saneamento básico e em contato com insetos vetores e animais reservatórios (WHO, 2017). A LV é endêmica em 88 países e cerca de 90% dos casos estão concentrados em países como Brasil, Etiópia, Quênia, Somália, Índia, Sudão e Sudão do Sul (WHO, 2017). A doença caracteriza-se pelo tropismo do parasita por órgãos como baço, fígado, linfonodo e medula óssea (Murray et al., 2005).

No Brasil, a LV é considerada uma doença endêmica e encontra-se em franca expansão geográfica, o que caracteriza sua urbanização e uma mudança em seu perfil de transmissão, antes restrito a áreas rurais. Como consequência deste processo, o relato de surtos em centros urbanos é cada vez mais frequente, como descrito em estudos nos estados de Pernambuco, São Paulo, Maranhão e Rio de Janeiro (Dantas-Torres, Brandão-Filho, 2006; Silva et al., 2008; D'Andrea et al., 2015; Furtado et al., 2015;).

Esta infecção parasitária apresenta grande importância médica e veterinária, e é considerada uma antropozoonose pertencente ao grupo de doenças negligenciadas. Entre os hospedeiros do parasito, o cão doméstico tem papel de destaque no ciclo de transmissão, como o principal reservatório responsável pela disseminação da doença em áreas que sofrem intensa atividade migratória, em que a associação de fatores como a sua presença e o desmatamento, contribui diretamente para a transmissão e disseminação da doença (Alves, Bevilacqua, 1997; Baneth et al., 2008). Estima-se que a taxa de infecção atinja milhões de cães na América do Sul, aumentando assim o risco de transmissão e

ocorrência de surtos entre a população humana, o que direciona a atenção das autoridades para a identificação de novos casos caninos da doença, fornecendo dados importantes para o conhecimento das vias de transmissão, rotas de expansão geográfica, identificação de áreas endêmicas e ainda possibilitando a implantação de medidas de controle (Harhay et al., 2011).

A LV foi descrita pela primeira vez em 1903 por Leishman e Donovan (Herwaldt, 1999). Leishman descreveu o parasita após estudar a necropsia de um soldado britânico que havia apresentado febre, esplenomegalia e caquexia, ele observou em exame histológico a presença de formas arredondadas, e alguns meses depois Donovan descreveu um parasita com as mesmas características em material de punção esplênica de um jovem com quadro clínico semelhante ao do paciente descrito por Leishman, neste mesmo ano o gênero do parasita foi nomeado *Leishmania* por Ross, com ocorrência nos chamados velho e novo mundo (Lainson, Shaw, 2010).

O cão (*Canis familiaris*) é o principal reservatório da LV em áreas urbanas, seu intenso parasitismo cutâneo favorece a infecção de insetos vetores e a propagação da doença (Ministério da Saúde, 2006; Diniz et al., 2008). Animais reservatórios sinantrópicos da LV são raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*), gambás (*Didelphis albiventris* e *Didelphis marsupialis*) e roedores (*Rattus rattus*, *Nectomys squamipes*, *Trichomys apereoides*, *Proechimys canicollis*, *Coendu prehensilis*) (Quinnell, Courtenay, 2009), embora o papel epidemiológico desempenhado por roedores na transmissão urbana permaneça incerto. A LV era limitada à ambientes rurais, porém, ao longo do tempo a doença passou por uma clara transição epidemiológica, com incidências crescentes em áreas urbanas (Lara-Silva et al., 2015).

A transmissão da LV depende da presença de um inseto vetor, estima-se que aproximadamente 50 espécies tenham essa capacidade (Kamhawi, 2006). As espécies transmissoras diferenciam-se em relação aos continentes que habitam, a espécie *Phlebotomus* tem ocorrência em países do velho mundo e a espécie *Lutzomyia* com ocorrência em países do novo mundo (Sacks, Kamhawi, 2001). São de fácil adaptação a diferentes tipos de ambientes, podendo ser facilmente encontrados após o período chuvoso, apresentando atividade noturna e crepuscular (Ministério da Saúde, 2006). No Brasil as espécies transmissoras da LV são *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (de Brito et al., 2014). Em geral o habitat destes vetores envolve áreas de peridomicílio, em

que são encontradas as fêmeas responsáveis pela transmissão da doença (Sharma, Singh, 2008).

A LV humana é caracterizada pela infecção parasitária de órgãos como baço, fígado, linfonodos e medula óssea, acompanhada de sintomas como mal-estar, febre, diarreia, dores abdominais, palidez, vômito, astenia, mialgia, icterícia, sudorese, calafrios, fenômenos hemorrágicos, náusea, hiporexia e perda de peso (Pastorino et al., 2002; Von Stebut, 2014). O acúmulo de células fagocíticas nos órgãos infectados causa uma hiperplasia de células e o aumento de baço e fígado, caracterizando quadros de hepatoesplenomegalia (Grech et al., 2000) e quando não tratada pode ser fatal. Os fatores de risco para aquisição e desenvolvimento da LV estão associados principalmente ao estado nutricional e imunológico dos indivíduos suscetíveis, como por exemplo em pacientes com co-infecção leishmania/HIV, os quais podem apresentar recidivas da infecção parasitária em decorrência da infecção viral instalada (Alvar et al., 1997; Lindoso, Lindoso, 2009).

A combinação de aspectos relacionados ao vetor, parasita, reservatórios, sintomas, ecologia, epidemiologia e práticas culturais, contribuem diretamente para a transmissão da LV, em que o principal foco de prevenção deve ser direcionado para eliminação de populações de espécies de mosquitos transmissores (Alexander, Maroli, 2003). O crescente número de casos observados no Brasil e a expansão da transmissão em áreas anteriormente não afetadas, sugerem que as medidas de controle atualmente utilizadas podem não exercer impacto significativo para o controle da doença, fato que pode estar relacionado com a má compreensão de mecanismos envolvidos nas infecções humanas e caninas, e ainda ao papel de casos assintomáticos no ciclo de transmissão (Romero, Boelaert, 2010). As estratégias de controle devem ser baseadas na compreensão de características ecológicas, geográficas, aspectos epidemiológicos e identificação de reservatórios antroponóticos ou zoonóticos de parasitos (Guerin et al., 2002).

A infecção canina pode ser sintomática ou assintomática, característica que pode dificultar a identificação de cães positivos (Baneth et al., 2008). A infecção canina é caracterizada por sintomas como perda de peso, aumento dos gânglios linfáticos, hepatoesplenomegalia, ceratoconjuntivite, onicogrifose, alopecia, dermatite, úlceras de pele, infecções bacterianas secundárias, coagulopatia e anemia evidenciada por meio de sangramento natural dos orifícios (Baneth et al., 2008). Os sintomas e gravidade da LV

canina relacionam-se ao estado imunológico do cão afetado e em geral a doença mostra-se fatal de 2 à 6 meses a partir do início dos sintomas e os animais que não evoluem para morte se apresentam assintomáticos em aproximadamente 1 ano após o início da infecção (Travi et al., 2009). A eutanásia de cães soropositivos para LV é realizada pelo governo brasileiro como medida de controle e mesmo sem evidências da eficácia da diminuição dos casos caninos, esta prática continua sendo realizada, gerando um questionamento ético e científico deste processo (Costa, 2011).

3.2 Agente etiológico

Os parasitas do complexo *Leishmania* pertencem ao reino *Protozoa*, filo *Euglenozoa*, classe *Kinetoplastea*, ordem *Trypanosomatida*, família *Trypanomatidae*, gênero *Leishmania*, subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, os quais compreendem mais de 20 espécies.

A classificação das diferentes espécies de leishmania é assunto conflituoso entre os estudiosos, pois desde sua descoberta ocorreram várias classificações com bases em diferentes modelos propostos por diferentes pesquisadores, isto se deve ao complexo ciclo evolutivo deste parasita e as inúmeras espécies conhecidas (Lainson, Shaw, 2010). A classificação mais aceita é a de Ross em 1903 e Lainson e Shaw em 1987, que se baseia no local de desenvolvimento do parasita no trato alimentar do inseto vetor, classificando assim o gênero *Leishmania* e dividindo-o em dois subgêneros, a saber: o gênero *Leishmania* com reprodução nos intestinos médio e anterior e o gênero *Viannia* com reprodução nos intestinos médio, anterior e posterior (Lainson, Shaw, 2010).

Os protozoários do gênero *Leishmania* são dimórficos e apresentam duas formas principais, a forma flagelada promastigota, encontrada no trato digestório do inseto vetor e a forma arredondada amastigota, encontrada no interior de macrófagos em hospedeiros mamíferos. As promastigotas apresentam um corpo alongado medindo aproximadamente 15,0 a 20,0 μm de comprimento e 1,5 a 3,5 μm de largura e um flagelo medindo de 15 a 28 μm , já as amastigotas medem cerca de 2 a 4 μm de diâmetro (Herwaldt, 1999). A transformação morfológica do parasito é determinada diretamente por condições

ambientais encontradas nos hospedeiros infectados (Herwaldt, 1999). As formas amastigotas e promastigotas estão demonstradas na Figura 1.

Fonte: Ministério da Saúde, 2017.

Figura 1 – Fotos do parasito *L. (L) infantum chagasi*, exemplos das formas amastigota e promastigotas.

3.3 Ciclo biológico

O ciclo de vida de *Leishmania spp.* é considerado complexo e envolve parasitos, insetos vetores e hospedeiros vertebrados, como o homem, o cão e roedores (WHO, 2017). É considerado um ciclo de vida digenético, no qual o parasito necessita de dois hospedeiros para completar seu desenvolvimento e é dividido em duas fases distintas: (1) fase no inseto vetor que compreende formas promastigotas de vida livre, que por motilidade colonizam o intestino do inseto fêmea; (2) fase no hospedeiro mamífero que compreende formas amastigotas intracelulares que colonizam macrófagos do hospedeiro vertebrado e causam doença (Reguera et al., 2016).

O ciclo de vida no vetor inicia-se quando ocorre a ingestão de sangue de um hospedeiro vertebrado contendo macrófagos infectados com amastigotas. Esses

macrófagos se rompem e liberam as amastigotas, as quais se diferenciam em promastigotas procíclicas e se multiplicam, processo que ocorre ainda no sangue ingerido que está confinado na matriz peritrófica secretada pelo epitélio intestinal e composta por quitina, glicoproteínas e proteínas (Kamhawi, 2006). As promastigotas procíclicas iniciam um processo interno de digestão da matriz peritrófica por meio da liberação e ação de uma enzima digestiva, a quitinase, e se multiplicam, estabelecendo assim um estágio de infecção inicial (Kamhawi, 2006). Após o rompimento da matriz peritrófica e liberação de parasitos, o próximo estágio morfológico é denominado promastigota nectomona, que inicia a migração pelo intestino e se diferencia em promastigota haptomona (Kamhawi, 2006). Neste processo, estas formas se fixam pelo flagelo no epitélio do intestino médio anterior para multiplicação, o que evita a expulsão do parasita através da defecação (Kamhawi, 2006). A capacidade de fixação das promastigotas ao epitélio intestinal do inseto é atribuída a interação que ocorre entre glicoconjugados, como o LPG, presentes no parasito que se ligam a receptores presentes no intestino do vetor (Kamhawi, 2006). As haptomonas se diferenciam em leptomonas e se multiplicam na região da válvula estomodeal, as quais são responsáveis pela secreção de uma matriz proteica denominada PSG, essencial para o processo final de transformação originando promastigotas metacíclicas, consideradas formas infectantes, processo chamado de metaciclogênese (Bates, 2007). Promastigotas infectantes migram para a probóscide e no momento de um novo repasto sanguíneo essas formas são regurgitadas, iniciando o ciclo em hospedeiros vertebrados.

Todos os estágios de diferenciação morfológica representam uma complexa rede de mecanismos evolutivos do parasito, os quais podem apresentar variações relacionadas ao gênero e espécies envolvidas e contribuem diretamente para o sucesso de transmissão das leishmanioses. No hospedeiro vertebrado suscetível as promastigotas são fagocitadas por neutrófilos, células dendríticas e principalmente macrófagos no tecido dérmico (Borghi et al., 2017). Após a fagocitose, no interior de macrófagos as promastigotas se diferenciam em amastigotas e se proliferam por divisão binária (Borghi et al., 2017; Harhay et al., 2011). A intensa proliferação no interior celular rompe sua membrana, liberando amastigotas que serão fagocitadas por outros macrófagos. Os parasitas disseminam-se através dos sistemas vascular e linfático e infectam outros macrófagos no sistema retículo-endotelial, resultando na infiltração da medula óssea, aumento de fígado,

baço e linfonodos (Chappuis et al., 2007). As principais etapas envolvidas no ciclo biológico da LV estão representadas na Figura 2.

Fonte: Harhay et al., 2011.

Figura 2 – Ciclo biológico da LV. Esquema representativo das fases restritas ao inseto vetor e a hospedeiros vertebrados.

3.4 Interação parasita, vetor e resposta imune

Além das alterações morfológicas descritas anteriormente, os parasitas *Leishmania spp.* sofrem alterações bioquímicas através da expressão de moléculas, o que influencia diretamente sua capacidade de sobrevivência e multiplicação (Turco, Descoteaux, 1992; Naderer et al., 2004). A manutenção de parasitas *Leishmania spp.* em seus hospedeiros, depende de estratégias de sobrevivência que envolvem a participação de glicoconjugados, que fazem parte do glicocálice e formam uma “barreira” de proteção (Mukhopadhyay, Mandal, 2006). A composição molecular da superfície de parasitas

Leishmania spp. tem importante papel na evasão e/ou modulação da resposta imune de hospedeiros suscetíveis e variam de acordo com seu estágio de desenvolvimento (Ferguson et al., 1993). Para se protegerem de condições adversas, o glicocálice de promastigotas e amastigotas são compostos por GPI, LPG, GILP e PPG (Mendonça-Previato et al., 2005). Carboidratos e açúcares ligados a membrana celular também desempenham um importante papel na sobrevivência e proliferação dos parasitas (Mukhopadhyay, Mandal, 2006). As moléculas mais abundantes no glicocálice de *Leishmania spp.* é o LPG (Nikolaev, Sizova, 2011) e a gp63 (Olivier et al., 2005), as quais influenciam diretamente para a virulência do parasito. Essas moléculas apresentam variáveis níveis de expressão relacionados aos estágios morfológicos do parasito, vale ressaltar que a expressão é diminuída em amastigotas (McConville et al., 1995). O LPG e a gp63 impedem a ligação de complemento que agem na lise celular, favorecendo a opsonização e internalização do parasita (Brittingham et al., 1995; Olivier et al., 2005).

A resistência e suscetibilidade à LV têm sido relacionadas a uma série de fatores genéticos que influenciam tanto na gravidade da doença como no seu prognóstico, em que a resposta imune do hospedeiro é crucial na determinação do desfecho clínico da infecção (Saporito et al., 2013). Tanto a imunidade inata, como a adaptativa desempenham papéis importantes na defesa contra *Leishmania spp.* (Saporito et al., 2013). Após a transmissão de promastigotas para hospedeiros suscetíveis, rapidamente as mesmas interagem com opsoninas séricas, as quais ativam o sistema complemento e processos de opsonização via C3 e de ação lítica (Domínguez et al., 2003; Mougneau et al., 2011). As promastigotas internalizadas se diferenciam em amastigotas no interior de vacúolos parasitóforos de macrófagos e se multiplicam (McConville, Naderer, 2011).

No interior de macrófagos, citocinas e células do sistema imune inato participam ativamente na proteção inicial contra a LV e entre os processos envolvidos destacam-se a produção de IL-12, apresentação de antígenos por células dendríticas e a ativação de células NK, as quais iniciam a produção de IFN- γ e são capazes de limitar a propagação parasitária até a formação de uma resposta específica de células T (Murray et al., 2005; Saporito et al., 2013; Rodrigues et al., 2015). Macrófagos e células dendríticas, desempenham papéis importantes nos mecanismos de defesa contra as infecções por *Leishmania spp.* e apesar da função apresentadora de antígenos exercida por estes tipos celulares, individualmente ocorrem diferenças funcionais nos processos desencadeados (Kautz-Neu et al., 2012).

As respostas celulares eficazes para combater a LV dependem da formação de um tipo de resposta imune efetiva (TH1, TH2, TH3, Treg e TH17), que seja capaz de ativar efeitos leishmanicidas em macrófagos e monócitos do hospedeiro (Gollob et al., 2014). A diferenciação e o estabelecimento de um tipo de resposta TH durante a LV, depende de fatores como o perfil de citocinas presente durante a ativação inicial de células T CD4, a genética do hospedeiro e estímulos antigênicos (Gollob et al., 2014). Células T CD4 se diferenciam para um dos perfis TH e produzem perfis de citocinas específicos, que atuarão sobre macrófagos e monócitos dos hospedeiros e isso determinará o controle ou não da infecção (Gollob et al., 2014). As citocinas IL-12 e IL-4 desempenham um importante papel durante a resposta imune na LV, são responsáveis pela diferenciação celular e polarização de células T CD4 nos perfis TH1 e TH2, respectivamente (Rodrigues et al., 2015). Estudos relacionados aos perfis TH1 e TH2 durante a LV mostram-se mais executados e pesquisados, em relação a outros perfis TH durante a doença.

As citocinas IFN- γ e TNF- α , são predominantes para o perfil TH1, que em geral evolui para o controle da infecção, enquanto que as citocinas IL-4, IL-5 e IL-10, são predominantes para o perfil TH2, perfil relacionado com a instalação e progressão da infecção (Gollob et al., 2014). Embora as respostas TH1 e TH2 polarizadas possam ser produzidas em animais e relacionadas com resistência e susceptibilidade, respectivamente (Sacks, Noben-Trauth, 2002), em doentes com infecções clinicamente aparentes, as respostas do tipo TH1 e TH2 não são caracteristicamente polarizadas, uma vez que são detectadas ambas as citocinas ativadoras, como IFN- γ e IL-12, e supressoras, como IL-10, IL-13, IL-4 e TGF- β (Hailu et al., 2004). Outra citocina importante é o fator de necrose tumoral TNF- α , pois sua presença e a regulação de seus níveis em órgãos como baço e fígado é essencial para o controle ou progressão da infecção focal (Stanley, Engwerda, 2007).

Hospedeiros suscetíveis à LV apresentam altos níveis de anticorpos IgG específicos, os quais não são efetivos na resposta imune durante a infecção e não impedem a reativação da doença (Murray et al., 2005; Mougneau et al., 2011). Durante a LV ativa em homens e cães, ocorre a presença de altos níveis de anticorpos IgG, IgE, IgA e IgM (Anam et al., 1999; de Freitas et al., 2012). Entretanto, trabalhos experimentais realizados nas últimas décadas direcionaram a uma visão predominante sobre o tema, a qual considera que células B e anticorpos, são de importância mínima para a imunidade protetora durante a LV (Kumar, Nylén, 2012; Rodrigues et al., 2016).

Apesar da atribuição de função não protetora aos anticorpos durante a LV, em fase crônica da doença os mesmos podem ter papel significativo na patogenia, através de processos de opsonização de amastigotas, formando imunocomplexos (Rodrigues et al., 2016). A fagocitose desses imunocomplexos formados por amastigotas e anticorpos específicos na LV promovem a produção de IL-10 por macrófagos e desativam a produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas (Miles et al., 2005).

Em hospedeiros suscetíveis, como tentativa de controle da infecção e neutralização do parasita, ocorre uma ativação de linfócitos B com alta produção de anticorpos IgG, porém mesmo em concentrações elevadas, a presença desta imunoglobulina não confere proteção contra infecção, a falha no controle e a hipergamaglobulinemia, podem desencadear a formação de imunocomplexos, que por sua vez podem gerar agravamento da doença através da deposição em vários órgãos e tecidos (Galvão-Castro et al., 1984). A formação de imunocomplexos circulantes acontece através da interação entre anticorpos específicos produzidos como um mecanismo de defesa do sistema imune e antígenos, estes anticorpos agem na tentativa de neutralização e eliminação de microrganismos. Estudos recentes vêm tentando elucidar o papel de imunocomplexos na patologia da LV, entretanto a maioria é direcionada para a importância dos imunocomplexos na progressão e instalação da doença (Miles et al., 2005).

Paralelamente ao papel não protetor atribuído aos anticorpos, hipóteses de que os mesmos podem atuar na proteção não podem ser descartadas, já que anticorpos específicos podem ser capazes de neutralizar fatores de virulência do parasito (Shreffler et al., 1993). A ativação de células B e a produção de anticorpos, também foi descrita como fator protetor em co-infecção com *Leishmania amazonensis* e *Leishmania major* (Gibson-Corley et al., 2012). O mecanismo que induz a ativação policlonal de células B e consequentemente o elevado nível de anticorpos circulantes durante a LV ainda não é compreendido, mas uma possibilidade é que componentes do parasito modulem especificamente a resposta imunitária do hospedeiro (Campos-Neto, Bunn-Moreno, 1982). A modulação antigênica específica utilizada na produção de anticorpos durante a LV é raramente explorada, em geral relatos da especificidade de anticorpos é restrita a trabalhos de detecção, os quais identificam classe e subclasse desses anticorpos.

3.5 Diagnóstico

Os métodos disponíveis para o diagnóstico da LV envolvem várias técnicas, como a demonstração do parasito em tecidos, cultura *in vitro*, inoculação animal, técnicas sorológicas e moleculares (Savoia, 2015). As metodologias empregadas no diagnóstico laboratorial da LV utilizam técnicas diretas (detecção do parasita) e indiretas (detecção de anticorpos) (Maia, Campino, 2008).

3.5.1 Métodos parasitológicos

O diagnóstico parasitológico é realizado através da demonstração da forma amastigota em tecidos e outras amostras, o que permite o isolamento do parasito e a manutenção de formas promastigota em culturas ou sua detecção por ensaios moleculares (Sakkas et al., 2016). Devido à sua alta especificidade, estes métodos são considerados o padrão-ouro no diagnóstico de LV (Sakkas et al., 2016).

As amostras de uso comum para a observação de amastigotas são aspirados esplênicos ou de medula óssea, mas também podem ser usadas biópsias hepáticas, nódulos linfáticos e sangue periférico (Elmahallawy et al., 2014). A especificidade do método é alta, enquanto a sensibilidade varia de acordo com a amostra utilizada, em que para amostras de medula óssea a sensibilidade da técnica é de cerca de 60 – 80% (Elmahallawy et al., 2014) e para aspirados de baço é de 93% - 99% (Chappuis et al., 2007), vale ressaltar que parâmetros de sensibilidade podem variar de acordo com a experiência do profissional responsável pela execução do teste. No entanto, esses procedimentos são desconfortáveis, potencialmente perigosos e exigem habilidade considerável (Singh, Sundar, 2015).

O isolamento de parasitos e manutenção *in vitro* pode ser realizado a partir de aspirados, o que pode melhorar a sensibilidade deste método diagnóstico, porém apresenta como desvantagem o longo tempo de manutenção e em geral é restrito a laboratórios de pesquisa (Elmahallawy et al., 2014; Singh, Sundar, 2015). As culturas são mantidas entre 22 e 28 °C e examinadas semanalmente durante 4 semanas para a

verificação de promastigotas, quando positivas as culturas são mantidas por passagem semanal para meio fresco (Sundar, Rai, 2002). Parasitos isolados a partir de culturas, podem ser mantidos *in vivo* em modelos animais suscetíveis a LV.

3.5.2 Métodos moleculares

As limitações demonstradas pelas técnicas convencionais, tanto parasitológicas como sorológicas, levaram os cientistas a uma exploração crescente da biologia molecular como complemento de estudos, além de uma alternativa para o diagnóstico preciso das leishmanioses (de Paiva-Cavalcante et al., 2015). A praticidade, segurança e confiabilidade das ferramentas moleculares, além do amplo número de aplicações e dos resultados promissores, contribuíram para a aceitação contínua desses métodos em laboratórios de rotina e de referência em todo o mundo (de Paiva-Cavalcante et al., 2015).

O diagnóstico molecular utiliza a técnica de reação em cadeia da polimerase PCR, que é considerada tecnologia promissora para a detecção, caracterização genética e quantificação de protozoários (Antinori et al., 2009). Esta técnica permite a utilização de amostras de sangue periférico, soro, pele, urina, tecidos, e materiais arquivados já processados e fixados quimicamente (Srividya et al., 2012), apresentando alta sensibilidade e especificidade, porém apresenta como desvantagem a necessidade de equipamentos e profissional treinado, características que restringem o método a hospitais e grandes centros de pesquisa, não sendo útil na pesquisa de campo (Chappuis et al., 2007). Métodos moleculares como a técnica de PCR oferecem um conjunto de vantagens em sua aplicação, como por exemplo, a capacidade de identificação de pacientes com infecção presente ou passada, atuando ainda no monitoramento de tratamento na LV (Jirkù et al., 2006). Atualmente variações da técnica de PCR também são utilizadas no diagnóstico da LV, como por exemplo a técnica de PCR quantitativo (qPCR) (Zacarias et al., 2017).

3.5.3 Métodos sorológicos

Os testes sorológicos são baseados na detecção da resposta imune humoral específica desenvolvida durante a LV, os quais utilizam diferentes antígenos para a detecção de anticorpos anti-leishmania. Testes sorológicos são cada vez mais usados para o diagnóstico da LV, principalmente para detecção de anticorpos específicos e em geral apresentam excelentes níveis de sensibilidade e especificidade (Kumar et al., 2001). Apesar dos mesmos serem considerados promissores, um teste sorológico de alta precisão mostra-se ainda como um problema para a comunidade médica e coordenadores de programas de saúde, já que a detecção de anticorpos pode ser interpretada de forma equivocada quando não considerada características da doença sintomática, assintomática e de pós tratamento (Srivastava et al., 2011; Srividya et al., 2012). Apesar de o teste de referência para o diagnóstico da LV ser o exame parasitológico direto, a sorologia é considerada importante ferramenta, e é capaz de detectar altos níveis de anticorpos circulantes tanto na infecção natural, como na experimental (Brustoloni et al., 2007; dos Santos et al., 2008; Moreira et al., 2012).

3.5.3.1 Antígenos

Perfis de anticorpos específicos apresentam mudanças associadas aos diferentes estágios de progressão da doença indicando maior expressão de determinadas proteínas associadas a perfis sintomáticos, assintomáticos e de cura em um hospedeiro, onde o diagnóstico deve ser analisado em um contexto que leve em consideração a possibilidade do uso de antígenos específicos (Coelho et al., 2012).

O registro na literatura da utilização de formas amastigotas em métodos diagnósticos é escasso devido às dificuldades relacionadas a sua obtenção, entretanto o cultivo *in vitro* em células pode ser usado e estas formas utilizadas como antígeno para a detecção de anticorpos (Fernández-Pérez et al., 1999). Outra possibilidade é o cultivo extracelular, no qual a aplicação de fatores específicos como temperatura e pH induzem a

transformação morfológica de promastigotas, originando amastigotas axênicas (Gupta et al., 2001).

Promastigotas íntegras podem ser usadas como antígeno em RIFI e apresentam como vantagem seu fácil preparo, o qual dispensa etapas trabalhosas de obtenção e preparação (Mohammed et al., 1985). Entretanto, a escolha de testes que utilizam formas promastigotas íntegras, deve ser realizada com cautela, pois populações assintomáticas podem apresentar resultados falsos negativos devido à baixa sensibilidade do teste (Mettler et al., 2005). Formas íntegras de promastigotas também são utilizadas em DAT, onde as mesmas são tratadas e submetidas a diluições de soros, apresentando bons níveis de sensibilidade e especificidade (Babakhan et al., 2009).

A utilização de extrato antigênico total obtido de culturas de promastigotas é empregada em diferentes técnicas sorológicas para a detecção de anticorpos específicos e apresenta como principal vantagem sua fácil manutenção e obtenção de grandes quantidades do antígeno (Cândido et al., 2008). O extrato antigênico pode ser obtido nas formas total ou parcial por diferentes procedimentos laboratoriais, o que pode ter como consequência, variações em seus níveis de sensibilidade e principalmente de especificidade (Gomes et al., 2008). O extrato antigênico total de promastigotas é amplamente usado em testes laboratoriais para o diagnóstico da LV, principalmente em ensaios imunoenzimáticos, como o ELISA (Sundar, Rai, 2002). Ensaios convencionais baseados na utilização de antígenos totais de *Leishmania ssp.* apresentam em geral alta sensibilidade, porém podem apresentar problemas relacionados à baixa especificidade levando a resultados falsos positivos devido à reatividade cruzada com anticorpos não específicos, principalmente em áreas endêmicas à parasitas da família *Tripanosomatidae* (Mendes et al., 2007; Alves et al., 2012).

O estudo de moléculas antigênicas na LV está demonstrado em trabalhos relacionados à resposta imune, desenvolvimento de vacinas e testes diagnósticos. Como relatado anteriormente, o estágio morfológico do parasita é uma característica que apresenta influência nos níveis de expressão de moléculas, o que impacta diretamente na disponibilidade quantitativa de moléculas antigênicas, como exemplo, podem ser citados a proteína A2 presente em amastigotas e o LPG em promastigotas (Coelho et al., 2012). A capacidade antigênica de proteínas de promastigotas e amastigotas, está relatada em testes que avaliaram a capacidade de indução de resposta imune frente a estes antígenos

e em estudos de imunização durante a LV, estas proteínas são: A2 (Duarte et al., 2016), PSA-2 (Handman et al., 1995), KMP11 (Nasiri et al., 2016), NH36 (Barbosa Santos et al., 2017), entre outras.

A antigenicidade de moléculas também está demonstrada através da detecção de anticorpos específicos em testes diagnósticos, entre os quais destacam-se k39, HSP70, HSP83 e gp63 (Siripattanapipong, 2017). Outra forma de avaliação antigênica é através do uso de antígenos recombinantes, os quais encontram-se em expansão e o mais estudado e evidenciado nos últimos anos é o rk39 (Porrozi et al., 2007). Outros antígenos recombinantes são usados em testes sorológicos para a LV, entre os quais destacam-se o rk28 (Vaish et al., 2012), rHsp70 (Talmi-Frank et al., 2006), rA2 (Passos et al., 2005), rGBP (Maalej et al., 2003), rgp63 (Morales et al., 1997), entre outros.

A presença de carboidratos antigênicos de *Leishmania ssp.* está relatada na literatura (Silveira, Kemmelmeier, 1995; Mukhopadhyay, Mandal, 2006; Datta et al., 2015). A reatividade específica de anticorpos anti-leishmania à carboidratos foi demonstrada em estudo que avaliou o potencial antigênico de carboidratos de *Leishmania braziliensis* (Silveira, Kemmelmeier, 1995). Entretanto, a antigenicidade destas moléculas é pouco explorada, principalmente para aplicação em testes para o diagnóstico laboratorial da LV. Muitas dificuldades estão associadas a utilização desses antígenos em testes laboratoriais, entre as quais destacam-se o isolamento, a caracterização e a quantificação dos mesmos.

3.5.3.2 Detecção de anticorpos

O ELISA é um teste imunoenzimático utilizado na detecção de anticorpos (método indireto) e antígenos (método direto), seu resultado é expresso quantitativamente, através da leitura de densidade ótica de amostras testadas, classificando-as como negativas, indeterminadas e positivas através do estabelecimento de faixas e limites de reatividade calculados a partir da padronização específica para cada conjunto diagnóstico produzido e comercializado (Solano-Galeno et al., 2009).

A primeira descrição da utilização de ELISA no diagnóstico da LV foi realizada por Hommel em 1978, em amostras humanas e caninas previamente testadas por RIFI, em que a comparação dos resultados indicou bons índices de concordância entre as técnicas (Hommel et al., 1978). Imunoglobulinas como IgM, IgE e IgA, e ainda subclasses de IgG podem ser detectadas por ELISA e seus níveis podem estar associados a diferentes estágios da LV (Elassad et al., 1994; Anan et al., 1999; de Freitas et al., 2012). Variações são encontradas na metodologia convencional empregada na realização de ELISA no diagnóstico da LV, entre as quais destacam-se a determinação de avides de IgG (Redhu et al., 2006).

A técnica de dot ELISA, também pode ser utilizada na detecção de anticorpos anti-leishmania como demonstrado por Pappas et al. em 1985, através da adsorção de formas promastigotas íntegras em membrana de nitrocelulose. Parâmetros de qualidade, como sensibilidade e especificidade em dot ELISA foram avaliados através da reprodutibilidade interteste entre métodos como RIFI, ELISA e DAT, em amostras positivas e negativas para LV e outras doenças parasitárias e afirmou o potencial positivo de aplicação desse teste (Senaldi et al., 1996). Apesar de se mostrar como um teste promissor, há relatos de baixa especificidade de resultados atribuídos a reatividade cruzada com anticorpos específicos a outros tripanossomatídeos (Pappas et al., 1985). As variações relacionadas à especificidade e sensibilidade da técnica de dot ELISA para o diagnóstico da LV, estão associadas principalmente ao antígeno utilizado e pode ser minimizada pela escolha de antígeno solúvel em alternativa a utilização de formas promastigotas íntegras, resultando em maior reprodutibilidade de resultados entre métodos como RIFI e DAT (Vercammen et al., 1998).

A técnica de *Western Blot* é considerada extremamente sensível e específica, a qual fornece detalhes sobre a constituição antigênica do agente analisado através da detecção de anticorpos e revelação por conjugados específicos em procedimento considerado simples (Kar, 1995). O uso da técnica de *Western Blot* para o diagnóstico da LV está descrito em estudo que avaliou a detecção de anticorpos anti-leishmania em amostras de cães com infecção natural e experimental e mostrou maior especificidade em relação à técnica de RIFI, tendo como consequência a diminuição de resultados falsos-positivos (Vargas-Duarte et al., 2009). Apesar da alta especificidade da técnica, este método demanda estrutura e tempo para sua realização e em geral está restrito a centros de pesquisa.

O uso da RIFI para o diagnóstico da LV consiste na detecção de anticorpos através de conjugado marcado com fluoresceína ligado a uma imunoglobulina espécie-específica (Ministério da Saúde, 2006). Seu resultado é expresso em títulos determinados pela diluição da amostra, sua interpretação recomenda que na presença de títulos baixos seja realizado um novo exame após 30 dias (Ministério da Saúde, 2016). A RIFI pode ser utilizada como um teste confirmatório, servindo como contraprova para o teste de ELISA positivo, já que os dois testes são baseados em princípios distintos (Gontijo, Melo, 2004; Távora et al., 2007). A utilização da RIFI no diagnóstico da LV vem sendo constantemente questionada em relação a sua capacidade real de diagnóstico, ou seja, na identificação e separação de resultados verdadeiros positivos e verdadeiros negativos, em que resultados falsos positivos podem estar associados a utilização de antígenos não específicos (*L. (L.) major*) e reatividade cruzada com outras zoonoses (Alves, Bevilacqua, 2004). A aplicação da RIFI no diagnóstico da LV deve basear-se em aspectos como as variáveis do teste de escolha, como por exemplo, o ponto de corte utilizado e os valores preditivos do teste em questão, definindo inicialmente o objetivo final a ser elucidado, considerando aspectos como sensibilidade e especificidade, minimizando a presença de resultados falsos positivos ou negativos (Silva et al., 2009).

A imunocromatografia, também conhecida como teste rápido é baseado na detecção de anticorpos específicos em amostras de soro, utilizando como suporte sólido do teste, membranas de nitrocelulose (Singh, 2006; Sivakumar, 2006). Este método, apresenta como vantagem sua aplicação em estudos de campo e em áreas que apresentam limitações estruturais, seu resultado é expresso qualitativamente dispensando o uso de equipamentos e é obtido por meio de visualização dos resultados em membrana de nitrocelulose, os principais antígenos comerciais disponíveis para estes testes são o rK39 e o rKE16 (Singh, 2006; Sivakumar, 2006). O uso dos testes imunocromatográficos é de grande importância para o auxílio no diagnóstico da LV, entretanto sua utilização deve ser sempre feita em conjunto com a avaliação clínica (Cunningham, 2002).

Outro teste utilizado na detecção de anticorpos na LV é o DAT, que consiste na incubação de amostras de soro com promastigotas de leishmania marcadas com corante e incubação por pelo menos 16 horas, este período de incubação possibilita a reação antígeno-anticorpo, identificando o processo pela presença ou ausência de aglutinação, este teste tem como vantagem bons níveis de sensibilidade e especificidade, porém tem a

desvantagem de longo período de incubação e o fato de a técnica ser relativamente dispendiosa (Srivastava et al., 2011).

3.5.3.3 Detecção de antígenos

Em algumas situações, a detecção de anticorpos anti-leishmania pode não ser suficiente para o diagnóstico laboratorial da doença, principalmente quando não há associação de resultado positivo e a presença de sinais clínicos, nestes casos o mais indicado seria a detecção de antígenos circulantes (Davies et al., 2003). Testes de detecção de antígenos são mais específicos que os testes de detecção de anticorpos, já que não ocorre reatividade cruzada e os mesmos distinguem infecções presentes de infecções passadas (Chappuis et al., 2007). Os testes de detecção de antígenos oferecem uma alternativa aos métodos de detecção de anticorpos, especialmente em pacientes imunocomprometidos, como em pacientes com coinfeção leishmania-HIV, os quais apresentam produção de anticorpos deficiente (Riera et al., 2004; Sundar et al., 2005).

Apesar de todas as vantagens relacionadas a detecção de antígenos, para o diagnóstico laboratorial da LV é um método pouco explorado. Essa condição pode estar associada a dificuldades relacionadas a detecção de antígenos livres em amostras de soro, em que possíveis interferentes como a presença de imunocomplexos circulantes (de Carvalho et al., 2013) e ausência de antígenos livres devido a ligação competitiva de anticorpos (Sing, Sivakumar, 2003).

Alternativamente ao uso de amostras de soro, amostras de urina podem ser usadas para detecção de antígenos para o diagnóstico da LV através de um teste de aglutinação com partículas de látex (Katex) (Rijal et al., 2004; Sundar et al., 2007). Um estudo demonstrou a caracterização parcial de antígenos detectados em urina, os quais foram identificados como carboidratos antigênicos de baixo peso molecular (5-20 kDa) (Sarkari et al., 2002).

A detecção de antígenos circulantes em amostras de soro para o diagnóstico da LV está relatada em teste imunocromatográfico e apresentou 95,8% e 98,7% de sensibilidade e especificidade, respectivamente (Gao et al., 2015). A detecção indireta de

antígenos também pode ser realizada através da determinação de imunocomplexos circulantes em amostras de soro (de Carvalho et al., 2013). Entretanto, a detecção de antígenos em amostras de soro para o diagnóstico da LV é pouco explorada (Ferrua et al., 2009).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras

Amostras de soro de hamster com infecção experimental, cão e homem com infecção natural e coelho imunizado contra antígenos de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* foram utilizadas em nossos experimentos. Essas amostras, pertencem ao banco de amostras do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Todos os procedimentos relacionados a obtenção, uso e manipulação das amostras foram aprovados anteriormente pelo Comitê de Pesquisa e Ética e Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (no. CEP-IMT/002/29042008). O uso de amostras de cães foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais (no. CEP-ICB 569/12). O uso de amostras humanas foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisas em Seres Humanos (no. CEP-ICB 1098). Todos os aspectos relacionados a manutenção e manipulação de animais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética em pesquisa do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e Comissão de Ética e Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (no. CEP-ICB 182/2012 /no. CEP-IMT/164).

Foram testadas em nossos experimentos 3 perfis de amostras de soro, estes grupos foram nomeados como infecção experimental, infecção natural e imunização. Para o grupo de infecção experimental foram utilizadas 82 amostras de soro de hamster (*Mesocricetus auratus*), entre as quais, 72 amostras são de animais experimentalmente infectados e 10 amostras de animais negativos. Para o grupo de imunização foram testadas 3 amostras de soro de coelhos da raça *New Zealand*, em que 2 amostras foram obtidas de animais imunizados e 1 amostra de coelho negativo. Para o grupo de infecção natural foram testadas 101 amostras de soro de cão, sendo 100 amostras positivas e 1 negativa e 5 amostras humanas positivas e 1 amostra negativa. As amostras negativas foram usadas como controle em nossos experimentos, importante ressaltar que a disponibilidade quantitativa dessas amostras foi de pelo menos 10 por grupo, exceto para o grupo imunizado (somente 1 amostra negativa) e o emprego quantitativo do número de amostras variou de acordo com o experimento realizado.

Amostras de soro de cães com infecção natural foram fornecidas pelo laboratório de Parasitoses Sistêmicas do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, estas amostras são provenientes de inquéritos sorológicos realizados em cidades como Bauru, Caraguatatuba e Itupeva. Amostras humanas são provenientes da cidade de Araguaína – Tocantins, área considerada endêmica para LV e foram gentilmente cedidas pela Dra. Anette Kelsei Partatta. As amostras caninas e humanas foram previamente testadas por técnicas como ELISA e RIFI, o que possibilitou a classificação das mesmas como positivas e negativas. Todas as amostras de soro foram armazenadas à -20 °C.

4.2 Manutenção *in vivo* de parasitos *L. (L.) infantum chagasi*

A manutenção de parasitos de *L. (L.) infantum chagasi* CEPA (MHOM/1972/LD) foi realizada através de infecção experimental em hamster. Grupos de 10 animais foram inoculados por via intraperitoneal com 5×10^7 formas amastigotas em solução salina, obtidas de homogenatos de baços de animais anteriormente infectados. O grupo experimentalmente infectado foi mantido por 60 dias e eutanasiados por narcose em câmara de CO₂, imediatamente após esse processo os animais foram submetidos a retirada de baço e fígado, após confirmação de infecção e estimativa de carga parasitária, os órgãos foram preparados para inóculo de novo grupo para manutenção parasitária e/ou para isolamento de formas promastigotas em culturas.

4.2.1 Determinação de carga parasitária em hamster

A estimativa de carga parasitária em hamsteres experimentalmente infectados com formas amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, foi realizada de forma individual utilizando o método de Stauber e colaboradores (Ott et al., 1967). Para a determinação de carga parasitária em baço ou fígado, foram realizados *imprints* (marcações do órgão em lâmina de vidro). As lâminas foram fixadas em metanol absoluto e coradas com solução de Giemsa em tampão borato de sódio 0,1 M. A determinação de carga parasitária foi

realizada através da observação microscópica do número de formas amastigotas e células nucleadas nos *imprints* de baço ou fígado. Os resultados foram calculados conforme a fórmula a seguir:

$$\left(\frac{n^{\circ} \text{ de amastigotas}}{1000 \text{ células nucleadas}} \right) \times \text{peso órgão (miligramas)} \times 2 \times 10^4$$

4.3 Manutenção *in vitro* de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*

Formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* foram isoladas a partir de homogenatos de baços de hamsteres experimentalmente infectados como descrito anteriormente. O isolamento ocorreu em meio sólido 199 (Sigma®) suplementado com hemina, bicarbonato de sódio (Sigma®) e HEPES (Sigma®) em placas de petri, onde o homogenato de baço foi incubado com 1 mL de soro fetal bovino (Cultilab®) e mantido em estufa com temperatura média de 24 °C. As placas foram mantidas e acompanhadas diariamente até a o surgimento de formas promastigotas (período médio de 1 semana). A cada 2 dias 1 mL de soro fetal bovino foi adicionado a cultura para evitar seu ressecamento. Após a confirmação da presença de formas promastigotas, uma alíquota de aproximadamente 500 µL do sobrenadante do meio sólido foi utilizado como matriz para a manutenção dos parasitos em meio líquido 199 (Sigma®) suplementado como descrito anteriormente. Essas culturas foram mantidas em estufa com temperatura média de 24 °C, em garrafas com volume total de 10 mL, contendo 10% de soro fetal bovino e 5% de urina humana filtrada, os repiques ocorreram a cada 4 dias.

4.4 Produção de extrato antigênico total

Foram utilizados dois métodos para obtenção do extrato antigênico total de formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, a comparação desses resultados permitiu

identificar aspectos como viabilidade e rendimento das amostras. Culturas de promastigotas foram utilizadas para a obtenção de extrato antigênico total, em que foram utilizados os volumes totais de garrafas, concentrados por centrifugação a 2.500 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspensionado em 10 mL de tampão PBS estéril, seguido de nova centrifugação a 2.500 rpm por 10 minutos. Os métodos usados foram feitos como descrito a seguir:

4.4.1 Tampão de lise

Para o preparo do extrato antigênico total, o concentrado de promastigotas foi ressuspensionado em aproximadamente 10 volumes de tampão de lise (Tris- ácido clorídrico 0,05 M pH 6,0, uréia 4 M, EDTA 5 mM, PMSF 0,5 mM, Cloreto de potássio 0,1 M e *sodium dodecyl sulfate* – SDS 0,5%), seguido de homogeneização constante por 5 minutos, aquecimento à 65 °C por 15 minutos e centrifugação à 10.000 rpm, com utilização do sobrenadante. A quantificação proteica foi realizada e alíquotas foram armazenadas à -80 °C.

4.4.2 Sonicação

Concentrados de promastigotas foram submetidos a sonicação (Sonic Dismembrator, Quigley-Rochester® Inc., USA), a 40 ciclos por 5-10 períodos de 30 segundos em banho de gelo, até lise completa das promastigotas. Em seguida, acrescentou-se solução de cloreto de sódio 0,3 M para isotonizar a suspensão, seguido de centrifugação a 10.000 rpm por 30 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi utilizado como antígeno (Camargo et al., 1978). A quantificação proteica foi realizada e alíquotas foram armazenadas à -80 °C.

4.5 Quantificação de proteínas do extrato antigênico total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*

A quantificação de proteínas foi realizada de acordo com o método descrito por Bradford (1976). Foram utilizados volumes de 20 µL de extrato antigênico total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, adicionados a volumes de 1 mL de reagente de Bradford e 50 µL de hidróxido de sódio 1 M. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em filtro 595 nm e a quantificação individual das amostras foi calculada com base em curva de calibração pré-determinada (albumina) para cada lote de reagente de Bradford utilizado.

4.6 Caracterização eletroforética de proteínas do extrato antigênico total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*

A verificação da presença de proteínas do extrato antigênico total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* foi realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo Laemli (1970). Foi utilizado um gel de poliacrilamida para separação (10%) e gel de empilhamento (4%). As amostras foram homogeneizadas volume a volume (v/v) em tampão de amostra (Tris 60 mM pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,01% e β-mercaptoetanol), em seguida aquecidas a 99 °C por 4 minutos e aplicadas no gel, juntamente com um padrão de peso molecular Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific®, EUA). A corrida eletroforética foi realizada a 100 mA por aproximadamente 2 horas em tampão de corrida (tris 3%, SDS 1% e glicina 14%). Após a eletroforese, o gel foi destinado a coloração ou a transferência. Para a coloração com Comassie Blue (Biorad® Laboratories), o gel foi incubado com tampão de fixação (metanol 45% e ácido acético 10%) por 1 hora, seguido de incubação com solução de Comassie Blue (0,1% de Comassie Blue G-250, 25% de metanol e 5% de ácido acético) sob agitação e incubação *overnight*. Após a coloração, o gel foi submetido a várias lavagens com solução descorante (ácido acético 5%, metanol 10% e água ultrapura), até a visualização das

bandas. Para a coloração com Prata, o gel foi incubado com solução de fixação em duas etapas: 1- (400 mL de metanol 40% e ácido acético 10%) por 30 minutos e 2- (400 mL de etanol 10% e ácido acético 5%) por 15-30 minutos. Em seguida o gel foi incubado em 200 mL de solução de bicromato de potássio 0,0034 M + ácido nítrico 0,0032 N, com posterior lavagem com água destilada e incubação em 200 mL de solução de nitrato de prata 0,012 M por 15-30 minutos. O gel foi lavado com água destilada e incubado com solução de carbonato de sódio 0,28 M (3%) e formaldeído 1,85%. A reação foi interrompida através da adição de ácido acético 5%.

4.7 Ensaio de antigenicidade do perfil eletroforético por *Western-Blotting*

O perfil eletroforético do extrato antigênico total de formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, foi transferido para membranas de nitrocelulose (Millipore®) utilizando sistema úmido de transferência (BioRad® Laboratories), sob corrente elétrica constante de 10 volts por 40 minutos em tampão de transferência (tris 250 mM, glicina 192 mM e metanol 20%), como descrito por Towbin e colaboradores (1979). Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com tampão PBS 10 mM contendo 5% de leite desnatado Molico® por 1 hora em temperatura ambiente sob agitação. Após o bloqueio, as membranas foram submetidas a detecção de anticorpos IgG anti-leishmania em amostras de soro dos grupos descritos anteriormente, usando diluições adequadas em tampão PBS 10 mM com incubação *overnight* sob agitação à 4 °C, após esse período, as membranas foram incubadas com conjugados espécie-específicos marcados com peroxidase (anti-hamster IgG; anti-Rabbit IgG; anti-Dog IgG; anti-Human IgG - Sigma®) em diluições adequadas por 1 hora em temperatura ambiente sob agitação. A revelação da membrana foi realizada com solução de DAB (10 mg de DAB, 10 mL de PBS e 15 µL de H₂O₂), interrompida com a adição de água destilada. Entre as etapas, as membranas foram lavadas 3 vezes durante 5 minutos com solução de PBS –Tween 20 a 0,05%.

4.8 Detecção de anticorpos IgG anti-leishmania em ELISA

O teste foi realizado de acordo com metodologia descrita por Venkatesan e Wakelin, 1993. Placas de poliestireno com 96 poços (Costar®) foram sensibilizadas com extrato antigênico total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* com 10 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,1 M pH 9,5, com incubação *overnight* em câmara úmida a 4 °C. Após a sensibilização as placas foram bloqueadas com 0,3% de solução de leite desnatado Molico® em PBS 0,01 M e Tween 20 0,05% (PBSTL) por 1 hora a 37 °C. Em seguida foram aplicados 100 µL/poço de soro (duplicata) em diluições (hamster 1/100; cão, homem e coelho 1/200) com incubação a 37 °C por 1 hora, em seguida os poços receberam 100 µL/poço de conjugado espécies-específicos marcados com peroxidase (anti-hamster IgG; anti-Rabbit IgG; anti-Dog IgG; anti-Human IgG - Sigma®) em diluições adequadas com incubação por 1 hora a 37 °C. A reação foi revelada através da adição de 100 µL/poço de solução de OPD (ofenilodiamina 1 mg/mL, H₂O₂ 0,03% em 20 mL de água destilada) por 30 minutos. A reação foi interrompida através de adição de 50 µL de HCL 4 N e a absorbância de cada poço determinada em leitor de microplacas (Labsystems Multiskan, MS). As placas foram lavadas 5 vezes com PBSTL nos intervalos das etapas mencionadas.

4.9 Seleção de anticorpos IgG por afinidade ao extrato antigênico total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*

4.9.1 Precipitação de proteínas do extrato antigênico total por etanol a frio

Para exclusão de moléculas presentes no tampão de lise utilizado para a obtenção do extrato antigênico total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* interferentes para o processo de acoplamento de moléculas a partículas magnéticas, foram adicionados volumes crescentes de etanol absoluto resfriado à -20 °C. Foram testadas concentrações de 20, 30, 40, 50, 60 e 70%, com incubação *overnight* à -20 °C. Após o período de

incubação as amostras foram centrifugadas à 4 °C por 20 minutos à 4.400 rpm, os precipitados foram ressuspensos em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,1 M pH 9,5. As concentrações utilizadas foram calculadas utilizando como base os volumes de amostra e porcentagens de etanol utilizadas. A escolha de uma concentração ótima de trabalho utilizou como parâmetro a comparação entre a concentração inicial e final, em que a concentração de 60% mostrou-se ideal para o proposto.

4.9.2 Seleção de anticorpos IgG por afinidade ao extrato antigênico total acoplado a partículas magnéticas

Anticorpos IgG anti-leishmania produzidos em coelho imunizado com extrato total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, foram purificados por afinidade ao mesmo perfil antigênico usados na imunização. A purificação por afinidade foi realizada utilizando partículas magnéticas comerciais (MagnaBind™ Amine Derivatized Beads, Thermo Scientific®), as quais apresentam sítios de ligações amina para acoplamento de proteínas via crosslinker BS³ (Thermo Scientific®), que contém um NHS-éster em suas extremidades, para a ligação com aminas primárias presentes em moléculas que foram acopladas (Figura 3).

Fonte: Rodrigues, 2014.

Figura 3 – Representação esquemática da ligação do *crosslinker* BS³ com os sítios de amina primárias das partículas magnéticas via ligação NHS-éster e reação com os grupos amins de moléculas a serem acopladas.

Foram usadas 10⁸ partículas/mL em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,1 M pH 9,5, incubadas com 1 µL de BS³ 1 mM por 20 minutos com agitação constante. Após a etapa de ativação, as partículas foram lavadas 3 vezes com 1 mL de tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,1 M pH 9,5 utilizando estante magnética (Magnex rack Labtest Diagnóstica®, MG, Brasil). As partículas foram ressuspensas em extrato antigênico total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M pH 9,5 previamente precipitado por etanol, seguida de incubação *overnight* à 4 °C sob agitação constante. O acoplamento foi confirmado através de dosagens de proteínas e comparação entre concentração inicial (antes do acoplamento) e final (após acoplamento, com dosagem realizada no sobrenadante). Após o acoplamento, sítios livres de *crosslinker* foram bloqueados por glicina pH 7,5. Em seguida as partículas

foram novamente lavadas e incubadas com soro de coelho imunizado em diluição 1/20 em PBS pH 7,2 com incubação por 1 hora em temperatura ambiente sob agitação constante. A capacidade de ligação e/ou manutenção de afinidade de anticorpos IgG foi avaliada utilizando tampão citrato de sódio pH 5,0 e PBS pH 7,2 como diluentes do soro. Após o período de incubação o sobrenadante foi retirado e as partículas magnéticas lavadas. Para a eluição de anticorpos IgG selecionados, as partículas foram incubadas com 5 mL de tiocianato de amônio 2 M pH 7,5 por 15 minutos em temperatura ambiente sob agitação constante. O sobrenadante foi utilizado e a concentração de anticorpos IgG foi determinada por ultravioleta em filtro 280 nm.

4.10 Detecção de antígenos de *L. (L.) infantum chagasi* em ELISA

Amostras de anticorpos IgG anti-leishmania selecionados por afinidade em pH 5,0 e pH 7,2, foram utilizadas na sensibilização de placas de poliestireno com 96 poços (Costar®) em concentração de 1 µg/mL em tampão carbonato de sódio 0,1 M pH 9,5, com incubação *overnight* em câmara úmida a 4 °C. Após a sensibilização as placas foram bloqueadas com 1% de solução de BSA (Interlab®) em PBS 0,01 M e Tween 20 0,05% por 1 hora a 37 °C. Em seguida foram aplicados 100 µL/poço de diferentes concentrações de extrato antigênico total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* ou diluições de amostras de soro de hamster (1/100) em duplicatas com incubação a 37 °C por 1 hora, em seguida os poços receberam 100 µL/poço de anticorpos IgG anti-leishmania biotinilados em diluição 1/100 com incubação por 1 hora a 37 °C. Em seguida foi adicionado 100 µL/poço de solução de avidina-peroxidase (Sigma®) por 1 hora a 37 °C. A revelação da reação ocorreu através da adição de 100 µL/poço de solução de OPD (ofenilodiamina 1 mg/mL, H₂O₂ 0,03% em 20 mL de água destilada) por 30 minutos. A reação foi interrompida através de adição de 50 µL de HCL 4 N e a absorbância de cada poço determinada em leitor de microplacas (Labsystems Multiskan, MS). As placas foram lavadas 5 vezes com solução de PBST + albumina bovina 1% nos intervalos das etapas mencionadas.

4.11 Detecção de imunocomplexos circulantes em amostras de soro de hamster com leishmaniose visceral experimental

Placas de poliestireno com 96 poços (Costar®) foram sensibilizadas 1 µg/mL de anticorpos IgG anti-leishmania selecionados por afinidade em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,1 M pH 9,5, com incubação *overnight* em câmara úmida a 4 °C. Após a sensibilização as placas foram bloqueadas com 1% de solução de albumina bovina (Interlab®) em PBS 0,01 M e Tween 20 0,05% por 1 hora a 37 °C. Em seguida foram aplicados 100 µL/poço de 72 soros de hamster infectados experimentalmente em diluição 1/100 em duplicata, com incubação a 37 °C por 1 hora. Após a etapa de incubação, foi adicionado 100 µL/poço de conjugado comercial marcado com peroxidase anti-IgG de hamster (Sigma®) em diluição 1/10000 por 1 hora a 37 °C. A revelação da reação ocorreu através da adição de 100 µL/poço de solução de TMB (Sigma®) por 30 minutos. A reação foi interrompida através de adição de 50 µL de HCL 4 N e a absorbância de cada poço determinada em leitor de microplacas (Labsystems Multiskan, MS). As placas foram lavadas 5 vezes com solução de PBST + albumina bovina 1% nos intervalos das etapas mencionadas.

4.12 Determinação de avidéz de anticorpos IgG anti-leishmania em amostras com leishmaniose visceral experimental e natural

O método foi realizado como descrito no item 4.8, com a adição de uma etapa para avaliação de avidéz de anticorpos IgG anti-leishmania contra extrato antigênico total e carboidratos de promastigota de *L. (L.) infantum chagasi*. As amostras foram testadas em dois conjuntos de duplicatas, em que uma duplicata foi usada para detecção de anticorpos IgG e outra para determinação de avidéz de anticorpos IgG. Amostras foram testadas inicialmente em diluições fixas (1/100) e posteriormente usando uma curva de diluição base 2 (1/100, 1/200, 1/400 e 1/800), tanto para amostras de soro de hamster, como para amostras de soro de cão. Logo após o período de incubação de amostras e lavagem da placa, cada poço da duplicata destinada a determinação de avidéz, recebeu

100 µL de agente caotrópico uréia 6 M com incubação à 37 °C por 15 minutos. A avidéz de anticorpos IgG foi determinada através da comparação dos valores de absorbância total e após eluição por agente caotrópico, em cada amostra testada. Os valores foram representados por porcentagem, de acordo com a fórmula a seguir:

$$\left(\frac{\text{absorbância após eluição}}{\text{absorbância total}} \right) \times 100$$

4.13 Isolamento de frações contendo moléculas de alto e baixo peso do extrato antigênico total de promastigotas

O extrato antigênico total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* obtido por ação de tampão químico lisante, foi filtrado em membrana de policarbonato 0,2 µM (Millipore®) e aplicado em resina Sephadex® G - 25 (Sigma®) em coluna de 10 mL. A purificação foi realizada em sistema automatizado LPLC, ÄKTA prime (GE Healthcare®) pelo método de exclusão molecular, utilizando como tampão de corrida uma solução de tampão carbonato de sódio 0,1 M pH 9,5. As frações foram coletadas em um fluxo de 0,5 mL/minuto com volume de 0,5 mL por tudo de coleta. O volume de cada tubo coletado foi dosado em espectrofotômetro em filtro de absorção 280 nm e a presença de sais foi determinada através de medição de condutividade da amostra.

4.13.1 Dosagem de carboidratos presentes no extrato antigênico total

A quantificação de carboidratos foi fundamentada no método de dosagem do ácido periódico-Schiff com modificações baseadas em estudo realizado por Kicoyne e colaboradores (2011). As dosagens foram realizadas em microplaca usando 125 µL de amostra, 120 µL de solução de metaperiodato de sódio em ácido acético 7%. As placas foram incubadas a 37 °C por 30 minutos. Após o período de incubação foram adicionados

100 µL/poço de reagente de Schiff, seguido de incubação por 30 minutos a 37 °C. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em filtro 540 nm e a quantificação individual das amostras foi calculada com base em curva de calibração pré-determinada (galactose e/ou glicose) para cada lote de reagente utilizado.

4.14 Isolamento de moléculas de baixo peso

A fração de moléculas de baixo peso do extrato antigênico total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, obtida pelo método de exclusão molecular anteriormente descrito, foi submetida a um novo processo de separação, para exclusão de sais presentes na amostra. A amostra foi aplicada em resina Bio-Gel® P-2 (BioRad®) em coluna de 10 mL, a purificação foi realizada em sistema automatizado LPLC, ÄKTA prime (GE Healthcare®) pelo método de exclusão molecular, utilizando como tampão de corrida uma solução de tampão carbonato de sódio 0,1 M pH 9,5. As frações foram coletadas em um fluxo de 0,5 mL/minuto com volume de 0,5 mL por tudo de coleta. O volume de cada tubo coletado foi dosado em espectrofotômetro em filtro de absorção 280 nm e a presença de sais foi determinada através de medição de condutividade da amostra.

4.15 Biotinilação de proteínas e carboidratos isolados do extrato antigênico total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*

4.15.1 Biotinilação de proteínas

A biotinilação de proteínas do extrato antigênico total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* foi realizada de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante Thermo Scientific®. Foi preparada uma solução estoque de biotina (EZ – Link NHS – LC – Biotin) de 1 mg/mL, em que a proporção entre biotina e proteína foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{mL de proteína} \times (\text{massa de proteína em mg/mL proteína}) \times (\text{mmol proteína/ massa de proteína em mg}) \times (\text{EM mmol biotina/mmol de proteína}) = \text{mmol biotina}$$

EM: excesso molar

As devidas proporções entre biotina e proteína foram incubadas por 40 minutos à temperatura ambiente com agitação ocasional (intervalos de aproximadamente 5 minutos). A biotina livre foi bloqueada com 50 µL de solução de glicina 0,1 M pH 7,2. As amostras biotiniladas foram mantidas à -20 °C até uso, com estabilidade média de 60 dias.

4.15.2 Biotinilação de carboidratos

A fração purificada de carboidratos, foi submetida a um processo de oxidação de moléculas, pré-requisito ao processo de biotinilação. O condicionamento da amostra foi realizado em sistema cromatográfico utilizando resina Bio-Gel® P-2 (BioRad®) em coluna de 10 mL em sistema automatizado LPLC, ÄKTA prime (GE Healthcare®), utilizando como tampão de corrida uma solução de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 6,0. As frações foram coletadas em um fluxo de 0,5 mL/minuto com volume de 0,5 mL por tudo de coleta. Os tubos com presença de carboidratos originaram um *pool*, essa amostra foi tratada com metaperiodato de sódio 10Mm com incubação em banho de gelo por 30 minutos ao abrigo da luz. A exclusão de metaperiodato excedente foi realizada em sistema LPLC como descrito acima, as amostras contendo carboidratos originaram um novo *pool* e essa amostra foi incubada com 1 mg de biotina (EZ – Link Hydrazide – LC – Biotin, Thermo Scientific®), seguido de incubação *overnight* à 4 °C. Após o período de incubação, a amostra recebeu 1 mg de borohidreto de sódio sendo incubada por 1 hora em temperatura ambiente para destruir eventuais novas ligações. O protocolo de biotinilação de carboidratos foi realizado de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante Thermo Scientific® a partir de uma solução estoque de biotina 50 mM em

DMSO, as proporções utilizadas basearam-se nas concentrações inicialmente determinadas e o vasto excesso de marcador foi utilizado para garantir uma marcação máxima.

4.16 Detecção de proteínas e carboidratos biotinilados em ELISA

Placas de poliestireno com 96 poços (Costar®) foram sensibilizadas com proteínas e carboidratos biotinilados em curvas de diluição seriada base 2 em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,1 M pH 9,5 100 µL/poço, com incubação em câmara úmida a 4 °C *overnight*. As etapas de bloqueio, lavagem, reação avidina-peroxidase, revelação e leitura foram realizadas como descritas no item 4.10.

4.17 Avaliação da antigenicidade de proteínas e carboidratos biotinilados em ELISA

Placas de poliestireno com 96 poços (Costar®) foram sensibilizadas com 1 µg/poço de anticorpos IgG anti-leishmania selecionados por afinidade, em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,1 M pH 9,5. Foram testadas curvas decrescentes (0,01 – 10 µg/mL) de amostras de proteínas e carboidratos biotinilados, em duplicata usando 100 µL/poço. As etapas de bloqueio, lavagem, reação avidina-peroxidase, revelação e leitura foram realizadas como descritas no item 4.10.

4.18 Conjugação de carboidratos do extrato antigênico total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* a moléculas de BSA

A conjugação entre carboidratos e BSA, foi baseada no método descrito por Nakane e Kawoi (1974), modificações foram realizadas. Foi utilizada uma amostra de carboidrato purificada como descrito anteriormente. Uma alíquota de amostra contendo

carboidratos em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 6,0 foi incubada com 1 mg de BSA e incubada em temperatura ambiente por 1 hora sob agitação constante. Após o período de incubação a amostra recebeu tampão carbonato de sódio 0,5 M pH 9,0 com incubação por 1 hora em temperatura ambiente sob agitação constante, em seguida foi dissolvido 1 mg de borohidreto de sódio, seguida de incubação à 4 °C por 2 horas sob agitação constante. Após esse processo, a amostra foi submetida a exclusão de moléculas não conjugadas em sistema automatizado LPLC, ÄKTA prime (GE Healthcare®) pelo método de exclusão molecular, que utilizou resina Sephadex® G-25 (Sigma®) em coluna de 10 mL. As proporções utilizadas basearam-se nas concentrações inicialmente determinadas e o vasto excesso foi utilizado. Tubos contendo carboidratos conjugados a BSA originaram um *pool* e essa amostra foi utilizada na detecção de anticorpos IgG anti-leishmania.

4.19 Caracterização eletroforética de carboidratos do extrato antigênico total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* conjugados a moléculas de BSA

A presença de carboidratos do extrato antigênico total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, foi demonstrada em SDS-PAGE, segundo Laemli (1970). A conjugação entre carboidratos e BSA, permitiu sua avaliação por esse sistema. Foi utilizado um gel de poliacrilamida para separação (10%) e gel de empilhamento (4%), as amostras foram homogeneizadas v/v em tampão de amostra (Tris 60 mM pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,01% e β -mercaptoetanol), em seguida aquecidas a 99 °C por 4 minutos e aplicadas no gel, juntamente com um padrão de peso molecular Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific®, EUA). A corrida eletroforética foi realizada a 100 mA por aproximadamente 2 horas em tampão de corrida (tris 3%, SDS 1% e glicina 14%). O gel foi incubado por 1 hora com ácido tricloroacético 12,5%, em seguida lavado com água destilada e incubado por 1 hora com solução de periodato de sódio 1% em ácido acético 3%. Após o processo de oxidação o gel foi incubado com aproximadamente 100 mL de água destilada e incubado *overnight*, em seguida incubado por 1 hora com reagente de Schiff e lavado com solução de metabissulfito de sódio 0,5%. A coloração de carboidratos foi realizada de acordo com a técnica descrita por Korn e Wright (1973), com modificações.

4.20 Antigenicidade de fração de carboidratos conjugados a moléculas de BSA

Placas de poliestireno com 96 poços (Costar®), foram sensibilizadas com curvas decrescentes utilizando diluição seriada base 2 de carboidratos conjugados a BSA, em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,1 M pH 9,5. Foram testadas amostras de soro de coelho imunizado em diluição 1/200 em duplicata usando 100 µL/poço, em seguida foi adicionado 100 µL/poço de conjugado comercial anti-IgG de coelho marcado com peroxidase (Sigma®) e a placa incubada por 1 hora a 37 °C. As etapas de bloqueio, lavagem, revelação e leitura foram realizadas como descritas no item 4.8.

4.21 Detecção de anticorpos IgG anti-leishmania reativos a proteínas e carboidratos

Placas de poliestireno com 96 poços (Costar®) foram sensibilizadas com curvas decrescentes, utilizando diluição seriada base 2 de frações de proteínas e carboidratos conjugados a BSA em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,1 M pH 9,5. Foram testadas amostras de soro de coelho imunizado em diluição 1/200 em duplicata usando 100 µL/poço, em seguida foi adicionado 100 µL/poço de conjugado comercial anti-IgG de coelho marcado com peroxidase (Sigma®) em diluição 1/10000 e a placa incubada por 1 hora a 37 °C. As etapas de bloqueio, lavagem, revelação e leitura foram realizadas como descritas no item 4.8.

4.22 Determinação de incremento de anticorpos IgG para carboidratos antigênicos de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*

A determinação de incremento de IgG em ELISA foi realizada de acordo com protocolo por nós padronizado em estudo anterior (de Carvalho et al., 2013). Amostras de soro de hamster com infecção experimental foram testadas em ELISA convencional e ELISA com fase dissociativa para imunocomplexos circulantes, técnica denominada

ELISA dissociativo. Placas de poliestireno com 96 poços (Costar®) foram sensibilizadas com concentrações fixas (diluição 1/2000) de carboidratos do extrato antigênico de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,1 M pH 9,5. Amostras de soro de hamster com infecção experimental foram testadas em diluição 1/100 100 µL/poço e distribuídas em 2 duplicatas, em que uma foi usada para o ELISA convencional e outra para o ELISA dissociativo, em seguida as amostras receberam 25 µL/poço de glicina 0,1 M pH 2,5 com incubação por 5 minutos a temperatura ambiente sob agitação constante. A reação foi neutralizada com 25 µL tris/HCL 0,25 M pH 8,8, seguido de incubação por 1 hora a 37 °C, em seguida foi adicionado 100 µL/poço de conjugado comercial anti-IgG de hamster marcado com peroxidase (Sigma®) em diluição 1/10000 e a placa incubada por 1 hora a 37 °C. As etapas de bloqueio, lavagem, revelação e leitura foram realizadas como descritas no item 4.8. Os resultados foram analisados através da determinação de médias das duplicatas para cada amostra no ELISA convencional e ELISA dissociativo, em que o incremento de anticorpos IgG após dissociação é determinado pelo seguinte cálculo:

$$\begin{array}{ccccc} \text{absorbância ELISA} & - & \text{absorbância ELISA} & = & \text{Incremento de anticorpos} \\ \text{dissociativo} & & \text{convencional} & & \text{IgG anti-leishmania} \end{array}$$

Importante ressaltar que o incremento de anticorpos IgG após dissociação de imunocomplexos pode ser expressado através do aumento da absorbância e/ou porcentagem.

4.23 Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas utilizando o *software* GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Prisma®, San Diego – Califórnia, USA). A correlação dos resultados está expressa através de r^2 e foram considerados significativos comparações entre resultados cuja a probabilidade de igualdade foi menor 5% ($p < 0.05$).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização de extrato antigênico total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*

5.1.2 Comparação de eficiência antigênica de extrato total obtidos por sonicação e ação de tampão químico

Os extratos totais obtidos de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, foram avaliados considerando a manutenção de suas antigenidades usando curvas com concentrações decrescentes (1– 0,07 µg/poço). Os resultados foram comparados e mostraram-se semelhantes, como demonstrado no Figura 4.

Figura 4 - Detecção de anticorpos IgG por amostras de extrato total de promastigotas obtidas por sonicação (linha contínua e círculo fechado) e por ação de tampão químico (linha tracejada e círculo aberto). A detecção de anticorpos foi realizada em concentrações decrescentes de antígeno.

A comparação da eficiência entre as amostras de antígenos testadas, evidenciou concentrações mínimas dos mesmos, necessárias para detecção de anticorpos IgG pelos sistemas. Os resultados foram analisados utilizando um intervalo de confiança de 95%. A comparação entre os resultados não evidenciou diferença significativa entre os pontos das curvas testadas entre os extratos totais avaliados. Considerando a praticidade do método, o antígeno lisado por tampão químico foi escolhido para nossos experimentos.

5.1.3 Caracterização eletroforética de proteínas de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*

Após a definição do método de obtenção de extrato antigênico total de promastigotas através do uso de tampão químico, o perfil da mobilidade eletroforética de

seus constituintes proteicos foi testado em sistema SDS PAGE em diferentes concentrações. As concentrações foram testadas de forma decrescente usando 16, 12, 8, 4, 2, 1, 0,5 e 0,24 $\mu\text{g/poço}$. Os resultados podem ser visualizados na Figura 5.

Figura 5 - Eletroforese em SDS PAGE. PM – Padrão molecular; 1 – 8 diferentes concentrações de extrato total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* (16, 12, 8, 4, 2, 1, 0,5 e 0,24 $\mu\text{g/poço}$).

O perfil eletroforético do extrato total de promastigotas foi testado em diferentes concentrações e mostrou múltiplas bandas após coloração, evidenciando proteínas de pesos moleculares variados distribuídas entre 15-35 kDa e 40-100 kDa, as bandas de maior destaque no gel encontram-se entre 50-70 kDa. A curva de diluição do extrato total permitiu padronizar e identificar concentrações de trabalho e as mais evidentes foram 16, 12 e 8 μg .

5.1.4 Antigenicidade de perfil eletroforético de extrato antigênico total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* em grupos controles de amostras com infecção experimental, natural e imunização

Após eletroforese do extrato antigênico total de promastigotas, a transferência de proteínas foi realizada para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi usada para avaliação de antigenicidade pelo método de *Western-Blotting* através da detecção de anticorpos IgG em amostras com infecção natural, experimental e imunizados, como demonstrado na Figura 6. Foram selecionadas amostras de soros, entre as quais foram usadas 5 amostras com evolução progressiva na detecção de IgG durante a infecção experimental em hamster com coletas aos 15, 30, 45, 60 e 90 dias de infecção, 10 amostras positivas com infecção natural, sendo 5 amostras de cão e 5 amostras humanas e 2 amostras de coelhos imunizados. Para cada grupo, 1 amostra negativa foi usada como controle.

Figura 6 - Detecção de anticorpos IgG anti-leishmania por *Western-Blotting* em amostras de soro com infecção experimental, natural e imunização. Avaliação de antigenicidade de extrato total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*.

A detecção de anticorpos IgG foi realizada pelo perfil de bandas do extrato antigênico total de promastigotas evidenciados na eletroforese e indicou reatividade a várias proteínas. Essas proteínas, apresentaram variação na intensidade de reatividade à anticorpos IgG. Proteínas entre ~15 kDa e ~70 kDa mostraram-se mais reconhecidas por

anticorpos, com bandas mais intensas e presentes na maioria das amostras, contudo outras proteínas de menor antigenicidade foram também identificadas.

5.1.5 Detecção de anticorpos IgG anti-leishmania em grupos controles de amostras com infecção experimental, natural e imunização

Após a confirmação de antigenicidade do extrato antigênico total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, a detecção de anticorpos IgG foi realizado por ELISA, como demonstrado no Figura 7. Os *cut-off's* das reações foram calculados utilizando um intervalo de confiança de 95% e estão representados por uma média.

Figura 7 - Detecção de anticorpos IgG anti-leishmania. A - Cada ponto refere-se a uma medida de sorologia individual em amostras de cão, homem, hamster e coelhos. A linha tracejada separa amostras positivas de negativas. B - Detecção de anticorpos IgG em hamsters experimentalmente infectados aos 15, 30, 45, 60 e 90 dias de infecção e cada ponto representa a sorologia de um período de infecção.

A detecção de anticorpos IgG anti-leishmania por ELISA nos grupos com infecção natural (cão e homem) e imunizado (coelhos) apresentaram perfis definidos, com resultados positivos e negativos. As amostras do grupo com infecção experimental (hamsteres), apresentaram um perfil de reatividade diversificado, condição associada a evolução da infecção. Aos 15 dias de infecção a detecção de anticorpos IgG foi relativamente baixa, porém mais elevada quando comparada ao controle negativo. A detecção de IgG anti-leishmania elevou-se gradualmente quando associada a progressão temporal da infecção. Esta definição dos grupos mostrou-se importante para estabelecer controles utilizados nos testes aqui descritos.

5.2 Seleção de anticorpos IgG anti-leishmania em soro de coelho imunizado com extrato total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*

Anticorpos IgG anti-leishmania foram selecionados por afinidade ao extrato antigênico total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* previamente precipitado por etanol e acoplado a partículas magnéticas como descrito em métodos. A influência do pH durante o processo de seleção de anticorpos IgG específicos presentes em soro de coelho hiperimune foi avaliada em duas condições distintas (pH 7,2 e pH 5,0). Após os processos de eluição, as concentrações de anticorpos IgG foram estimadas por filtro ultravioleta e placas de ELISA foram sensibilizadas com quantidades decrescentes (1; 0,5; 0,25; 0,12; 0,06; 0,03; 0,01 e 0,005 µg/poço) e como controle positivo para a reação foi usada uma amostra de soro de coelho imunizado em diluição 1/1000. A presença de anticorpos IgG específicos após os processos de eluição (pH 7,2 e pH 5,0), foram reveladas por conjugado espécie-específico em ELISA. Os resultados estão demonstrados no Figura 8.

Figura 8 - Detecção de anticorpos IgG anti-leishmania por ELISA. A linha contínua com quadrado representa níveis de IgG pH 7,2 e a linha contínua com triângulo representa níveis de IgG pH 5,0. O controle da reação está representado pela linha tracejada, equivalente a amostra de soro de coelho hiperimune para *L. (L.) infantum chagasi*.

Os resultados mostram que a detecção de anticorpos IgG anti-leishmania foi proporcional a curva de sensibilização usada e maiores níveis foram encontrados para a amostra selecionada em pH 7,2, quando comparada a amostra selecionada em pH 5,0. Os resultados foram analisados através de regressão linear e a comparação entre os dados mostrou alta significância com $p < 0,0002$ e $p < 0,0001$ e alta correlação de Pearson com r^2 de 0,91 e r^2 0,93, para as amostras com reação em pH 7,2 e pH 5,0, respectivamente.

A viabilidade de anticorpos IgG anti-leishmania foi identificada através de detecção de reatividade ao extrato antigênico total de promastigotas, em que foram utilizadas curvas com quantidades decrescentes (1; 0,5; 0,25; 0,12; 0,06; 0,03; 0,01 e

0,005 µg/poço) em ELISA. Uma amostra de soro de coelho hiperimune em diluição 1/200 foi utilizada como controle positivo da reação, como demonstrado no Figura 9.

Figura 9 - Detecção de anticorpos IgG anti-leishmania em ELISA. As linhas e seus respectivos pontos referem-se a concentrações de IgG detectadas por extrato antigênico total de promastigotas em amostra de soro hiperimune de coelho (1/200) representada pela linha tracejada e em amostras de IgG eluídas após seleção em pH 7,2 e pH 5,0 representadas pelas linhas contínuas com quadrado e triângulo, respectivamente.

Os resultados mostraram que a capacidade de reação a diferentes concentrações do extrato antigênico total nos dois perfis de anticorpos (selecionados em pH 7,2 e pH 5,0) foi semelhante, apresentando alta significância com $p < 0,001$ e $p < 0,001$ e alta correlação de Pearson com $r^2 = 0,89$ e $r^2 = 0,90$, respectivamente. Como esperado, a amostra hiperimune usada como controle apresentou altos níveis de reatividade.

5.3 Detecção de antígenos do extrato antigênico total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* em ELISA *sandwich*

Anticorpos IgG anti-leishmania selecionados por afinidade, foram testados em ELISA na captura de antígenos do extrato total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*. Amostras de anticorpos IgG anti-leishmania de coelho imunizado e selecionados em pH 7,2 e pH 5,0 foram usadas na sensibilização de placas de ELISA em diferentes concentrações (1, 0,1 e 0,01 µg/poço) e avaliadas em relação a capacidade de captura a antígenos de leishmania. A captura de antígeno foi realizada utilizando curvas com concentrações decrescentes (1, 0,5, 0,25, 0,12, 0,06, 0,03 e 0,01 µg/poço). Os resultados podem ser visualizados no Figura 10.

Figura 10 - Curva de detecção de antígenos do extrato total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* por anticorpos IgG selecionados em pH 7,2 e 5,0 em ELISA. Os pontos referem-se às concentrações de antígeno. As linhas contínuas representam amostras de IgG pH 7,2 e o círculo, quadrado e hexágono fechados, equivalem as concentrações de 1, 0,1 e 0,01 µg, respectivamente e as linhas pontilhadas representam amostras de IgG pH 5,0 e a pirâmide invertida, círculo e quadrado abertos, equivalem as concentrações de 1, 0,1 e 0,01µ, respectivamente.

Os resultados indicam, que a captura foi proporcional a curva de antígenos testada para a concentração de 1 µg de IgG pH 7,2 e 5,0. Nas menores concentrações de IgG pH 7,2 e 5,0 (0,1 e 0,01 µg/poço) a captura de antígenos limitou-se as maiores concentrações de antígeno testado (0,12 – 1 µg/poço). Entretanto, todas as concentrações de IgG testadas apresentaram maior capacidade de detecção para maiores concentrações de antígeno (1 µg/poço). Os resultados foram analisados usando um intervalo de confiança de 95% e apresentaram alta correlação de Pearson com $r^2 = 0,95, 0,98, 0,97, 0,97, 0,97$ e $0,98$, para as concentrações de 1, 0,1 e 0,01 µg de IgG selecionada em pH 7,2 e 1, 0,1 e 0,01 µg de IgG selecionada em pH 5,0, respectivamente.

Vale ressaltar que as concentrações de 1 µg de IgG anti-leishmania selecionados em pH 7,2 e 5,0 foram capazes de detectar concentrações mínimas de antígeno,

confirmando desta maneira seu potencial de detecção. Concentrações 0,1 e 0,01 µg/ml usadas na sensibilização mostraram maior reatividade de captura nas concentrações de 1, 0,5 e 0,25 µg/mL de antígenos testados. A reatividade apresentada por anticorpos selecionados em pH 5,0 sugerem que este perfil pode apresentar maior potencial de afinidade e/ou avides.

5.4 Detecção de antígenos circulantes em amostras de soro de hamsteres com infecção experimental em ELISA *sandwich*

Após a constatação de características específicas relacionadas a diferentes perfis de afinidade e avides por anticorpos IgG anti-leishmania durante o processo de seleção, testes de captura para antígenos presentes no extrato total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* foram realizados por ELISA. A comparação de eficiência de captura de antígenos entre anticorpos IgG anti-leishmania não mostrou diferença significativa entre os perfis para as maiores concentrações utilizadas na sensibilização, como descrito anteriormente, entretanto quando consideramos o potencial de aplicação e rendimento das amostras optamos por trabalhar com anticorpos selecionados em pH 7,2, já que essa fração contém o perfil geral de anticorpos IgG anti-leishmania presentes, inclusive o perfil observado na seleção em pH 5,0.

Amostras de soro de hamster com infecção experimental aos 15, 30, 45, 60 e 90 dias, foram submetidas a detecção de antígenos circulantes em ELISA *sandwich*. Os resultados estão demonstrados no Figura 11.

Figura 11 – Captura de antígenos circulantes por anticorpos IgG anti-leishmania purificados por afinidade em ELISA. Cada ponto representa uma amostra de soro de hamster experimentalmente infectados aos 15, 30, 45, 60, 90 dias após a infecção. O intervalo no eixo y representa o *cut-off* da reação.

Foram detectados antígenos circulantes em 8 amostras em diferentes períodos de infecção. A positividade para os períodos pós infecção foi de 10% (1/10) aos 15 dias, 27,8% (5/18) aos 30 dias e 5,9% (1/17) aos 60 e 90 dias. Não foram encontradas amostras positivas para o período de 45 dias após infecção.

5.5 Detecção direta de imunocomplexos circulantes em amostras de soro de hamster com infecção experimental em ELISA *sandwich*

Considerando os dados obtidos para a detecção de antígenos circulantes e anticorpos IgG anti-leishmania, a detecção de imunocomplexos circulantes foi realizada em 72 amostras de soro de hamster coletadas aos 15, 30, 45, 60 e 90 dias após infecção

experimental. Placas de ELISA foram sensibilizadas com 1 $\mu\text{g/mL}$ de anticorpos IgG anti-leishmania selecionados por afinidade, o experimento ocorreu como descrito em métodos. Os resultados estão demonstrados no Figura 12.

Figura 12 – Detecção de imunocomplexos circulantes em amostras de soro de hamster infectados experimentalmente com *L. (L.) infantum chagasi*. Cada ponto representa uma amostra e o intervalo no eixo y o *cut-off* da reação.

Os resultados foram submetidos a um valor de *cut-off* calculado com base em resultados de amostras de soros negativos e utilizou um intervalo de confiança de 95% e mostrou a detecção de imunocomplexos circulantes não dissociados em 13,8% das amostras testadas. A análise da presença de imunocomplexos circulantes não dissociados nos períodos pós infecção está demonstrada no Figura 13.

Figura 13 – Presença de imunocomplexos circulantes aos 15, 30, 45, 60 e 90 dias após infecção. Cada ponto representa uma amostra e o intervalo no eixo y o *cut-off* da reação.

A análise dos resultados para cada período pós infecção mostrou a presença de imunocomplexos circulantes não dissociados em uma parcela das amostras testadas. Os resultados mostraram-se positivos em 16,6% (3/18) aos 30 dias, 30% (3/10) aos 45 dias, 11,7% (2/17) aos 60 dias e 5,9% (1/17) aos 90 dias após infecção. A maior porcentagem encontrada foi aos 30 e 45 dias após infecção. Aos 15 dias de infecção não foram encontradas amostras positivas.

5.6 Avidéz de anticorpos IgG anti-leishmania

5.6.1 Avidéz de anticorpos IgG em amostras de soro de hamster com leishmaniose visceral experimental

Após a análise de resultados para os testes de captura de antígenos e imunocomplexos circulantes, a determinação do perfil de avidéz de anticorpos IgG anti-leishmania mostrou-se como informação importante para o seguimento de nossos experimentos. Amostras de soro de hamster com infecção experimental foram submetidas à detecção de anticorpos IgG anti-leishmania e determinação de avidéz por ELISA. Foram testadas amostras de soro obtidas aos 15, 30, 45, 60 e 90 dias após infecção, os resultados estão representados no Figura 14.

Figura 14 - Evolução média de IgG anti-leishmania em hamstres infectados experimentalmente com *L. (L.) infantum chagasi* em associação com valores médios de avidex. Símbolos redondo e linha tracejada mostram a evolução da sorologia para anticorpos IgG e o símbolo quadrado e linha contínua mostram valores para avidex. As barras representam o desvio padrão das amostras testadas.

A evolução na detecção de anticorpos IgG anti-leishmania nos animais experimentalmente infectados é evidente ao longo do período analisado. Nota-se um aumento significativo dos níveis de IgG anti-leishmania entre 15 e 30 dias após infecção e níveis mais estáveis entre 45 e 90 dias após infecção ($P < 0.0005$). A determinação de avidex mostrou predominância de anticorpos IgG anti-leishmania de alta avidex em todos os períodos de infecção, inclusive em períodos iniciais (15 e 30 dias).

5.6.2 Avaliação da influência de altas concentrações de anticorpos IgG anti-leishmania na determinação da avidéz em amostras de soro de hamsteres experimentalmente infectados

Considerando os resultados obtidos na determinação de avidéz para anticorpos IgG anti-leishmania durante a infecção experimental em hamster e a ocorrência de frequente hipergamaglobulinemia durante a LV, foi necessário avaliar a influência da concentração sérica desses anticorpos nas amostras de soro em ELISA, como descrito em métodos. Foram avaliadas 75 amostras de soro de hamster experimentalmente infectados com *L. (L.) infantum chagasi* e cada amostra foi testada em uma curva de diluição com quatro pontos distintos e crescentes (1/100, 1/200, 1/400 e 1/800) para detecção de IgG e determinação de avidéz. Os resultados estão demonstrados no Figura 15.

Figura 15 - Avidéz de anticorpos IgG anti-leishmania em diluições progressivas de amostras de soros em diferentes períodos da infecção experimental em hamster (A-15, B-30, C-45, D-60 e D-90 dias após infecção). Os pontos representam cada diluição testada (1/100, 1/200, 1/400 e 1/800). As amostras em destaque apresentaram aumento na porcentagem de avidéz para a diluição final em comparação a diluição inicial testada.

Os resultados mostraram diferença entre os pontos de diluições e a influência exercida pela diluição afeta diretamente os resultados das amostras testadas. O parâmetro utilizado para a classificação das amostras foi o estabelecimento de um valor de corte ou

cut-off para a maior diluição da amostra testada. Amostras com valores dentro do intervalo de um desvio padrão para mais ou para menos em relação a média das diluições foram classificadas como “manutenção”, valores de avides acima do desvio padrão positivo em relação à média foram classificadas como “aumento” e valores de avides abaixo do desvio padrão negativo em relação à média foram classificadas como “queda”.

Para o grupo nomeado como “manutenção” a curva de diluição testada não alterou os resultados de avides, já para o grupo nomeado como “queda” e “aumento” foi evidente a influência da diluição nos resultados de avides em amostras que apresentaram queda e aumento em seus valores quando comparados aos resultados das primeiras diluições testadas. Os perfis de amostras classificados como anteriormente descrito, estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição do perfil de avides de anticorpos IgG anti-leishmania em amostras de soro de hamster em diferentes períodos de infecção (15, 30, 45, 60 e 90 dias). As amostras foram classificadas de acordo com os resultados de avides obtidos após avaliação da diluição testada.

Perfil de avides pós diluição	Dias após de infecção				
	15 (n=10)	30 (n=18)	45 (n=10)	60 (n=17)	90 (n=17)
Manutenção	70.0 %	38.9 %	40.0 %	47.1 %	29.4 %
Aumento	30.0 %	22.2 %	0.0 %	17.6 %	29.4 %
Queda	0.0 %	38.9 %	60.0 %	35.3 %	41.2 %

Além da confirmação da presença de anticorpos IgG anti-leishmania de alta avides nos períodos iniciais da infecção experimental em hamster (avides com valores médios de 50% para os períodos de 15 e 30 dias após infecção). O perfil de avides observado foi diversificado para cada e entre os períodos de infecção. O aumento médio nos valores de avides de anticorpos IgG anti-leishmania em amostras do grupo “aumento” foi de 12,1% aos 15 dias, 19,4% aos 30 dias, 23,3% aos 60 dias e 16,8% aos 90 dias de infecção. Aos 45 dias de infecção não foram observadas amostras com aumento de avides após diluição.

5.6.3 Avaliação da influência de altas concentrações de anticorpos IgG anti-leishmania na determinação de avidéz em amostras de soros de cães com infecção natural

A detecção e determinação da avidéz de anticorpos IgG anti-leishmania em amostras de cães naturalmente infectados com *L. (L.) infantum chagasi* foi realizada por ELISA como descrito em métodos. Foram avaliadas 100 amostras de soro, testadas individualmente em uma curva de diluição com quatro pontos distintos e crescentes (1/100, 1/200, 1/400 e 1/800). Os resultados estão demonstrados no Figura 16.

Figura 16 – Avidéz de anticorpos IgG anti-leishmania em amostras de soro de cães com infecção natural. As amostras de soro foram testadas em uma curva de diluição, cada ponto representa uma diluição (1/100, 1/200, 1/400 e 1/800), as linhas representam a curva para cada amostra. A – Grupo de amostras com manutenção de avidéz; B – Grupo de amostras com aumento de avidéz e C – Grupo de amostras com queda de avidéz.

A avaliação dos resultados de avides para anticorpos IgG anti-leishmania em amostras de soro de cão com infecção natural mostrou 3 perfis, assim como observado para amostras de hamster com infecção experimental. Como relatado anteriormente para amostras de hamster, o parâmetro utilizado para a análise dos resultados em amostras de cães com infecção natural foi o valor de corte ou *cut-off* para a maior diluição de cada amostra testada, em que valores dentro do intervalo de um desvio padrão para mais ou para menos em relação a média das diluições foram classificados como “manutenção”, valores de avides acima do desvio padrão positivo em relação à média foram classificados como “aumento” e valores de avides abaixo do desvio padrão negativo em relação à média foram classificadas como “queda”. A análise dos resultados mostrou que 47% das amostras não foram afetadas pela curva de diluição e mantiveram seus resultados iniciais, entretanto 53% das amostras mostraram diferença entre seus resultados iniciais e finais na curva de diluição, 18% apresentaram queda e 35% apresentaram aumento progressivo das porcentagens de avides para os pontos de diluições usados.

5.7 Isolamento e identificação de perfis de proteínas e carboidratos presentes no extrato total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*

5.7.1 Perfil cromatográfico do extrato total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*

Uma alíquota de extrato antigênico total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, foi submetida a cromatografia em resina Sephadex® G - 25 (Sigma) utilizando o método de exclusão molecular (limite de exclusão 1000-5000 kDa). A cromatografia permitiu a caracterização da condutividade e a separação de moléculas presentes na amostra. Os resultados estão demonstrados na Figura 17.

Figura 17 – Perfil cromatográfico em coluna Sephadex G25 de extrato total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*. Linha preta contínua representa absorvância por ultravioleta (UV 260nm) e linha tracejada vermelha representa a condutividade da amostra.

O resultado da cromatografia mostrou a presença de proteínas e sais na amostra processada. A detecção por UV mostrou absorvância detectada entre as frações/tubos 4-13 com maiores concentrações observadas entre as frações/tubos 4-7. A condutividade foi presente entre as frações/tubos 7-13 da cromatografia. O perfil de fracionamento obtido foi eficiente e mostrou que moléculas de alto peso foram excluídas entre as frações/tubos 4-7 sem a presença de condutividade, já moléculas de baixo peso foram excluídas entre as frações/tubos 8-13 com a presença de condutividade.

5.7.2 Identificação e quantificação de proteínas e carboidratos em frações do extrato total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* processadas em cromatografia de exclusão molecular

Para quantificar as frações obtidas a partir de cromatografia anteriormente descrita, utilizamos os métodos de Bradford para a determinação de proteínas e o método de Schiff para a determinação de carboidratos. As quantificações foram realizadas em todas as frações obtidas em cromatografia previamente realizada (Sephadex® G-25

(Sigma®)), tanto para a determinação de proteínas como para a determinação de carboidratos. Os resultados estão demonstrados na Figura 18.

Figura 18 – Determinação e quantificação de proteínas e carboidratos em frações do extrato total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* obtidas por cromatografia de exclusão molecular. A linha preta contínua representa a determinação de proteínas pelo método de Bradford e a linha vermelha tracejada representa a determinação de carboidratos pelo método de Schiff. Os pontos representam as frações provenientes da cromatografia.

A quantificação de proteínas foi correspondente as leituras obtidas por UV na cromatografia e as maiores concentrações foram identificadas entre as frações/tubos 4-7, já a quantificação e identificação da presença de carboidratos foi presente entre as frações/tubos 8-13. Esses resultados evidenciaram a associação entre as frações/tubos com presença de proteínas e carboidratos e os perfis de separação molecular obtidos. Esses resultados permitiram também confirmar a relação entre proteínas e moléculas de alto peso e a presença de carboidrato e moléculas de baixo peso.

5.7.3 Perfil cromatográfico de fração de baixo peso molecular do extrato total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*

Após a separação de frações de alto e baixo peso molecular obtidas, foi necessário eliminar quaisquer possíveis interferentes presentes na amostra. A condutividade detectada na fração composta por moléculas de baixo peso, mostrou-se como um fator limitante para o processo de biotinilação e essa fração foi submetida a um novo processo de cromatografia utilizando resina Bio-Gel® P-2 (BioRad®) (limite de exclusão 100-1,800kda), os resultados estão demonstrados na Figura 19.

Figura 19 – Perfil cromatográfico em coluna Bio gel P2 de fração de baixo peso molecular do extrato total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* obtido em cromatografia G25. Linha preta contínua representa absorvância por UV 260nm e linha tracejada vermelha representa a condutividade da amostra.

Assim como observado anteriormente a cromatografia indicou frações com a presença de absorvância detectada por UV e a presença de sais demonstrada através da condutividade. O resultado da cromatografia mostrou maior absorvância detectada entre as frações/tubos 3-5, com sequente queda para as frações. A condutividade foi detectada

entre as frações/tubos 6-10. Os resultados indicam que a separação entre as moléculas de baixo peso e os sais foi eficiente.

5.7.4 Caracterização de proteínas e carboidratos presentes no extrato total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*

Considerando o isolamento de dois perfis de moléculas biológicas a partir da separação por exclusão molecular, obtidos em cromatografias de extrato total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, a caracterização destas frações se fez necessária. O sistema de escolha foi a marcação destas frações através de conjugação por afinidade a grupamentos químicos específicos através da biotinilação, utilizando biotina NHS (EZ – Link NHS – LC – Biotin, Thermo Scientific®) para marcação e identificação de moléculas proteicas e a biotina Hidrazida (EZ – Link Hydrazide – LC – Biotin, Thermo Scientific®) para a marcação e identificação de moléculas de carboidratos.

5.7.5 Detecção de proteínas e carboidratos biotinilados

Frações do extrato total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* contendo proteínas e carboidratos foram biotiniladas como descrito em métodos. A eficiência do processo de biotinilação foi avaliada através da imobilização dessas moléculas em ELISA usando como referência uma curva de diluição seriada (base 2) das frações de proteínas e carboidratos. Os resultados estão demonstrados na Figura 20.

Figura 20 – Detecção de proteínas e carboidratos biotinilados presentes no extrato total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*. Cada ponto representa um ponto de diluição. A linha contínua com pontos fechados representa proteínas biotiniladas com NHS e a linha tracejada com pontos abertos representa carboidratos biotinilados com hidrazida.

A especificidade para o processo de marcação durante a biotinilação das amostras, confirmou a presença de proteínas e carboidratos para as diferentes diluições testadas em nossos resultados. Considerando o ponto inicial da curva de diluição para proteínas e carboidratos biotinilados, os maiores pontos de diluição apresentaram maiores níveis de detecção. Como esperado os níveis de detecção do sistema apresentaram-se de forma decrescente e foram correspondentes a curva de diluição testada para proteínas biotiniladas ($r^2 = 0,96$), entretanto para carboidratos biotinilados ($r^2 = 0,85$) os intervalos para os pontos de diluição apresentaram-se mais uniformes, mostrando menor associação para a curva testada. A comparação entre os resultados das curvas de proteínas e carboidratos biotinilados evidenciou maior potencial de marcação e sensibilização para maiores diluições.

5.8 Antigenicidade de proteínas e carboidratos biotinilados

Após a confirmação da presença de proteínas e carboidratos nas frações obtidas a partir do extrato total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* através de processos de biotilação específicos, a antigenicidade dessas moléculas foram avaliadas em teste de captura para antígenos em ELISA. Amostras de proteínas e carboidratos biotinilados foram avaliadas usando uma curva decrescente (0,01 – 10 µg/mL) contra 1 µg/mL de anticorpos IgG anti-leishmania selecionados por afinidade. Os resultados estão demonstrados na Figura 21.

Figura 21 – Detecção de proteínas e carboidratos biotinilados presentes no extrato total de *L. (L.) infantum chagasi* por ELISA de captura. Os pontos representam a curva de diluição testada para as amostras. A linha contínua com pontos fechados representa a amostra de proteínas biotiniladas e a linha tracejada com pontos abertos representa a amostra de carboidratos biotinilados.

A curva de detecção foi adequada a curva de antígeno utilizada, tanto para proteínas biotiniladas como para carboidratos biotinilados, e os resultados apresentaram alta correlação de Pearson com $r^2 = 0,99$ e $0,98$, respectivamente. O sistema foi capaz de detectar até $0,6 \mu\text{g}$ antígeno/mL para os dois perfis de biomoléculas. A maior reatividade foi observada para proteínas biotiniladas, quando comparado aos resultados obtidos para carboidratos biotinilados. Apesar da diferença de reatividade entre as amostras, os resultados mostraram que tanto proteínas, como carboidratos isolados do extrato total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* possuem antigenicidade específica para anticorpos IgG anti-leishmania.

5.9 Captura de antígenos biotinilados (NHS) em amostra de fração composta por carboidratos

A fração de carboidratos foi testada em relação a presença de proteínas através da biotinylation específica (NHS) em ELISA de captura, usando diluição seriada base 2 contra uma concentração fixa de anticorpos IgG anti-leishmania selecionados por afinidade e imobilizados em suporte sólido. Foi utilizado como controle da reação uma alíquota de carboidratos biotinilados (Hidrazida). Os resultados estão demonstrados no Figura 22.

Figura 22 – Captura de carboidratos antigênicos biotinilados especificamente com biotina NHS e hidrazida em ELISA. As linhas representam a curva de diluição utilizada. Os pontos e a linha tracejada representam a fração antigênica composta por carboidratos conjugados a biotina Hidrazida e os quadrados e a linha contínua representam a fração antigênica composta por carboidratos conjugados a biotina NHS.

A comparação de captura de antígenos biotinilados foi adequada a curva de diluição testada quando considerada a fração de carboidrato conjugada a biotina Hidrazida, com manutenção de altas absorbâncias detectadas em diluições iniciais (6 primeiros pontos da curva), apresentando queda gradual para as diluições seguintes. Para a fração de carboidrato conjugada a biotina NHS a curva de diluição mostrou detecção de antígenos de forma gradual e decrescente. A utilização de carboidratos conjugados a biotina Hidrazida em diluição adequada minimiza a interferência causada pela presença de glicoproteínas que poderiam interagir via açúcar com o anticorpo, que ocorre em maiores concentrações de antígeno. Os resultados das curvas foram analisados e a comparação apresentou diferença significativa e a correlação de Person mostrou-se adequada com r^2 0,88 para carboidratos conjugados a biotina Hidrazida e r^2 0,69 para carboidratos conjugados a biotina NHS.

5.10 Caracterização eletroforética de moléculas de BSA conjugadas a carboidratos

Após a conjugação de moléculas de BSA à carboidratos isolados do extrato total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, o perfil de mobilidade eletroforética foi testado em sistema SDS PAGE. Os resultados podem ser visualizados na Figura 23.

Figura 23 - Eletroforese em gel de acrilamida 12%. PM – Padrão molecular; 1 – Carboidrato conjugado a BSA corado com Prata; 2 – Carboidrato conjugado a BSA corado com Schiff.

O perfil eletroforético da amostra de BSA conjugada a carboidratos foi testado em uma única concentração e como esperado evidenciou duas bandas de pesos moleculares de ~70 kDa. A utilização da coloração com Prata evidenciou a composição proteica desse

glicoconjugado e a coloração de Schiff através do processo de oxidação foi capaz de demonstrar a presença de carboidratos.

5.11 Antigenicidade de carboidratos conjugados a BSA

A formação do glicoconjugado BSA-carboidrato possibilitou a imobilização da fração obtida em suporte sólido o que permitiu avaliar seu potencial antigênico. Uma curva de diluição (base 2) foi utilizada para a imobilização da amostra de carboidratos conjugados a BSA. A reação ocorreu contra soro de coelho imunizado contra extrato total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*. Os resultados estão demonstrados na Figura 24.

Figura 24 – Detecção de anticorpos IgG anti-leishmania em amostras de soro de coelho imunizado. Os pontos representam a curva de diluição usada na sensibilização da amostra de carboidrato conjugado a BSA. EAT – Extrato antigênico total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, utilizado como controle.

Foram testadas duas amostras do complexo carboidrato-BSA nomeadas 1 e 2, e uma amostra de extrato antigênico total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* como controle da reação. Os resultados mostraram que a imobilização do complexo formado pela conjugação de moléculas de carboidrato a moléculas de BSA em suporte sólido foi eficiente. A detecção de IgG anti-leishmania ocorreu de forma gradual para a curva de diluição de amostras do glicoconjugado carboidrato-BSA e para o extrato antigênico total. Maiores níveis de anticorpos IgG anti-leishmania foram observados para as maiores concentrações usadas na sensibilização. A amostra de extrato antigênico total usada como controle apresentou menores níveis de detecção de IgG anti-leishmania quando comparada a amostras do complexo carboidrato-BSA. Não houve diferença significativa entre as amostras do complexo carboidrato-BSA testadas para a detecção de IgG anti-leishmania, interessante ressaltar que para a curva testada a detecção de IgG anti-leishmania foi elevada mesmo para maiores diluições usadas na sensibilização.

5.12 Detecção de anticorpos IgG anti-leishmania contra frações isoladas de proteínas e carboidratos presentes no extrato total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* em amostras de soro de hamster com infecção experimental

Após a confirmação do potencial antigênico apresentado por frações isoladas de carboidratos conjugados a BSA e proteínas presentes no extrato total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, amostras de soro de hamster com infecção experimental aos 15, 30, 45, 60 e 90 dias de infecção foram testadas para detecção de anticorpos IgG anti-leishmania em ELISA. Os resultados foram analisados de forma geral utilizando todas as amostras testadas e a diferença de reatividade encontrada entre as frações antigênicas foi também evidenciada através de análise comparativa entre as amostras e estão demonstradas no Figura 25.

Figura 25 – Detecção de anticorpos IgG anti-leishmania e avaliação de reatividade de amostras de soro de hamster entre frações antigênicas isoladas compostas por proteínas e carboidratos. Os pontos fechados representam a reatividade a fração antigênica proteica e pontos abertos representam reatividade a fração antigênica composta por carboidratos. A – Comparação de reatividade total; B – Comparação entre amostras mais reativas ao antígeno composto por carboidratos e C – Comparação entre amostras mais reativas ao antígeno proteico.

A análise da comparação total entre as amostras testadas mostrou maior reatividade para o antígeno proteico, com $p < 0,0001$. Diferenças de reatividade entre as amostras foram encontradas para as duas frações antigênicas testadas, com 75% (54/72) das amostras mais reativas para o antígeno proteico e 23,7% (17/72) das amostras mais reativas para o antígeno composto por carboidratos. Não houve diferença de reatividade entre as frações antigênicas testadas em 1,3% (1/72) das amostras. A comparação de resultados para a detecção de anticorpos IgG anti-leishmania das frações antigênicas isoladas compostas por proteínas e carboidratos para cada período após infecção testado está demonstrada no Figura 26.

Figura 26 – Detecção de anticorpos IgG anti-leishmania em soro de hamster experimentalmente infectados. Cada ponto representa uma amostra testada aos 15, 30, 45, 60 e 90 dias pós infecção. Círculos fechados representam fração de proteínas e os círculos abertos representam fração de carboidratos conjugados a BSA.

Os resultados mostraram diferentes perfis de reatividade entre as frações antigênicas testadas (carboidratos e proteínas) para os diferentes períodos pós infecção. Foi evidente o aumento na detecção dos níveis de anticorpos IgG anti-leishmania com o decorrer da infecção tanto para anticorpos específicos contra proteínas, como para

carboidratos. A reatividade observada entre antígenos proteicos e carboidratos foi relativamente semelhante entre os períodos e apresentou diferença estatística quando os resultados foram comparados, apresentando significância entre os dados para todos os períodos pós infecção com $p < 0,001$ e alta correlação de Pearson com $r^2 0,83$.

A fim de verificar o perfil de avidéz específico para as frações de proteínas e carboidratos, foram realizados testes para a determinação da avidéz de anticorpos IgG anti-leishmania em ELISA, os resultados estão demonstrados na Figura 27.

Figura 27 – Determinação da avidéz de anticorpos IgG anti-leishmania em amostras de soro de hamster com infecção experimental ao 15, 30, 45, 60 e 90 dias de infecção. Cada ponto representa a média da porcentagem de avidéz de IgG para cada período após infecção. A linha contínua com pontos abertos representa a avidéz de IgG para carboidratos e a linha contínua com pontos fechados representa a avidéz de IgG para proteínas.

A comparação entre as médias dos resultados de avidéz de anticorpos IgG anti-leishmania para os antígenos proteicos e carboidratos mostrou um perfil de alta avidéz

(superior a 80%) para todos os períodos após infecção, inclusive aos 15 dias. Houve diferença significativa entre os resultados de avides para amostras testadas contra proteínas e carboidratos quando as curvas foram comparadas, com $p < 0,018$. A maior diferença encontrada entre a porcentagem média para os períodos testados foi de 13,2% aos 15 dias de infecção, em que a avides de anticorpos IgG anti-leishmania foi maior para a fração antigênica composta por carboidratos (95,1%) em relação a fração antigênica composta por proteínas (81,9%), porém sem alteração do perfil de alta avides.

5.13 Determinação da presença de imunocomplexos circulantes em amostras de soro de hamster experimentalmente infectados com promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* usando fração de antigênica composta por carboidratos

Considerando as características da fração antigênica composta por carboidratos e a especificidade de reatividade demonstrada por anticorpos IgG durante a infecção experimental, decidimos avaliar a presença de imunocomplexos circulantes utilizando a fração antigênica composta por carboidratos. A presença de imunocomplexos circulantes foi realizada por ELISA dissociativo através da determinação de incremento de anticorpos IgG específicos. Foram utilizadas 72 amostras de soro de hamster com infecção experimental aos 15, 30, 45, 60 e 90 dias de infecção. As amostras de soro foram testadas em ELISA convencional (ELISAc) e ELISA dissociativo (ELISAd). Os resultados estão demonstrados na Figura 28.

Figura 28 – Correlação de resultados de ELISAc e ELISAd, mostrando a distribuição das amostras de hamster. ELISAd – detecção de anticorpos IgG após dissociação (incremento de IgG) e ELISAc detecção de anticorpos IgG.

Os resultados mostram a dispersão de pontos significativos, os quais representam amostras que apresentaram incremento de IgG no teste dissociativo. Os dados obtidos foram analisados através de regressão linear, apresentando uma correlação de Pearson direta entre os testes com $r^2 = 0,88$ e alta significância ($p < 0.0001$). Das 72 amostras testadas, 33 apresentaram incremento de IgG anti-leishmania para o ELISAd, indicando a presença de imunocomplexos circulantes. A comparação entre as médias de leituras das amostras que apresentaram incremento de IgG e a porcentagem de incremento de IgG estão demonstrados pelo Figura 29.

Figura 29 – Comparação entre resultados de amostras de soro de hamster experimentalmente infectados com incremento de IgG, os pontos representam os períodos após infecção (15, 30, 45, 60 e 90 dias) e as médias das amostras. A linha com círculos abertos representa a detecção de IgG em ELISA convencional, a linha com pontos fechados representa a detecção de IgG em ELISA dissociativo e a linha tracejada com triângulos representa a porcentagem de incremento de IgG nas amostras.

As amostras com incremento de IgG apresentaram elevados níveis de anticorpos IgG anti-leishmania em todos os períodos de infecção em ELISAc e ELISAd, inclusive aos 15 dias. Apesar de altos níveis de anticorpos IgG detectados aos 15 dias de infecção, a porcentagem de incremento observada indica uma ocorrência mínima de imunocomplexos circulantes (1%). A porcentagem de incremento de IgG mostrou-se mais elevada para os demais períodos pós infecção e a interferência por imunocomplexos circulantes aos 30, 45, 60 e 90 dias de infecção foi de 9%, 13%, 10% e 15%, respectivamente.

6 DISCUSSÃO

Nossos dados demonstraram a detecção de antígenos circulantes em amostras de soro de hamster com infecção experimental por *L. (L.) infantum chagasi* em ELISA *sandwich*, o qual apresentou resultados promissores, porém com baixa sensibilidade. A baixa sensibilidade detectada foi um resultado inesperado e associados a presença de altas concentrações de anticorpos IgG anti-leishmania detectados durante a infecção experimental. Diante desses resultados foi identificada a necessidade de uma avaliação relacionada a processos específicos envolvidos na resposta imune humoral durante a LV experimental, considerando principalmente a especificidade de anticorpos IgG a proteínas e carboidratos antigênicos e a presença de imunocomplexos circulantes, formados por carboidratos durante a LV, avaliando a influência desses aspectos em testes sorológicos convencionais.

A caracterização do extrato antigênico total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* foi a etapa inicial e sua obtenção foi realizada por duas técnicas distintas, a etapa seguinte foi a avaliação de antigenicidade do extrato solúvel e do perfil eletroforético usando amostras de soro dos grupos de trabalho. O tampão químico lisante usado para a obtenção do extrato antigênico total foi utilizado e aplicado em teste ELISA em um estudo anterior (de Carvalho et al., 2013) e posteriormente empregado em outro trabalho relacionado a detecção de anticorpos IgG anti-leishmania e anti-tripanosoma em amostras de soro de cães (Moraes et al., 2013), os quais apresentaram alta eficiência na detecção de anticorpos anti-leishmania em seus resultados, corroborando com nossos resultados atuais. O método de obtenção de extrato antigênico por sonicação foi descrito em 1978 por Camargo e colaboradores, em estudo que empregou o teste ELISA para a detecção de anticorpos IgG e IgM anti-toxoplasma, no qual a comparação dos resultados entre o método em questão e testes comerciais permitiu a verificação da manutenção de antigenicidade do extrato total e confirmação da eficácia na detecção de anticorpos específicos. Essas informações associadas aos resultados de antigenicidade das amostras de extrato total demonstrados em nossos experimentos e a facilidade de aplicação do método, embasaram a escolha da lise de promastigotas por ação de tampão químico como nossa técnica de trabalho.

Uma importante etapa para a caracterização do extrato antigênico total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* foi a determinação do perfil eletroforético do mesmo, o qual evidenciou um diversificado perfil de bandas proteicas, as quais apresentaram correspondência com proteínas já descritas e identificadas em promastigotas, como por exemplo a gp63 (Morales et al., 1997) e proteínas de choque térmico, denominadas Hsp (de Andrade et al., 1992). O conhecimento do perfil eletroforético do extrato total de promastigotas permitiu a identificação de moléculas e seu potencial antigênico, informações que foram importantes na padronização dos testes que realizamos para a detecção de anticorpos IgG anti-leishmania em amostras de soro. A antigenicidade do extrato total de promastigotas foi testada pelo método de *Western Blotting* e nossos resultados mostraram diferentes perfis de reatividade para diversas moléculas, essa diversidade encontrada está associada a características individuais e também ao período de infecção, já que a evolução temporal da doença mostrou-se como um fator importante para o reconhecimento de um maior número de antígenos. As diferenças de reatividade detectadas para o perfil de proteínas do extrato antigênico total de promastigotas, podem estar associadas a características como ao repertório individual de anticorpos IgG anti-leishmania, antigenicidade específica de moléculas e ainda ao período de infecção do hospedeiro. A avaliação específica de antigenicidade de moléculas presentes no extrato total de promastigotas de *Leishmania spp.* é de suma importância para a identificação e caracterização de antígenos empregados nos vários métodos disponíveis para o diagnóstico sorológico da LV. O potencial antigênico de moléculas de *Leishmania spp.* está amplamente descrito e foi explorado em estudos para a identificação de novos antígenos, testados contra diferentes perfis de amostras (Kumar et al., 2012), assim como realizado em nosso trabalho, o qual evidenciou a antigenicidade de diferentes moléculas para amostras de grupos experimentalmente e naturalmente infectados, confirmando a manutenção do potencial antigênico do extrato total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* utilizado.

O teste ELISA é amplamente empregado no diagnóstico laboratorial da LV e quando associado a dados clínicos e epidemiológicos mostra-se eficiente para estudos epidemiológicos e como auxiliar no diagnóstico. A antigenicidade do extrato total de promastigotas em nossos experimentos foi avaliada em ELISA através da detecção de anticorpos IgG anti-leishmania, assim como demonstrado nos resultados obtidos para o método de *Western Blotting*, os resultados da sorologia apresentaram total distinção na

identificação de amostras positivas e negativas em grupos com infecção experimental e natural. A facilidade no desenvolvimento e aplicação da técnica confere ao ELISA inúmeros estudos relacionados a detecção de anticorpos IgG anti-leishmania, assim como em nossos experimentos este foi o método de escolha para outros trabalhos, como por exemplo, um estudo epidemiológico em área endêmica para LV que usou o teste ELISA como referência para realização de inquérito sorológico em amostras de cães assintomáticos na China, em que os resultados sorológicos foram comparados a testes de PCR e apresentou cerca de 7% de concordância (Zhao et al., 2016). Outro trabalho de levantamento epidemiológico realizado na região nordeste do Brasil, apresentou uma positividade de 17% da população canina testada por ELISA, contra 2% de positividade para o PCR (Brito et al., 2016). Uma possível discrepância entre estes resultados pode estar relacionada a menor sensibilidade do PCR que só é positivo na doença manifesta e pode ter seus níveis de sensibilidade variáveis de acordo com a amostra utilizada. Vale ressaltar que os resultados de ELISA devem ser analisados dentro de um extenso contexto de critérios, que devem incluir parâmetros como sensibilidade e especificidade do teste e características da população de estudo, entre outros.

A infecção experimental em hamsteres foi confirmada pela determinação da carga parasitária individual e pela detecção de anticorpos IgG anti-leishmania aos 15, 30, 45, 60 e 90 dias após a infecção e os resultados mostraram aumento gradual dos parâmetros analisados (de Carvalho et al., 2013). A susceptibilidade do hamster como modelo experimental da LV é amplamente explorada para muitos aspectos da infecção, como descrito em estudo anterior que foi concordante com nossos resultados, em que grupos de hamsteres experimentalmente infectados por diferentes vias de inoculação foram seguidos por longos períodos e a progressão da doença foi avaliada através da determinação da carga parasitária e o estabelecimento de resposta imune humoral através da detecção de anticorpos IgG anti-leishmania (Moreira et al., 2012). A detecção de anticorpos IgG anti-leishmania em outros grupos de amostras foi realizada em levantamentos sorológicos e para o diagnóstico de LV por várias metodologias em amostras de cães e homem (Ozensoy Töz S et al., 2009; Laurenti et al., 2014) e mostraram alta eficiência na detecção de anticorpos IgG anti-leishmania, corroborando desta maneira com os resultados por nós obtidos para o grupo de cães.

A disponibilidade de anticorpos IgG anti-leishmania selecionados por afinidade a antígenos do extrato total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* mostrou-se como

etapa essencial para o desenvolvimento e padronização de testes de captura e avaliação de especificidade antigênica de moléculas. A seleção de anticorpos IgG por afinidade, pode ser realizada por diferentes métodos como purificação por afinidade em sistemas cromatográficos utilizando proteína G (Nejad-Moghaddam, Abolhassani, 2009), proteína A (Abdel-Rahman et al., 2017) e antígenos, o que confere ao processo de purificação alto grau de pureza das amostras (Lin et al., 2013). O uso de partículas magnéticas vem sendo cada vez mais explorado na purificação e conjugação de proteínas a vários elementos. Entre esses processos destaca-se a conjugação de anticorpos a drogas anticâncer, método que utiliza a seleção de moléculas por afinidade através de ligação específica que ocorre através da interação entre grupamentos químicos, como terminais amina e tiol primários (Flygare et al., 2013), assim como o modelo de conjugação utilizado na seleção de anticorpos por afinidade realizada em nossos experimentos. Outra vantagem é o alto rendimento e ainda o fato de a técnica ser considerada simples, envolvendo etapas de incubação e eluição da proteína de estudo (Nath et al., 2015). Em nossos experimentos a seleção e purificação de anticorpos IgG anti-leishmania ocorreu por seleção em pH 7,2 e 5,0, através da interação por afinidade à antígenos do extrato total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* acoplados a partículas magnéticas. Anticorpos selecionados foram testados em ELISA e os resultados mostraram que o processo de seleção não afeta a reatividade dos mesmos. Os níveis de anticorpos IgG anti-leishmania selecionados em pH ácido indicam que a interação antígeno-anticorpo é limitada e que somente uma parcela desses anticorpos possui capacidade de ligação nestas condições, o que atribui a esses anticorpos maior afinidade ou avidéz. A diferença de reatividade encontrada nos dois perfis de anticorpos selecionados, provavelmente está associada à capacidade de interação com antígenos em condições consideradas normais ou desfavoráveis. A seleção de anticorpos IgG através da interação com partículas magnéticas também foi utilizada em estudo que demonstrou a especificidade de ligação e a manutenção da bioatividade de anticorpos em teste ELISA (Lin et al., 2013), o que corroborou com os métodos e resultados aqui demonstrados. Os testes para captura de antígenos por anticorpos IgG anti-leishmania purificados foram realizados usando diluições seriadas e os resultados mostraram alta capacidade de detecção para baixas concentrações de antígenos, as quais variaram de acordo com a concentração de IgG utilizada, inclusive para menores concentrações de anticorpos, porém com diminuição em sua capacidade de detecção. Nossos resultados foram semelhantes aos demonstrados por Ikegami e colaboradores (2003), que utilizou baixas concentrações de antígenos virais e ainda assim os detectou

em sistema de captura por anticorpos específicos.

Anticorpos IgG anti-leishmania purificados por afinidade foram utilizados em teste ELISA de captura para antígenos em sistema *sandwich* e de detecção direta em nossos experimentos. A detecção de antígenos circulantes durante a LV mostra-se como uma ferramenta importante para o diagnóstico da doença, pois consegue identificar doença ativa e pode ainda ser utilizada para o monitoramento de tratamento e cura de pacientes. Assim como em nosso trabalho a detecção de antígenos circulantes em amostras de soro provenientes de área endêmica para a LV foi realizada utilizando como base o ensaio “*sandwich*”, porém em teste imunocromatográfico e apresentou elevada sensibilidade quando comparada a testes comerciais, principalmente quando utilizado para analisar a eficácia do tratamento (Gao et al., 2015). Outro estudo avaliou a detecção de antígenos usando sistema de captura por anticorpos IgG anti-leishmania, assim como em nossos experimentos a produção desses anticorpos foi realizada *in vivo* através de imunização em coelhos, porém a purificação dos mesmos foi realizada através de afinidade a proteína G e apresentou altos índices de sensibilidade, porém com menores índices de especificidade e baixa concordância quando comparado a testes comerciais (Vallur et al., 2015). A variação nos índices de especificidade relatada, pode estar associada ao sistema de purificação de anticorpos utilizado, no qual a afinidade a proteína G foi usada, diferente do sistema utilizado em nossos experimentos, que foram baseados na purificação por afinidade à antígenos do parasito. Anticorpos IgG anti-leishmania purificados por afinidade, também foram utilizados na detecção de antígenos urinários em pacientes com LV em sistema de aglutinação em partículas de látex, o qual demonstrou 100% de especificidade (Attar et al., 2001). Um aspecto interessante é que o destino de antígenos circulantes é a fagocitose por células imunes, através da associação entre imunoglobulinas e moléculas de antígenos, o que seria esperável na LV, que tem altos níveis de anticorpos. A detecção de antígenos circulantes quando comparada a estudos para detecção de anticorpos específicos na LV é pouco explorada na literatura, esse cenário se deve em parte as dificuldades de padronização relacionadas aos sistemas de diagnóstico, a complexidade envolvida na resposta imune humoral durante a LV e a presença de imunocomplexos circulantes. Uma outra abordagem utilizada para a detecção de antígenos foi realizada em urina de pacientes com LV usando a técnica de aglutinação em partículas de látex (Sarkari et al., 2002). Este estudo caracterizou esses antígenos como carboidratos de baixo peso molecular através de técnicas de precipitação e

marcação específica com biotina hidrazida (Sarkari et al., 2002).

A captura de antígenos em amostras de soro de hamster experimentalmente infectados foi realizada em ELISA *sandwich* e nossos resultados mostraram maior positividade aos 30 dias de infecção, fato que pode estar associado a um estágio crítico de progressão e início da doença que corresponderia à fase aguda em hospedeiros susceptíveis. Os períodos de 15, 60 e 90 dias de infecção apresentaram menor proporção de resultados positivos em relação ao período de 30 dias. Os resultados foram concordantes com um estudo anterior que mostrou sucesso na detecção de antígenos específicos de *Leishmania donovani* em camundongos aos 30, 60 e 90 dias de infecção utilizando anticorpos IgG selecionados por afinidade em ELISA de captura (Kaur, Kaur, 2013). A presença de antígenos na LV experimental também foi demonstrada em ratos através da detecção de antígenos urinários, em que o sistema detectou amostras positivas 1 semana após infecção e ao longo de 26 semanas e foi negativo após início de tratamento (Attar et al., 2001). Esses resultados foram concordantes com os demonstrados em nosso experimento, o qual foi capaz de detectar antígenos ao longo da infecção experimental em hamster.

Um fator limitante na captura de antígenos é a presença de imunocomplexos circulantes nas amostras testadas, característica que pode comprometer os resultados devido ao bloqueio de epítomos antigênicos por anticorpos IgG anti-leishmania do hospedeiro. A maior positividade encontrada para o período de 30 dias após infecção sugere uma associação entre a presença de antígenos circulantes livres com uma maior produção de anticorpos IgG anti-leishmania como descrito anteriormente. A associação relatada sugere a formação de imunocomplexos neste período e essa condição pode influenciar de forma negativa a detecção de antígenos e anticorpos IgG em método sorológico convencional.

A formação de imunocomplexos circulantes tem origem a partir do processo de reatividade específica entre antígenos e anticorpos e é de suma importância para os estudos de diversas condições patológicas. Entretanto, a detecção dos mesmos em amostras de soro é complexa e características distintas para cada modelo patológico estudado devem ser consideradas. A detecção de imunocomplexos circulantes é amplamente descrita em várias doenças, como por exemplo na síndrome fosfolipídica (Martínez-Flores et al., 2015), artrite reumatoide (Szittner et al., 2016), tuberculose (Imaz

et al., 2008), doença de Alzheimer (Gustaw et al., 2008), doenças alérgicas (Paganelli et al., 1981), entre outras. Estes estudos utilizaram diferentes métodos de detecção, que podem ser diretos, indiretos e ainda incluir etapas de dissociação prévias. A detecção direta de imunocomplexos circulantes foi avaliada em ELISA de captura em amostras de soro de hamster com infecção experimental, mostrando baixa sensibilidade. Esses resultados podem estar relacionados às características de interação de anticorpos IgG anti-leishmania, como afinidade e avidéz à epítomos específicos e também à presença de uma população heterogênea de imunocomplexos em um mesmo animal ao longo do tempo em cada amostra. Assim como realizado em nossos experimentos a detecção de imunocomplexos circulantes em teste direto utilizando anticorpos secundários espécie-específico marcados com peroxidase, também foi realizada por Martinez-Flores e Colaboradores (2015), em que os resultados não mostraram a presença de imunocomplexos circulantes e os autores atribuíram a essa situação a possibilidade de que os anticorpos usados na captura não estavam puros o suficiente e/ou também a rápida eliminação desses imunocomplexos da circulação dos pacientes testados (Martínez-Flores et al., 2015). Assim como relatado e discutido anteriormente, a detecção de imunocomplexos circulantes em amostras de soro é complexa e pode ser influenciada por vários aspectos. Fatores determinantes para a detecção de imunocomplexos em amostras de sangue, são o tamanho e principalmente o período de circulação dos mesmos (Johansson et al., 2002). Foi demonstrado que a formação, degradação e excreção de imunocomplexos circulantes pode ocorrer em um período de 24 horas e que seu tamanho e composição, são fatores essenciais para os processos de eliminação (Johansson et al., 2002).

Resultados de seleção por afinidade e captura de antígenos circulantes livres e imunocomplexos circulantes não dissociados, levaram a necessidade de determinar o perfil de avidéz de anticorpos IgG durante a LV. Essas informações mostraram-se essenciais para o estabelecimento de condições metodológicas utilizadas durante a padronização de testes e para a compreensão dos mecanismos que envolvem o clareamento de antígenos e consequente formação de imunocomplexos circulantes durante a LV. Para o proposto, a avidéz de anticorpos IgG anti-leishmania foi avaliada em modelos distintos, na infecção experimental em hamster e na infecção natural em cão. A determinação da avidéz de anticorpos IgG é útil na discriminação entre fases agudas e crônicas de várias doenças, particularmente em doenças congênitas, tais como

toxoplasmose (Emelia et al., 2014) e rubéola (De Santis et al., 2006).

A avidéz de anticorpos IgG durante a LV é pouco explorada e esse fato está associado com a natureza evolutiva da doença. A distinção da fase sintomática e assintomática na LV foi estudada em pacientes de diferentes áreas endêmicas do Brasil, com variadas apresentações clínicas da doença e seus resultados mostraram diferentes perfis na maturação de anticorpos IgG anti-leishmania (Tiburcio et al., 2013). Outro estudo que utilizou a avidéz de anticorpos IgG como marcador de fases durante a LV em pacientes sintomáticos, crônicos e resistentes ao tratamento, destacou a diferença entre os perfis de maturação entre os grupos, bem como características individuais, especialmente em pacientes sintomáticos (Redhu et al., 2006). A determinação da avidéz de anticorpos IgG anti-leishmania também foi utilizada como referência para classificação entre fases sintomática e assintomática durante a LV canina e associou esta medida à carga parasitária, mostrando que altos níveis de avidéz estão associados com alto parasitismo (Teixeira Neto et al., 2010). Nossos resultados mostraram predominância de anticorpos de média-alta avidéz, geralmente em níveis superiores a 50% em todos os períodos da infecção experimental em hamster. O papel de anticorpos no combate a LV é um tema controverso, pois a hipergamaglobulinemia, característica encontrada durante a doença, não se mostra eficiente para a eliminação do parasito. A presença de anticorpos de alta avidéz aos 15 dias e a manutenção deste perfil ao longo da infecção experimental indica a ineficiência deste modelo diagnóstico na associação entre anticorpos IgG de baixa avidéz e infecção ativa e anticorpos IgG de alta avidéz e infecção passada, condição que pode estar associada à especificidade de epítomos antigênicos envolvidos na ativação de resposta imune humoral e também na hipergamaglobulinemia encontrada na LV, com influência direta na formação de imunocomplexos circulantes. Interessante ressaltar que o perfil de avidéz de anticorpos IgG anti-leishmania observados em nossos experimentos não condiz com a maturação evolutiva descrita em modelos clássicos, já que se espera uma relação entre a maturação dos mesmos e a evolução temporal de uma doença. Em amostras de cães com infecção natural, assim como para o grupo de hamsteres com infecção experimental a avidéz foi classificada como média-alta para a maioria das amostras analisadas. A avidéz de anticorpos IgG anti-leishmania foi relatada em estudo desenvolvido com grupos de cães sintomáticos e assintomáticos para LV e associou os altos níveis de anticorpos detectados com altos índices de avidéz em amostras de soros de cães sintomáticos (Teixeira Neto et al., 2010). Diferentemente das amostras com

infecção experimental, para amostras com infecção natural não foi possível estabelecer uma relação entre maturação de anticorpos IgG anti-leishmania e a evolução temporal da doença.

Altas concentrações de anticorpos IgG específicos foram encontrados em amostras de soro de hamster e cão, o que sugere quadros de hipergamaglobulinemia nesses grupos. A hipergamaglobulinemia é frequentemente relatada em estudos que abrangem aspectos imunológicos e sorológicos na LV, como exemplo, podem ser citados estudos de ativação policlonal de linfócitos B e produção de anticorpos específicos em hamster (Bunn-Moreno et al., 1985) e em estudo de características clínicas e sorológicas em cães naturalmente infectados com *Leishmania chagasi* (Almeida et al., 2005). O aumento da porcentagem de avidéz ao longo da curva de diluição foi evidente para algumas amostras em nossos resultados e sugere que a presença de altas concentrações de anticorpos IgG anti-leishmania ou quadros que sugerem hipergamaglobulinemia podem interferir na determinação de resultados de avidéz. A utilização de diluições em testes para a determinação de avidéz de anticorpos IgG anti-leishmania pode fornecer dados mais realísticos de uma amostra.

Devido aos resultados obtidos para os ensaios que avaliaram o perfil de avidéz e maturação de anticorpos IgG anti-leishmania associados à confirmação da influência da concentração sérica dos mesmos, partimos para uma abordagem em que a antigenicidade específica de moléculas presentes no extrato total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* foi testada com o propósito de esclarecer os processos de interação antígeno-anticorpo que ocorrem durante a LV, tendo como objetivo verificar a influência desses processos nos resultados obtidos em testes sorológicos. Essa ideia considerou principalmente a diversa composição biológica de moléculas presentes no parasito e a possível influência da concentração, perfil de maturação e especificidade de anticorpos IgG anti-leishmania identificados em nossos resultados. A reatividade específica de anticorpos IgG a diversas proteínas do extrato antigênico total de *Leishmania spp.* está amplamente relatada na literatura, entretanto a interação entre carboidratos antigênicos e anticorpos IgG e sua influência na formação de imunocomplexos circulantes é escassamente estudada na LV. Este fato é devido às dificuldades encontradas nos processos de isolamento e quantificação de carboidratos, cujas técnicas são antigas e pouco sensíveis.

O fracionamento e purificação de moléculas por sistemas cromatográficos é frequentemente utilizado para o isolamento de antígenos. Em nosso trabalho a fração composta por carboidratos presentes no extrato antigênico total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* foi isolada em sistemas de gel filtração para exclusão molecular em sistema cromatográfico, assim como usado por Tabatabaee e colaboradores (2011), em que antígenos secretados de culturas de *Leishmania major* foram fracionados e semi-purificados em sistemas de gel filtração e essas frações foram usadas em estudo da proliferação linfocítica e sua influência nas respostas TH1 e TH2. A quantificação de carboidratos foi realizada em nossos experimentos e o método utilizado foi fundamentado na oxidação de açúcares através do método de Schiff usando como referência, o trabalho que padronizou esta técnica para uso em microplacas (Kilcoyne et al., 2011), a qual concluiu que a simplicidade do método combinado com o baixo consumo de amostra, é perfeitamente aplicável a quantificação e triagem para amostras de carboidratos.

A quantificação de carboidratos por nós realizada usou cada fração obtida no processo de isolamento de moléculas e foi capaz de detectar concentrações máximas de ~1 mg/ml, que variou de acordo com a fração coletada. A quantificação de carboidratos foi também usada em outro estudo sobre isolamento de antígenos contendo carboidratos de *Leishmania braziliensis* para uso em diagnóstico, a qual foi capaz de detectar concentrações 24.3 mg% de açúcares totais (Silveira, Kemmelmeir, 1995). A diferença entre os resultados pode ser atribuída a quantidade de massa ou parasitas utilizados como matriz para dosagem, no trabalho citado como exemplo, cerca de 56g de massa de parasitos foram usados, enquanto nossa referência inicial se baseou em concentração proteica (~2 mg/ml).

A cromatografia de exclusão molecular do extrato total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* possibilitou a identificação de perfis de proteínas e carboidratos antigênicos. O isolamento das frações possibilitou avaliar a antigenicidade específica de proteínas e carboidratos, através da detecção de anticorpos IgG anti-leishmania em amostra de soro de coelho imunizado, em que os resultados evidenciaram a eficiência do isolamento das frações em cromatografia, através da especificidade de captura obtida, demonstrada pela biotinação específica dos perfis de antígenos testados, assim como realizado por de Souza e colaboradores (2012) que utilizou o ELISA para avaliar antígenos recombinantes purificados em sistema cromatográfico na pesquisa de anticorpos IgG anti-leishmania em amostras de cães. A marcação de moléculas biológicas com biotina é

amplamente utilizada e permite a identificação das mesmas através de conjugações específicas, sua afinidade pela avidina permite sua aplicação em sistemas diagnósticos de alta resolução através da amplificação de sinal fornecida pelo complexo biotina-avidina.

Menores sinais observados para amostras de carboidratos biotinilados nos testes de detecção e antigenicidade foram associados a composição estrutural dessas moléculas, o que limita a quantidade de moléculas de biotina conjugadas a moléculas de carboidrato, outro fator importante e influenciador de resultados de detecção de biotinilação é a capacidade de ligação deste tipo de biomolécula ao suporte sólido por nós utilizado.

Para excluir a possibilidade de contaminação entre as frações de proteínas e carboidratos, foi realizado um experimento utilizando a fração composta por carboidratos biotinilada especificamente para moléculas proteicas, e isso confirmou a antigenicidade específica atribuída a fração composta por carboidratos. Neste experimento os resultados mostram que a escolha de uma diluição adequada de trabalho elimina moléculas proteicas interferentes nesta fração, conferindo desta maneira maior especificidade ao antígeno testado.

Limitações relacionadas a ligação de moléculas de carboidratos a placas de poliestireno não permitiram uma avaliação inicial adequada da detecção dessas moléculas após biotinilação (dados não mostrados). Entretanto, moléculas de carboidratos foram conjugadas a moléculas de BSA e a formação deste complexo nos permitiu uma melhor avaliação relacionada a sua identificação e posterior aplicação em testes para a avaliação de antigenicidade. A conjugação de frações de carboidratos a proteínas, é realizada através de processos de oxidação, que formam grupos aldeídos que se ligam a aminas livres presentes em moléculas proteicas. O processo de oxidação antecedeu o método de conjugação realizado em nossos experimentos e originou uma glicoproteína composta por carboidrato e BSA, caracterizada por eletroforese. O perfil eletroforético da glicoproteína carboidrato-BSA evidenciou bandas proteicas entre ~50 e ~75 kDa, resultado que corresponde ao peso molecular de ~66 kDa da albumina, vale ressaltar que o processo de conjugação com outras moléculas altera o peso molecular da albumina, o que confirma a conjugação e foi demonstrado também em trabalho de conjugação entre BSA e moléculas de dextran, que utilizou a coloração específica com o método de Schiff (Xie et al., 2015). Esses dados corroboram com nossos resultados, em que além do exposto através do perfil eletroforético a coloração específica utilizada demonstrou a presença de carboidratos

conjugados a moléculas de BSA. Os carboidratos conjugados a BSA detectaram altas concentrações de anticorpos IgG anti-leishmania em ELISA, método também utilizado em estudo que testou várias concentrações de carboidratos antigênicos na detecção de anticorpos específicos (Xie et al., 2015), esses dados corroboram com nossos resultados. A reatividade entre carboidratos conjugados a BSA e anticorpos IgG anti-leishmania foi constatada e confirma que o processo de oxidação não interfere na manutenção da atividade biológica dessas moléculas, assim como demonstrado por Nakane e Kawaoi (1974) em estudo que avaliou a atividade específica de peroxidase conjugada a anticorpos IgG após oxidação com metaperiodato de sódio.

Após a confirmação de isolamento de proteínas e carboidratos do extrato total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, a antigenicidade destas frações foi avaliada na detecção de anticorpos IgG anti-leishmania em amostras de soro de hamster com infecção experimental. Os resultados indicam diferença de reatividade entre os antígenos testados, também comparamos a reatividade entre antígeno proteico e carboidrato entre os grupos com diferentes períodos de infecção e esta comparação evidenciou reatividade específica entre as amostras. A reatividade específica de anticorpos IgG anti-leishmania a proteínas e carboidratos antigênicos mostra-se como uma característica individual e podem estar associados a fatores como o estágio evolutivo da doença e a carga parasitária, entre outras características. Essas informações mostram-se concordantes com as relatadas em estudo que mostrou que a presença de perfis de anticorpos específicos estão relacionadas a mudanças associadas aos diferentes estágios de progressão da LV, o que pode ocorrer devido a uma maior expressão de proteínas específicas em indivíduos sintomáticos, assintomáticos e curados, em que o diagnóstico deve ser analisado em um contexto que leve em consideração a possibilidade da necessidade do emprego de antígenos específicos (Coelho et al., 2012).

A reatividade específica de anticorpos IgG na LV está amplamente descrita na literatura e abrange a utilização de extrato antigênico total, antígenos específicos e recombinantes em diversas metodologias diagnósticas. A utilização de extrato antigênico total obtido de culturas de promastigotas é empregada em diferentes técnicas sorológicas para a detecção de anticorpos específicos anti-leishmania e apresenta como principal vantagem sua fácil manutenção e ótimo rendimento (Cândido et al., 2008). A utilização de extrato antigênico parcial em sua forma bruta, em geral não é utilizada devido à complexidade na obtenção de quantidades significativas de frações específicas, optando-

se desta forma por técnicas de expressão de proteínas através de recombinação. Todos estes testes dependem do repertório de resposta imune do hospedeiro e sempre apresentam um pequeno número de falso negativos dependentes deste fato. A utilização do extrato antigênico total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* em nossos experimentos mostrou eficiência em testes de detecção e seleção de anticorpos IgG anti-leishmania, por fornecer maior número de epítomos para a reação e diminuindo a possibilidade de falso negativos. Esses testes fornecem somente um panorama geral dos processos de reatividade e especificidade entre antígenos e anticorpos durante a LV, já que a confirmação laboratorial da doença somente ocorre quando testes parasitológicos demonstram a presença de amastigotas em amostras de aspirados de órgãos como o baço, fígado, linfonodo e medula óssea. Entretanto, estes testes conferem risco a pacientes, já que podem ocasionar hemorragias devido a quadros de plaquetopenia desencadeados pela doença. A ocorrência de hemorragia desencadeada por punção em aspirados de baço em pacientes suspeitos para LV, foi descrita em um paciente submetido ao procedimento, o qual foi tratado com transfusão sanguínea (Thakur, 1997).

O estudo da antigenicidade de carboidratos e sua utilização em métodos diagnósticos na LV é pouco explorado, em geral a referência a carboidratos está em estudos para o desenvolvimento de vacinas e estudos relacionados a composição estrutural de moléculas presentes em amastigotas e promastigotas e seu impacto na resposta imune do hospedeiro (Osanya et al., 2011). A resposta imune mediada por carboidratos está descrita em trabalho que avaliou seu potencial ativador no processo de apresentação de antígenos, em que os resultados indicam que essas moléculas foram capazes de induzir processos de proliferação celular *in vitro* (Roychoudhury et al., 2015). Em nossos experimentos foi possível o isolamento e identificação de carboidratos antigênicos presentes em promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, o que se mostra importante para o estudo do papel dessas moléculas diante a interação antígeno-anticorpo e no processo de formação de imunocomplexos circulantes. Essas informações influenciam diretamente no conceito de interpretação de resultados sorológicos usados para o diagnóstico da LV.

A presença de anticorpos IgG anti-leishmania em amostras de soro de hamster experimentalmente infectados com *L. (L.) infantum chagasi* foi demonstrada utilizando frações antigênicas isoladas compostas por proteínas e carboidratos do extrato total de promastigotas. Os resultados mostraram eficiência na detecção de anticorpos IgG

específicos por ambas as frações, apresentando altas absorbâncias detectadas para a maioria das amostras no ELISA. A comparação dos resultados obtidos para as frações de proteínas e carboidratos antigênicos mostrou diferença de reatividade entre as amostras, indicando um perfil específico de anticorpos IgG, como uma característica notável. A utilização de antígenos proteicos é amplamente explorada e relatada em estudos relacionados ao diagnóstico laboratorial da LV, entretanto estudos relacionados ao uso de carboidratos antigênicos e seu emprego em testes diagnósticos é escasso.

A detecção de anticorpos anti-carboidratos em teste imunoenzimático foi realizada em estudo que avaliou níveis de anticorpos IgG α -Galactosyl (anti- α -Gal) como possível marcador para a LV, em que utilizaram amostras humanas provenientes de diversas áreas endêmicas para leishmaniose cutânea na Arábia Saudita, entretanto diferente dos experimentos por nós realizados para este estudo não foram utilizados carboidratos antigênicos de *Leishmania spp.* e sim um antígeno equivalente a um composto carboidrato presente em glicoconjugados desse parasito, com resultados promissores (Al-Salem et al., 2014). A presença natural de anticorpos anti-Gal está relatada em humanos e primatas e corresponde a ~1% das imunoglobulinas totais, como são reativos a carboidratos, estudos vem sendo realizados a fim de elucidar seu papel como um possível marcador ou ainda sua contribuição em fenômenos patológicos, como por exemplo em reações alérgicas, doenças autoimunes, doenças causadas por protozoários, entre outros (Galili, 2013). A reatividade específica de anticorpos IgG anti-leishmania a carboidratos antigênicos de *L. (L.) infantum chagasi* encontrada em nossos experimentos não exclui a presença de anticorpos IgG anti-Gal, principalmente quando considerando que epítomos antigênicos compostos por carboidratos já foram descritos em moléculas de GILP e LPG em *Leishmania spp.* (Avila et al., 1989), entretanto o exposto não foi objeto do nosso estudo.

Outra abordagem para a utilização de carboidratos antigênicos em diagnóstico foi realizada também para o diagnóstico da leishmaniose cutânea usando como método diagnóstico a reação de contraimuno eletroforese, porém os resultados apresentaram baixos índices de sensibilidade e a análise permitiu aos autores sugerirem a utilização desse tipo de antígeno em técnicas com maior sensibilidade como melhor opção para estudos posteriores (Silveira, Kemmelmeier, 1995). A presença de carboidratos antigênicos na LV foi relatada em estudo anterior, que assim como o nosso realizou a caracterização de carboidratos usando experimentos de oxidação e biotinylation

específica, os resultados de captura desses antígenos em amostras de urina de pacientes doentes mostram que o mesmo é altamente específico para o diagnóstico da doença (Sarkari et al., 2002).

Considerando as características específicas de reatividade aos antígenos testados, foi realizado um teste de avidéz específico para proteínas e carboidratos antigênicos, o qual mostrou a presença de anticorpos de alta avidéz para os dois perfis de antígenos em todos os períodos durante a infecção experimental em hamster, o que confirma a idéia de que durante a LV experimental em hamster não ocorre maturação de avidéz para anticorpos IgG específicos. Assim como na determinação de avidéz com o extrato antigênico total, perfis de alta avidéz de anticorpos IgG anti-leishmania foram encontrados para frações de proteínas e carboidratos. A diferença de avidéz detectada para amostras testadas para proteínas e carboidratos antigênicos, confirma os resultados relatados e discutidos anteriormente. Esse perfil de alta avidéz de anticorpos IgG encontrado em nossos resultados, pode estar associado a vias alternativas de ativação de resposta, porém estudos nesta área precisam ser realizados. Perfis de alta avidéz para anticorpos IgG em geral são relatados em períodos tardios em uma infecção, contudo modelos de estudo da resposta imune humoral de pacientes expostos a uma determinada doença ou vacinados, podem apresentar anticorpos de alta avidéz em um período relativamente curto quando exposto novamente ao agente patológico. Essa característica foi demonstrada em estudo que avaliou a avidéz de anticorpos IgG em indivíduos de diferentes faixas etárias vacinados contra cólera, em que a presença de anticorpos de alta avidéz foi confirmada de forma específica a antígenos LPS e CTB aos 21 dias após vacinação, característica essa associada a resposta de células B e T de memória dos hospedeiros (Alam et al., 2013). Assim como realizado em nossos experimentos a avidéz de anticorpos IgG anti-carboidratos foi demonstrada em estudo que avaliou a atividade bactericida a *Salmonella* em amostras de soro de pacientes africanos com HIV, para o proposto os autores utilizaram como antígeno moléculas de LPS de *S. Typhimurium*, em que os resultados mostraram um predomínio de anticorpos IgG de alta avidéz, porém a maturação dos mesmos não foi determinada (Goh et al., 2016).

Em nosso trabalho a presença de imunocomplexos circulantes foi avaliada a fim de verificar a especificidade à antígenos de carboidratos através da determinação de incremento de IgG anti-leishmania em ELISA dissociativo. A presença de imunocomplexos circulantes na LV está relatada em trabalho anterior, o qual padronizou

um teste para determinação de imunocomplexos circulantes através de incremento de IgG em amostras de soro de hamsteres experimentalmente infectados (de Carvalho et al., 2013). Essa abordagem forneceu um panorama geral da presença de imunocomplexos circulantes, já que foi utilizado o extrato antigênico total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*. A compreensão de fatores determinantes a formação de imunocomplexos circulantes são de extrema importância para entendimento da rede complexa que envolve a patogenia da doença e contribui principalmente para o aprimoramento de testes diagnósticos usados para a LV. A determinação de incremento de IgG anti-leishmania em amostras de hamsteres experimentalmente infectados usando a fração de carboidratos antigênicos isolados do extrato antigênico total mostrou a presença de imunocomplexos circulantes em todos os períodos de infecção, com maior predominância aos 90 dias. Nossos resultados foram concordantes com estudo anteriormente realizado, no qual a presença de imunocomplexos circulantes compostos por glicoconjugados foi também demonstrada, caracterizando esses elementos através da precipitação em amostras de soro e demonstração de moléculas através de processo oxidativo e coloração específica para carboidratos em sistema de eletroforese (Datta et al., 2015). A presença de imunocomplexos circulantes em amostras de soro, juntamente com a caracterização molecular dos antígenos envolvidos em sua formação e a determinação do perfil de avididade de anticorpos IgG anti-leishmania, mostram-se como ferramentas para o aprimoramento de técnicas de diagnóstico sorológico, um método em geral menos invasivo que o diagnóstico parasitológico.

Altas concentrações de anticorpos IgG foram detectadas em nossos experimentos, tanto na infecção experimental em hamster, como na infecção natural em cães. Essa condição apresentou influência sobre resultados de testes sorológicos convencionais e especificidades relacionadas a maturação de avididade. Esses resultados ilustram a dificuldade relacionada a compreensão do verdadeiro papel de anticorpos durante a LV, em que as altas concentrações de IgG encontradas não apresentam efetividade no controle da doença. Como especulação, muito pouco foi feito sobre uma eventual participação facilitadora dos anticorpos anti-leishmania na sua evolução para doença plenamente manifesta, mas pouco se tem estudado sobre se facilitam a evolução para doença. Devido ao exposto, é lógico imaginar que não há importância nestes altos títulos de anticorpos, que eles são passivos num processo imune, mas a possibilidade de sua participação na patogênese foi muito pouco explorada, principalmente em relação aos

anticorpos específicos para carboidratos. Por sua dificuldade de detecção específica, estamos com um vazio de pesquisa na área que implica na necessidade destes estudos, os quais contribuem diretamente para a compreensão de processos que permitam esclarecer a participação dos anticorpos anti-carboidratos de leishmania na patogênese da doença. Esta condição, afirma a necessidade de estudos relacionados ao desenvolvimento de métodos diagnósticos para carboidratos de *Leishmania spp.*, para a detecção de anticorpos e antígenos específicos.

Nossos resultados mostraram que o método de dissociação ácida e detecção direta em ELISA foi capaz de identificar uma fração significativa de amostras com a presença de imunocomplexos circulantes específicos, embasando assim os resultados obtidos para os testes de captura de antígeno circulante. Interessante notar que a positividade dos testes para imunocomplexos circulantes específicos à carboidratos antigênicos, antígenos circulantes e o aumento significativo na detecção de anticorpos IgG, ocorreu com maior intensidade aos 30 e 90 dias da infecção experimental, sugerindo que os períodos referidos compreendem importantes processos envolvidos na resposta imune humoral da LV experimental, como a fase aguda e crônica da doença.

Devido a este cenário complexo que envolve processos de maturação de anticorpos IgG, especificidade antigênica e consequentemente reatividade específica, acreditamos que a presença de imunocomplexos circulantes durante a LV está relacionada a combinação de fatores que envolvem a interação patógeno-hospedeiro e características individuais, incluindo fatores de suscetibilidade. A detecção de imunocomplexos circulantes agrega valor à sorologia da LV e contribui para o diagnóstico laboratorial da doença, causando grande impacto em casos específicos, no qual a sorologia é negativa na presença de sintomas e epidemiologia. Os resultados aqui expostos, são informações essenciais para a compreensão da presença e formação de imunocomplexos circulantes e seu impacto em testes diagnósticos convencionais, abrindo caminhos para estudos diversos que compreendem principalmente novas abordagens diagnósticas, indicando que é necessária uma abordagem ampla que envolve os vários aspectos da patogenia da doença, os quais mostram-se como desafios a serem cumpridos e que com certeza exercerão um enorme impacto no diagnóstico laboratorial e sorológico da LV.

7 CONCLUSÕES

7.1 Gerais

- ✓ A detecção de antígenos circulantes em amostras com leishmaniose visceral em testes sorológicos é diretamente influenciada pelas altas concentrações de anticorpos IgG específicos e a formação de imunocomplexos circulantes, em que características de especificidade antigênica devem ser consideradas.

7.2 Específicas

- ✓ A seleção de anticorpos por imunoafinidade, reativos em pH ácido permitiu a identificação de anticorpos IgG de alta avides;
- ✓ A detecção de antígenos e imunocomplexos circulantes na infecção experimental em hamster, mostrou-se positiva para uma pequena fração da população estudada, em que a positividade dos testes relaciona-se a características individuais da resposta imune humoral estabelecida durante a doença;
- ✓ Durante a infecção experimental em hamster, há uma prevalência de anticorpos IgG de alta avides, mesmo em períodos iniciais. Assim como para amostras de cães com infecção natural;

- ✓ A presença desta “alta” avidéz em uma grande parcela das amostras sofreu influência da concentração de anticorpos IgG do soro de animais experimentalmente e naturalmente infectados, mostrando o aumento da reatividade em diluições e variação na determinação de resultados de avidéz em teste sorológico;
- ✓ Além de antígenos proteicos existe uma grande proporção de carboidratos presentes no extrato total de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* que reagem com anticorpos IgG específicos e são purificáveis por exclusão molecular;
- ✓ Estes carboidratos antigênicos podem ser ligados a proteínas carreadoras, originando glicoproteínas e aprimorando desta maneira sua aplicação em ELISA;
- ✓ Altas concentrações de anticorpos IgG anti-carboidratos de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* foram detectados pelo complexo formado por carboidrato-BSA;
- ✓ A avidéz de anticorpos IgG anti-carboidratos de promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* é semelhante à obtida em testes utilizando fração antigênica proteica;
- ✓ Usando técnica dissociativa para o teste ELISA, foi possível demonstrar que imunocomplexos circulantes específicos a carboidratos são frequentes na LV experimental em hamster.

REFERÊNCIAS*

- Abdel-Rahman EH, El-Jakee JK, Hatem ME, Ata NS, Fouad EA. Preparation of goat and rabbit anti-camel immunoglobulin G whole molecule labeled with horseradish peroxidase. *Vet World*. 2017;10(1):92-100.
- Alam MM, Leung DT, Akhtar M, Nazim M, Akter S, Uddin T, Khanam F, Mahbuba DA, Ahmad SM, Bhuiyan TR, Calderwood SB, Ryan ET, Qadri F. Antibody avidity in humoral immune responses in Bangladeshi children and adults following administration of an oral killed cholera vaccine. *Clin Vaccine Immunol*. 2013;20(10):1541-8.
- Alexander B, Maroli M. Control of phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol*. 2003;17(1):1-18.
- Almeida MA, Jesus EE, Sousa-Atta ML, Alves LC, Berne ME, Atta AM. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasitol*. 2005;127(3-4):227-32.
- Al-Salem WS, Ferreira DM, Dyer NA, Alyamani EJ, Balghonaim SM, Al-Mehna AY, Al-Zubiany S, Ibrahim el-K, Al Shahrani AM, Alkhuailed H, Aldahan MA, Al Jarallah AM, Abdelhady SS, Al-Zahrani MH, Almeida IC, Acosta-Serrano A. Detection of high levels of anti- α -galactosyl antibodies in sera of patients with Old World cutaneous leishmaniasis: a possible tool for diagnosis and biomarker for cure in an elimination setting. *Parasitology*. 2014;141(14):1898-903.
- Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B, Jiménez M, Laguna F, López-Vélez R, Molina R, Moreno J. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev*. 1997;10(2):298-319.
- Alves AS, Mouta-Confort E, Figueiredo FB, Oliveira RV, Schubach AO, Madeira MF. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. *Res Vet Sci*. 2012;93(3):1329-33.
- Alves WA, Bevilacqua PD. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. *Cad Saúde Publica*. 2004;20(1):259-65.
- Anam K, Afrin F, Banerjee D, Pramanik N, Guha SK, Goswami RP, Saha SK, Ali N. Differential decline in *Leishmania* membrane antigen-specific immunoglobulin G (IgG), IgM, IgE, and IgG subclass antibodies in Indian kala-azar patients after chemotherapy. *Infect Immun*. 1999;67(12):6663-9.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Antinori S, Calattini S, Piolini R, Longhi E, Bestetti G, Cascio A, Parravicini C, Corbellino M. Is real-time polymerase chain reaction (PCR) more useful than a conventional PCR for the clinical management of leishmaniasis? *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81(1):46-51.

Attar ZJ, Chance ML, el-Safi S, Carney J, Azazy A, El-Hadi M, Dourado C, Hommel M. Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. *Acta Trop.* 2001;78(1):11-6.

Avila JL, Rojas M, Galili U. Immunogenic Gal alpha 1----3Gal carbohydrate epitopes are present on pathogenic American Trypanosoma and Leishmania. *J Immunol.* 1989;142(8):2828-34.

Babakhan L, Mohebbi M, Akhoundi B, Edrissian GH, Keshavarz H. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: a comparative study using fast agglutination screening test (FAST) and direct agglutination test (DAT) in Iran. *Parasitol Res.* 2009;105(3):717-20.

Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniasis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.* 2008;24(7):324-30.

Barbosa Santos ML, Nico D, de Oliveira FA, Barreto AS, Palatnik-de-Sousa I, Carrillo E, Moreno J, de Luca PM, Morrot A, Rosa DS, Palatnik M, Bani-Corrêa C, de Almeida RP, Palatnik-de-Sousa CB. *Leishmania donovani* Nucleoside Hydrolase (NH36) Domains Induce T-Cell Cytokine Responses in Human Visceral Leishmaniasis. *Front Immunol.* 2017;8:227.

Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol.* 2007;37(10):1097-106.

Belo VS, Werneck GL, Barbosa DS, Simões TC, Nascimento BW, da Silva ES, Struchiner CJ. Factors associated with visceral leishmaniasis in the americas: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(4):e2182.

Borghi SM, Fattori V, Conchon-Costa I, Pinge-Filho P, Pavanelli WR, Verri WA Jr. *Leishmania* infection: painful or painless? *Parasitol Res.* 2017;116(2):465-475.

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

Briones E, Colino CI, Lanao JM. Delivery systems to increase the selectivity of antibiotics in phagocytic cells. *J Control Release.* 2008;125(3):210-27.

Brittingham A, Morrison CJ, McMaster WR, McGwire BS, Chang KP, Mosser DM. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J Immunol.* 1995;155(6):3102-11.

Brito FG, Langoni H, Silva RC, Rotondano TE, Melo MA, Paz GS. Canine visceral leishmaniasis in the Northeast Region of Brazil. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2016;22:15.

Brustoloni YM, Cunha RV, Dorval ME, Oshiro ET, Pontes ER, Oliveira AL, Hillebrand L, Ribeiro LF. Comparison of conventional methods for diagnosis of visceral leishmaniasis in children of the Center-West Region of Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2007;11(1):106-9.

Bunn-Moreno MM, Madeira ED, Miller K, Menezes JA, Campos-Neto A. Hypergammaglobulinaemia in *Leishmania donovani* infected hamsters: possible association with a polyclonal activator of B cells and with suppression of T cell function. *Clin Exp Immunol*. 1985;59(2):427-34.

Camargo ME, Ferreira AW, Mineo JR, Takiguti CK, Nakahara OS. Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. *Infect Immun*. 1978;21(1):55-8.

Campos-Neto A, Bunn-Moreno MM. Polyclonal B cell activation in hamsters infected with parasites of the genus *Leishmania*. *Infect Immun*. 1982;38(3):871-6.

Cândido TC, Perri SH, Gerzoschkwitz Tde O, Luvizotto MC, de Lima VM. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on crude and purified antigen in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in symptomatic and oligosymptomatic dogs. *Vet Parasitol*. 2008;157(3-4):175-81.

Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(11):873-82.

Coelho VT, Oliveira JS, Valadares DG, Chávez-Fumagalli MA, Duarte MC, Lage PS, Soto M, Santoro MM, Tavares CA, Fernandes AP, Coelho EA. Identification of proteins in promastigote and amastigote-like *Leishmania* using an immunoproteomic approach. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(1):e1430.

Costa CH. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(2):232-42.

Croft SL, Olliaro P. Leishmaniasis chemotherapy--challenges and opportunities. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(10):1478-83.

Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. *Exp Mol Pathol*. 2002;72(2):132-41.

D'Andrea LA, Fonseca Eda S, Prestes-Carneiro LE, Guimarães RB, Yamashita RC, Soares CN, Hiramoto RM, Tolezano JE. The shadows of a ghost: a survey of canine leishmaniasis in Presidente Prudente and its spatial dispersion in the western region of São Paulo state, an emerging focus of visceral leishmaniasis in Brazil. *BMC Vet Res*. 2015; 11:273.

da Costa AP, Costa FB, Soares HS, Ramirez DG, de Carvalho Araújo A, da Silva Ferreira JJ, Tonhosolo R, Dias RA, Gennari SM, Marcili A. Environmental Factors and Ecosystems Associated with Canine Visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2015;15(12):765-74.

Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Geographical expansion of visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006;39(4):352-6.

Datta S, Modak D, Sarkar S, Saha B, Mukhopadhyay S. Identification and glycobiological characterization of circulating immune complexes in patients with visceral leishmaniasis and post kala azar dermal leishmaniasis. *Indian J Exp Biol.* 2015;53(6):321-8.

Davies CR, Kaye P, Croft SL, Sundar S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. *BMJ.* 2003;326(7385):377-82.

de Andrade CR, Kirchhoff LV, Donelson JE, Otsu K. Recombinant *Leishmania* Hsp90 and Hsp70 are recognized by sera from visceral leishmaniasis patients but not Chagas' disease patients. *J Clin Microbiol.* 1992;30(2):330-5.

de Brito VN, Oliveira CM, Lazari P, Sousa VR. Epidemiological aspects of visceral leishmaniasis in Jaciara, Mato Grosso, Brazil, 2003 to 2012. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2014;23(1):63-8.

de Carvalho CA, Partata AK, Hiramoto RM, Borborema SE, Meireles LR, Nascimento Nd, de Andrade HF Jr. A simple immune complex dissociation ELISA for leishmaniasis: standardization of the assay in experimental models and preliminary results in canine and human samples. *Acta Trop.* 2013;125(2):128-36.

de Freitas JC, Lopes-Neto BE, de Abreu CR, Coura-Vital W, Braga SL, Reis AB, Nunes-Pinheiro DC. Profile of anti-*Leishmania* antibodies related to clinical picture in canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci.* 2012;93(2):705-9.

de Paiva-Cavalcanti M, de Moraes RC, Pessoa-E-Silva R, Trajano-Silva LA, Gonçalves-de-Albuquerque Sda C, Tavares D de H, Brelaz-de-Castro MC, Silva Rde F, Pereira VR. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell Biosci.* 2015;5:31.

De Santis M, Cavaliere AF, Straface G, Caruso A. Rubella infection in pregnancy. *Reprod Toxicol.* 2006;21(4):390-8.

de Souza CM, Silva ED, Ano Bom AP, Bastos RC, Nascimento HJ, da Silva Junior JG. Evaluation of an ELISA for canine leishmaniasis immunodiagnostic using recombinant proteins. *Parasite Immunol.* 2012;34(1):1-7.

den Boer ML, Alvar J, Davidson RN, Ritmeijer K, Balasegaram M. Developments in the treatment of visceral leishmaniasis. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2009;14(3):395-410.

Diniz SA, Silva FL, Carvalho Neta AC, Bueno R, Guerra RM, Abreu-Silva AL, Santos RL. Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. *J Infect Dev Ctries*. 2008;2(1):24-33.

Domínguez M, Moreno I, Aizpurua C, Toraño A. Early mechanisms of *Leishmania* infection in human blood. *Microbes Infect*. 2003;5(6):507-13.

Dos-Santos WL, Jesus EE, Paranhos-Silva M, Pereira AM, Santos JC, Baleeiro CO, Nascimento EG, Moreira ED, Oliveira GG, Pontes-de-Carvalho LC. Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. *Vet Immunol Immunopathol*. 2008;123(3-4):251-9.

Duarte MC, Lage DP, Martins VT, Chávez-Fumagalli MA, Roatt BM, Menezes-Souza D, Goulart LR, Soto M, Tavares CA, Coelho EA. Recent updates and perspectives on approaches for the development of vaccines against visceral leishmaniasis. *Ver Soc Bras Med Trop*. 2016;49(4):398-407.

Emelia O, Rahana AR, Mohamad Firdaus A, Cheng HS, Nursyairah MS, Fatinah AS, Azmawati MN, Siti NA, Aisah MY. IgG avidity assay: a tool for excluding acute toxoplasmosis in prolonged IgM titer sera from pregnant women. *Trop Biomed*. 2014;31(4):633-40.

Elassad AM, Younis SA, Siddig M, Grayson J, Petersen E, Ghalib HW. The significance of blood levels of IgM, IgA, IgG and IgG subclasses in Sudanese visceral leishmaniasis patients. *Clin Exp Immunol*. 1994;95(2):294-9.

Elmahallawy EK, Sampedro Martinez A, Rodriguez-Granger J, Hoyos-Mallecot Y, Agil A, Navarro Mari JM, Gutierrez Fernandez J. Diagnosis of leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries*. 2014;8(8):961-72.

Ferguson MA, Murray P, Rutherford H, McConville MJ. A simple purification of procyclic acidic repetitive protein and demonstration of a sialylated glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor. *Biochem J*. 1993;291(Pt 1):51-5.

Fernández-Pérez FJ, Méndez S, de la Fuente C, Gómez-Muñoz MT, Cuquerella M, Alunda JM. Short report: improved diagnosis and follow-up of canine leishmaniasis using amastigote-based indirect immunofluorescence. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;61(4):652-3.

Ferrua B, Rol N, Michel G, Marty P. Antigenemia in patients with Mediterranean visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 2009;47(11):3760-2.

Flygare JA, Pillow TH, Aristoff P. Antibody-drug conjugates for the treatment of cancer. *Chem Biol Drug Des*. 2013;81(1):113-21.

Furtado MC, Menezes RC, Kiupel M, Madeira MF, Oliveira RV, Langohr IM, Figueiredo FB. Comparative study of in situ hybridization, immunohistochemistry and parasitological culture for the diagnosis of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors*. 2015;8:620.

Galili U. Anti-Gal: an abundant human natural antibody of multiple pathogeneses and clinical benefits. *Immunology*. 2013;140(1):1-11.

Galvão-Castro B, Sá Ferreira JA, Marzochi KF, Marzochi MC, Coutinho G, Lambert PH. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human american visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol*. 1984;56(1):58-66.

Gao CH, Yang YT, Shi F, Wang JY, Steverding D, Wang X. Development of an Immunochromatographic Test for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis Based on Detection of a Circulating Antigen. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(6):e0003902.

Gibson-Corley KN, Boggiatto PM, Bockenstedt MM, Petersen CA, Waldschmidt TJ, Jones DE. Promotion of a functional B cell germinal center response after *Leishmania* species co-infection is associated with lesion resolution. *Am J Pathol*. 2012;180(5):2009-17.

Goh YS, Necchi F, O'Shaughnessy CM, Micoli F, Gavini M, Young SP, Msefula CL, Gondwe EN, Mandala WL, Gordon MA, Saul AJ, MacLennan CA. Bactericidal Immunity to *Salmonella* in Africans and Mechanisms Causing Its Failure in HIV Infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(4):e0004604.

Gollob KJ, Viana AG, Dutra WO. Immunoregulation in human American leishmaniasis: balancing pathology and protection. *Parasite Immunol*. 2014;36(8):367-76.

Gomes YM, Paiva Cavalcanti M, Lira RA, Abath FG, Alves LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet J*. 2008;175(1):45-52.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras. Epidemiol*. 2004;7(3):338-49.

Grech V, Mizzi J, Mangion M, Vella C. Visceral leishmaniasis in Malta--an 18 year paediatric, population based study. *Arch Dis Child*. 2000;82(5):381-5.

Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, Wasunna MK, Bryceson AD. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis*. 2002;2(8):494-501.

Gupta N, Goyal N, Rastogi AK. In vitro cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*. *Trends Parasitol*. 2001;17(3):150-3.

Gustaw KA, Garrett MR, Lee HG, Castellani RJ, Zagorski MG, Prakasam A, Siedlak SL, Zhu X, Perry G, Petersen RB, Friedland RP, Smith MA. Antigen-antibody dissociation in Alzheimer disease: a novel approach to diagnosis. *J Neurochem*. 2008;106(3):1350-6.

Hailu A, van der Poll T, Berhe N, Kager PA. Elevated plasma levels of interferon (IFN)-gamma, IFN-gamma inducing cytokines, and IFN-gamma inducible CXC chemokines in visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;71(5):561-7.

- Handman E, Symons FM, Baldwin TM, Curtis JM, Scheerlinck JP. Protective vaccination with promastigote surface antigen 2 from *Leishmania major* is mediated by a TH1 type of immune response. *Infection and Immunity*. 1995;63(11):4261-7.
- Harhay MO, Oliaro PL, Costa DL, Costa CH. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol*. 2011;27(9):403-9.
- Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet*. 1999;354(9185):1191-9.
- Hommel M, Peters W, Ranque J, Quilici M, Lanotte G. The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol*. 1978;72(3):213-8.
- Ikegami T, Niikura M, Saijo M, Miranda ME, Calaor AB, Hernandez M, Acosta LP, Manalo DL, Kurane I, Yoshikawa Y, Morikawa S. Antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection of Reston Ebola virus nucleoprotein. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003;10(4):552-7.
- Imaz MS, Schmelling MF, Kaempfer S, Spallek R, Singh M. Serodiagnosis of tuberculosis: specific detection of free and complex-dissociated antibodies anti-mycobacterium tuberculosis recombinant antigens. *Braz J Infect Dis*. 2008;12(3):234-44.
- Jirkù M, Zemanová E, Al-Jawabreh A, Schönián G, Lukes J. Development of a direct species-specific PCR assay for differential diagnosis of *Leishmania tropica*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006;55(1):75-9.
- Johansson A, Erlandsson A, Eriksson D, Ullén A, Holm P, Sundström BE, Roux KH, Stigbrand T. Idiotypic-anti-idiotypic complexes and their in vivo metabolism. *Cancer*. 2002;94(4 Suppl):1306-13.
- Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol*. 2006;22(9):439-45.
- Kar K. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Crit Rev Microbiol*. 1995;21(2):123-52.
- Kaur J, Kaur S. ELISA and western blotting for the detection of Hsp70 and Hsp83 antigens of *Leishmania donovani*. *J Parasit Dis*. 2013;37(1):68-73.
- Kautz-Neu K, Schwonberg K, Fischer MR, Schermann AI, von Stebut E. Dendritic cells in *Leishmania major* infections: mechanisms of parasite uptake, cell activation and evidence for physiological relevance. *Med Microbiol Immunol*. 2012;201(4):581-92.
- Kevric I, Cappel MA, Keeling JH. New World and Old World *Leishmania* Infections: A Practical Review. *Dermatol Clin*. 2015;33(3):579-93.
- Kilcoyne M, Gerlach JQ, Farrell MP, Bhavanandan VP, Joshi L. Periodic acid-Schiff's reagent assay for carbohydrates in a microtiter plate format. *Anal Biochem*. 2011;416(1):18-26.
- Korn ED, Wright PL. Macromolecular composition of an amoeba plasma membrane. *J Biol Chem*. 1973;248(2):439-47.

Kumar R, Pai K, Pathak K, Sundar S. Enzyme-linked immunosorbent assay for recombinant K39 antigen in diagnosis and prognosis of Indian visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001;8(6):1220-4.

Kumar S, Kumar D, Chakravarty J, Rai M, Sundar S. Identification and characterization of a novel *Leishmania donovani* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;86(4):601-5.

Kumar R, Nylén S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Front Immunol*. 2012;3:251.

Lainson R, Shaw JJ. New World Leishmaniasis. In: Mahy BWJ, ter Meulen V, Borriello SP, Murray PR, Funke G, Merz WG, et al. *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infectios* [Internet]. Published online: 2010 Mar. Hoboken (NJ): Hohn Wiley & Sons; 2010. [cited 2017 may 10]. [37p.] Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470688618.taw0182/abstract>.

Lambert PH, Berney M, Kazyumba G. Immune complexes in serum and in cerebrospinal fluid in African trypanosomiasis. Correlation with polyclonal B cell activation and with intracerebral immunoglobulin synthesis. *J Clin Invest*. 1981;67(1):77-85.

Lara-Silva Fde O, Michalsky ÉM, Fortes-Dias CL, Fiuza V de O, Pessanha JE, Regina-Silva S, de Avelar DM, Silva MA, Lima AC, da Costa AJ, Machado-Coelho GL, Dias ES. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. *Acta Trop*. 2015;148:128-36.

Laurenti MD, de Santana Leandro MV Jr, Tomokane TY, De Lucca HR, Aschar M, Souza CS, Silva RM, Marcondes M, da Matta VL. Comparative evaluation of the DPP(®) CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2014;205(3-4):444-50.

Lin Z, Zhang Y, Li C, Qian H. Purification antibody by thiophilic magnetic sorbent modified with 2-mercapto-1-methylimidazol. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013;108:72-9.

Lindoso JA, Lindoso AA. Neglected tropical diseases in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2009;51(5):247-53.

Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol*. 2008;158(4):274-87.

Maalej IA, Chenik M, Louzir H, Ben Salah A, Bahloul C, Amri F, 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*. 2003;68(3):312-20.

Martínez-Flores JA, Serrano M, Pérez D, Lora D, Paz-Artal E, Morales JM, Serrano A. Detection of circulating immune complexes of human IgA and beta 2 glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome symptomatology. *J Immunol Methods*. 2015;422:51-8.

McConville MJ, Schnur LF, Jaffe C, Schneider P. Structure of Leishmania lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. *Biochemical Journal*. 1995;310(Pt 3):807-18.

McConville MJ, Naderer T. Metabolic pathways required for the intracellular survival of Leishmania. *Annu Rev Microbiol*. 2011;65:543-61.

Mendes DG, Lauria-Pires L, Nitz N, Lozzi SP, Nascimento RJ, Monteiro PS, Rebelo MM, Rosa Ade C, Santana JM, Teixeira AR. Exposure to mixed asymptomatic infections with *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensis* and *Leishmania chagasi* in the human population of the greater Amazon. *Trop Med Int Health*. 2007;12(5):629-36.

Mendonça-Previato L, Todeschini AR, Heise N, Previato JO. Protozoan parasite-specific carbohydrate structures. *Curr Opin Struct Biol*. 2005;499-505.

Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J Clin Microbiol*. 2005;43(11):5515-9.

Miles SA, Conrad SM, Alves RG, Jeronimo SM, Mosser DM. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J Exp Med*. 2005;201(5):747-54.

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar. [Internet]. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2017. [citado 2017 Agosto 29]. 189p. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf.

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde: [Internet]. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2016. [citado 2017 Agosto 29]. 542p. (1. Ed. Atual). Disponível em: <http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/18/Guia-LT-2016.pdf>.

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral: Normas e condutas [Internet]. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2006. [citado 2017 Maio 02]. 120p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscerar.pdf.

- Mohammed EA, Wright EP, Kager PA, Laarman JJ, Pondman KW. ELISA using intact promastigotes for immunodiagnosis of kala-azar. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1985;79(3):344-50.
- Morais AN, Sousa MG, Meireles LR, Kesper N Jr, Umezawa ES. Canine visceral leishmaniasis and Chagas disease among dogs in Araguaína, Tocantins. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2013;22(2):225-9.
- Moreira Nd, Vitoriano-Souza J, Roatt BM, Vieira PM, Ker HG, de Oliveira Cardoso JM, Giunchetti RC, Carneiro CM, de Lana M, Reis AB. Parasite burden in hamsters infected with two different strains of leishmania (*Leishmania*) infantum: "Leishman Donovan units" versus real-time PCR. *PLoS One.* 2012;7(10):e47907.
- Morales G, Carrillo G, Requena JM, Guzman F, Gomez LC, Patarroyo ME, Alonso C. Mapping of the antigenic determinants of the *Leishmania infantum* gp63 protein recognized by antibodies elicited during canine visceral leishmaniasis. *Parasitology.* 1997;114(Pt 6):507-16.
- Mougneau E, Bihl F, Glaichenhaus N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. *Immunol Rev.* 2011;240(1):286-96.
- Mukhopadhyay S, Mandal C. Glycobiology of *Leishmania donovani*. *Indian J Med Res.* 2006;123(3):203-20.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet.* 2005;366(9496):1561-77.
- Naderer T, Vince JE, McConville MJ. Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host. *Curr Mol Med.* 2004;4(6):649-65.
- Nakane PK, Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J Histochem Cytochem.* 1974; 22(12):1084-91.
- Nasiri V, Dalimi A, Ghaffarifar F, Bolhassani A. Immunogenicity and Efficacy of Live *L. tarentolae* Expressing KMP11-NTGP96-GFP Fusion as a Vaccine Candidate against Experimental Visceral Leishmaniasis Caused by *L. infantum*. *Iran J Parasitol.* 2016;11(2):144-58.
- Nath N, Godat B, Benink H, Urh M. On-bead antibody-small molecule conjugation using high-capacity magnetic beads. *J Immunol Methods.* 2015;426:95-103.
- Nejad-Moghaddam A, Abolhassani M. Production and characterization of monoclonal antibodies recognizing a common 57-kDa antigen of *Leishmania* species. *Iran Biomed J.* 2009;13(4):245-51.
- Neuber H. Leishmaniasis. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2008;6(9):754-65.
- Nikolaev AV, Sizova OV. Synthetic neoglycoconjugates of cell-surface phosphoglycans of *Leishmania* as potential anti-parasite carbohydrate vaccines. *Biochemistry (Mosc).* 2011;76(7):761-73.

Nunes CM, Pires MM, da Silva KM, Assis FD, Gonçalves Filho J, Perri SH. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. *Vet Parasitol.* 2010;170(1-2):131-3.

Olivier M, Gregory DJ, Forget G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(2):293-305.

Osanya A, Song EH, Metz K, Shimak RM, Boggiatto PM, Huffman E, Johnson C, Hostetter JM, Pohl NL, Petersen CA. Pathogen-derived oligosaccharides improve innate immune response to intracellular parasite infection. *Am J Pathol.* 2011;179(3):1329-37.

Ott KJ, Hanson WL, Stauber LA. Course of infection of *Leishmania donovani* in hamsters inoculated by the intraperitoneal route. *J Parasitol.* 1967;53(3):641-5.

Ozensoy Töz S, Sakru N, Ertabaklar H, Demir S, Sengul M, Ozbel Y. Serological and entomological survey of zoonotic visceral leishmaniasis in Denizli Province, Aegean Region, Turkey. *New Microbiol.* 2009;32(1):93-100.

Paganelli R, Levinsky RJ, Atherton DJ. Detection of specific antigen within circulating immune complexes: validation of the assay and its application to food antigen-antibody complexes formed in healthy and food-allergic subjects. *Clin Exp Immunol.* 1981;46(1):44-53.

Pappas MG, Hajkowski R, Tang DB, Hockmeyer WT. Reduced false positive reactions in the Dot-enzyme-linked immunosorbent assay for human visceral leishmaniasis. *Clin Immunol Immunopathol.* 1985;34(3):392-6.

Passos S, Carvalho LP, Orge G, Jerônimo SM, Bezerra G, Soto M, Alonso C, Carvalho EM. Recombinant leishmania antigens for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005;12(10):1164-7.

Pastorino AC, Jacob CM, Oselka GW, Carneiro-Sampaio MM. Visceral leishmaniasis: clinical and laboratorial aspects. *J Pediatr (Rio J).* 2002;78(2):120-7.

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

Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology.* 2009;136(14):1915-34.

Redhu NS, Dey A, Balooni V, Singh S. Use of immunoglobulin g avidity to determine the course of disease in visceral and post-kala-azar dermal leishmaniasis patients. *Clin Vaccine Immunol.* 2006;13(8):969-71.

Reguera RM, Morán M, Pérez-Pertejo Y, García-Estrada C, Balaña-Fouce R. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2016;227:98-114.

Riera C, Fisa R, Lopez P, Ribera E, Carrió J, Falcó V, Molina I, Gállego M, Portús M. Evaluation of a latex agglutination test (KAtex) for detection of *Leishmania* antigen in urine of patients with HIV-*Leishmania* coinfection: value in diagnosis and post-treatment follow-up. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004;23(12):899-904.

Rijal S, Boelaert M, Regmi S, Karki BM, Jacquet D, Singh R, Chance ML, Chappuis F, Hommel M, Desjeux P, Van der Stuyft P, Le Ray D, Koirala S. Evaluation of a urinary antigen-based latex agglutination test in the diagnosis of kala-azar in eastern Nepal. *Trop Med Int Health.* 2004; 9(6):724-9.

Roberts MT. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *Br Med Bull.* 2006;75-76:115-30.

Rodrigues IA, Mazotto AM, Cardoso V, Alves RL, Amaral AC, Silva JR, Pinheiro AS, Vermelho AB. Natural Products: Insights into leishmaniasis Inflammatory Response. *Mediators Inflamm.* 2015;835910.

Rodrigues, JP. Testes fluorimétricos na sorologia da toxoplasmose humana: detecção simultânea de anticorpos de IgG e IgM específicos. [dissertação (mestrado em Doenças Tropicais e Saúde Internacional)]. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, 2014.

Rodrigues V, Cordeiro-da-Silva A, Laforge M, Silvestre R, Estaquier J. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. *Parasit Vectors.* 2016;9:118.

Romero GA, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(1):e584.

Roychoudhury R, Martinez PA, Grinnage-Pulley T, Schaut RG, Petersen CA, Pohl NL. Acid-Triggered Degradable Reagents for Differentiation of Adaptive and Innate Immune Responses to *Leishmania*-Associated Sugars. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2015;54(33):9610-3.

Sacks D, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol.* 2001;55:453-83.

Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(11):845-58.

Sakkas H, Gartzonika C, Levidiotou S. Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. *J Vector Borne Dis.* 2016;53(1):8-16.

Saporito L, Giammanco GM, De Grazia S, Colomba C. Visceral leishmaniasis: host-parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host. *Int J Infect Dis.* 2013;17(8):e572-6.

Sarkari B, Chance M, Hommel M. Antigenuria in visceral leishmaniasis: detection and partial characterisation of a carbohydrate antigen. *Acta Trop*. 2002;82(3):339-48.

Savoia D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries*. 2015 Jul 4;9(6):588-96.

Senaldi G, Xiao-su H, Hoessli DC, Bordier C. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by a dot-enzyme immunoassay for the detection of a *Leishmania donovani*-related circulating antigen. *J Immunol Methods*. 1996;193(1):9-15.

Shreffler WG, Burns JM Jr, Badaró R, Ghalib HW, Button LL, McMaster WR, Reed SG. Antibody responses of visceral leishmaniasis patients to gp63, a major surface glycoprotein of *Leishmania* species. *J Infect Dis*. 1993;167(2):426-30.

Silva AR, Tauil PL, Cavalcante MN, Medeiros MN, Pires BN, Gonçalves Eda G. Epidemiological situation of visceral leishmaniasis on the Island of São Luis, State of Maranhão. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41(4):358-64.

Silva RM, Laurenti MD, Gomes Ade C, Nogueira YL. TG-ROC analysis of immunofluorescence assays in canine visceral leishmaniasis diagnosis. *Rev Saude Publica*. 2009;43(6):1044-53.

Silveira TG, Kimmelmeier C. *Leishmania braziliensis*: isolation of carbohydrate-containing antigen and possibility of its use in the immunodiagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1995;37(3):245-52.

Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J Med Res*. 2006;123(3):311-30.

Singh S, Sivakumar R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J Postgrad Med*. 2003;49(1):55-60.

Singh OP, Sundar S. Developments in Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in the Elimination Era. *J Parasitol Res*. 2015;2015:239469.

Siripattanapipong S, Kato H, Tan-Ariya P, Mungthin M, Leelayoova S. Comparison of Recombinant Proteins of Kinesin 39, Heat Shock Protein 70, Heat Shock Protein 83, and Glycoprotein 63 for Antibody Detection of *Leishmania martiniquensis* Infection. *J Eukaryot Microbiol*. 2017.

Sivakumar R, Sharma P, Chang KP, Singh S. Cloning, expression, and purification of a novel recombinant antigen from *Leishmania donovani*. *Protein Expr Purif*. 2006;46(1):156-65.

Sharma U, Singh S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis*. 2008;45(4):255-72.

Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*. 2009;165(1-2):1-18.

Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, Sundar S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011;105(1):1-6.

Srividya G, Kulshrestha A, Singh R, Salotra P. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. *Parasitol Res.* 2012;110(3):1065-78.

Stanley AC, Engwerda CR. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunol Cell Biol.* 2007;85(2):138-47.

Sundar S, Agrawal S, Pai K, Chance M, Hommel M. Detection of leishmanial antigen in the urine of patients with visceral leishmaniasis by a látex agglutination test. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73(2):269-71.

Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9(5):951-8.

Sundar S, Singh RK, Bimal SK, Gidwani K, Mishra A, Maurya R, Singh SK, Manandhar D, Boelaert M, Rai M. Comparative evaluation of parasitology and serological tests in the diagnosis of visceral leishmaniasis in India: a phase III diagnostic accuracy study. *Trop Med Int Health.* 2007;12(2):284-9.

Szittner Z, Bentlage AE, Rovero P, Migliorini P, Lóránd V, Prechl J, Vidarsson G. Label-free detection of immune complexes with myeloid cells. *Clin Exp Immunol.* 2016;185(1):72-80.

Tabatabaee PA, Abolhassani M, Mahdavi M, Nahrevanian H, Azadmanesh K. *Leishmania major*: secreted antigens of *Leishmania major* promastigotes shift the immune response of the C57BL/6 mice toward Th2 in vitro. *Exp Parasitol.* 2011;127(1):46-51.

Talmi-Frank D, Strauss-Ayali D, Jaffe CL, Baneth G. Kinetics and diagnostic and prognostic potential of quantitative Western blot analysis and antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assay in experimental canine leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol.* 2006;13(2):271-6.

Távora MP, Pereira MA, Silva VL, Vita GF. Comparative validation study between the ELISA and RIFI techniques for diagnosing *Leishmania* sp in stray dogs caught in the municipality of Campos de Goytacazes, State of Rio de Janeiro. *Ver Soc Bras Med Trop.* 2007;40(4):482-3.

Teixeira Neto RG, Giunchetti RC, Carneiro CM, Vitor RW, Coura-Vital W, Quaresma PF, Ker HG, de Melo LA, Gontijo CM, Reis AB. Relationship of *Leishmania*-specific IgG levels and IgG avidity with parasite density and clinical signs in canine leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2010;169(3-4):248-57.

Thakur CP. A comparison of intercostal and abdominal routes of splenic aspiration and bone marrow aspiration in the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997;91(6):668-70.

Tiburcio MG, Anversa L, Kanunfre KA, Ferreira AW, Rodrigues Júnior V, Silva Lde A. Anti-leishmania infantum IgG antibody avidity in visceral leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol.* 2013;20(11):1697-702.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(9):4350-4.

Travi BL, Osorio EY, Saldarriaga OA, Cadena H, Tabares CJ, Peniche A, Lee S, Melby PC. Clinical, parasitologic, and immunologic evolution in dogs experimentally infected with sand fly-derived *Leishmania chagasi* promastigotes. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81(6):994-1003.

Turco SJ, Descoteaux A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol.* 1992;46:65-94.

Vaish M, Bhatia A, Reed SG, Chakravarty J, Sundar S. Evaluation of rK28 antigen for serodiagnosis of visceral Leishmaniasis in India. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(1):81-5.

Vallur AC, Tutterrow YL, Mohamath R, Pattabhi S, Hailu A, Abdoun AO, Ahmed AE, Mukhtar M, Salam MA, Almeida ML, Almeida RP, Mondal D, Albertini A, Ghalib H, Duthie MS, Reed SG. Development and comparative evaluation of two antigen detection tests for Visceral Leishmaniasis. *BMC Infect Dis.* 2015;15:384.

Vargas-Duarte JJ, López-Páez MC, Escovar-Castro JE, Fernández-Manrique J. [Western blot, ELISA and indirect immunofluorescence test evaluation of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*-infected dogs]. *Rev Salud Publica (Bogota).* 2009;11(4):641-52.

Venkatesan P, Wakelin D. ELISAs for parasitologists: or lies, damned lies and ELISAs. *Parasitol Today.* 1993;9(6):228-32.

Vercammen F, Berkvens D, Brandt J, Vansteenkiste W. A sensitive and specific 30-min Dot-ELISA for the detection of anti-leishmania antibodies in the dog. *Vet Parasitol.* 1998;79(3):221-8.

Von Stebut E. Leishmaniasis. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2015;13(3):191-200; quiz 201.

Xie ZM, Yu L, Fang LS. Preparation and Characteristic of Dextran-BSA Antibody and Establishment of its ELISA Immunoassay. *J Immunoassay Immunochem.* 2015;36(6):597-612.

Zacarias DA, Rolão N, de Pinho FA, Sene I, Silva JC, Pereira TC, Costa DL, Costa CHN. Causes and consequences of higher *Leishmania infantum* burden in patients with kala-azar: a study of 625 patients. *Trop Med Int Health.* 2017.

Zhao GH, Yin K, Zhong WX, Xiao T, Wei QK, Cui Y, Liu GZ, Xu C, Wang HF. Epidemiological Investigation of Asymptomatic Dogs with *Leishmania* Infection in Southwestern China Where Visceral Leishmaniasis is Intractable. *Korean J Parasitol.* 2016;54(6):797-801.

World Health Organization. [Internet]. Leishmaniasis; c2017 [update 2017 april; cited 2017 may 10]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>.