



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ALINE CAVALCANTI DO AMARAL

**AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE CRUZADA ENTRE
ANTÍGENOS DE *Paracoccidioides brasiliensis* E
*Leishmania amazonensis***

ALINE CAVALCANTI DO AMARAL

**AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE CRUZADA ENTRE
ANTÍGENOS DE *Paracoccidioides brasiliensis* E
*Leishmania amazonensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Mario Augusto Ono.

Londrina
2012

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

A485a Amaral, Aline Cavalcanti do.

Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de paracoccidioides
brasiliensis e leishmania amazonensis / Aline Cavalcanti do Amaral. –
Londrina, 2012.

59 f. : il.

Orientador: Mario Augusto Ono.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual
de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Patologia Experimental, 2012.

Inclui bibliografia.

1. Paracoccidioidomicose – Teses. 2. Paracoccidioides – Brasiliensis – Teses.
3. Antígenos de fungos – Teses. 4. Leishmaniose – Teses. 5. Doenças
transmissíveis. I. Ono, Mario Augusto. II. Universidade Estadual de Londrina.
Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia
Experimental. III. Título.

CDU 616.993

ALINE CAVALCANTI DO AMARAL

**AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE CRUZADA ENTRE ANTÍGENOS DE
Paracoccidioides brasiliensis E *Leishmania amazonensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Mario Augusto Ono
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Gabriela Gonçalves de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Maria Angélica Ehara Watanabe
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 23 de março de 2012.

Dedico este trabalho :

A Deus por tudo que me proporciona na vida.

Aos meus pais Luiz e Vera, pelos exemplos de dedicação e amor.

Ao meu irmão Fábio por todo incentivo e carinho.

AGRADECIMENTOS

“Se enxerguei longe, foi porque me apoiei em ombros de gigantes”
Issac Newton

O agradecimento é uma das partes mais agradáveis de escrever em uma dissertação. É o momento de recordar os bons momentos vividos e as dificuldades superadas. Muitas pessoas nos ajudaram a manter o equilíbrio necessário entre razão e emoção para desenvolver este trabalho científico. Talvez pouco signifique para quem o leia, mas tudo foi muito importante para o meu crescimento intelectual e emocional.

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades e mostrar o caminho nas horas incertas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Mario Augusto Ono que confiou no meu potencial, por sua dedicação e paciência, principalmente por seus ensinamentos.

À Profa. Dra. Maria Angélica Ehara Watanabe por ter me dado a notícia da minha aprovação no mestrado e que me ajuda encerrar esse ciclo, contribuindo com a correção deste trabalho.

À Profa. Dra. Gabriela Gonçalves de Oliveira, que me acompanha desde a graduação e me mostrou o caminho da pesquisa. Pelos anos de convívio, incentivo, por acreditar em minha capacidade, por seu exemplo de professora e pesquisadora, e por todas as contribuições valiosas com este trabalho.

À Profa. Dra. Ivete Conchon Costa pela colaboração com sugestões que com certeza foram importantes para o desenvolvimento deste trabalho. Pelas vezes em que sofríamos juntas quando algo dava errado com as “Leishs”.

A Tatiane Ferreira Petroni e ao Centro de Controle de Zoonoses de Três Lagoas pelas amostras cedidas e por toda atenção com que nos receberam.

A minha família, meus pais Luiz e Vera, meu irmão Fábio, por nossa união e cumplicidade, por fazerem do meu sonho o de vocês, pelo incentivo e apoio incondicional. Pela compreensão nos momentos mais difíceis e principalmente por não me deixar fraquejar.

Ao meu namorado e melhor amigo Diego, que aprendeu um pouquinho do que eu fazia, que mesmo ausente me fortalecia. Seu apoio foi essencial. Obrigada por toda paciência, carinho e amor.

Ao amigo Atilio Sersun Calefi que me ajudou nos dados estatísticos, e na coleta de amostras, pelo convívio prazeroso, sempre com muita paciência.

Ao Donizete Rodrigues Belitardo, veterinário e colega de laboratório, pela companhia na viagem a Três Lagoas para a coleta das amostras, no biotério do HU da UEL e nas imunizações.

A amiga Tatiana Reichert da Silva Assunção pela amizade em todos os momentos que seguimos juntas, por ajudarmos uma à outra sempre que preciso, foram só dois anos, mas o suficiente para nos tornamos amigas.

Aos meus colegas de laboratório, Aline M. Omori, Isabele B. Kazahaya, Melina B. Galvão, Mônica R. Sbeghen, e os alunos de Iniciação Científica que passaram pelo Laboratório de Imunologia Animal, obrigada pelos momentos alegres e divertidos.

Aos meus colegas de turma do mestrado pela convívio agradável, pelas horas de estudo, em especial à Suelen dos Santos, por todo auxílio na manipulação das “Leishs”, com extrema disposição sempre.

Aos técnicos de laboratório, Nelson, Nilson e Mary por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental pelos ensinamentos.

Ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental pelo incentivo à pesquisa e apoio institucional. A CAPES pelo apoio financeiro para desenvolvimento deste estudo pela concessão da bolsa sem a qual não poderia ter realizado este trabalho.

*“Quem quer fazer alguma coisa, encontra um
MEIO.
Quem não quer fazer nada, encontra uma
DESCULPA”.*

Roberto Shinyashiki

AMARAL, Aline Cavalcanti. **Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Leishmania amazonensis***. 2012. 59 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* e Leishmaniose é uma doença parasitária provocada por protozoários do gênero *Leishmania*. O cão desempenha um papel importante na epidemiologia da Leishmaniose e na sua transmissão a seres humanos. Recentemente foram relatados casos de PCM doença e infecção em cães e outras espécies de animais domésticos. O diagnóstico da Leishmaniose é feito principalmente através de testes sorológicos, porém, reações cruzadas podem ocorrer com outras doenças. Em estudo prévio com cães soropositivos e soronegativos para Leishmaniose observou-se uma alta positividade para antígenos de *P. brasiliensis* em animais soropositivos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a reatividade cruzada entre antígenos de *P. brasiliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Ratos Wistar machos foram imunizados via intraperitoneal com exoantígeno de Pb (n=2), com células leveduriformes inativadas de *P. brasiliensis* (n=2) e com antígeno de *L. amazonensis* (n=2) e as reatividades dos anticorpos com antígenos de *P. brasiliensis* e *L. amazonensis* foram avaliadas por ELISA e *Western Blot*. Os anticorpos de ratos imunizados com antígenos de *P. brasiliensis* reagiram com antígeno de *L. amazonensis*, assim como os imunizados com *P. brasiliensis* reagiram com antígeno de *L. amazonensis*. Observou-se que nos ratos imunizados com *P. brasiliensis* houve o reconhecimento da banda de 63 kDa, que é expressa nas fases promastigota e amastigota de todas as espécies de *Leishmania*. Os ratos imunizados com *L. amazonensis* reconheceram uma banda com aspecto difuso no *Western Blot* com antígeno de *P. brasiliensis*. Adicionalmente foram avaliadas a reatividades a exoantígeno de *P. brasiliensis* em amostras de soro de cães de Três Lagoas-MS, soropositivos e soronegativos para Leishmaniose, por meio de Imunodifusão Radial Dupla e ELISA. Os cães soropositivos para Leishmaniose apresentaram alta reatividade com exoantígeno de *P. brasiliensis*, 85,05% no ELISA e 17,5% na Imunodifusão. Verificou-se também que o tratamento do exoantígeno de Pb com metaperiodato de sódio reduziu significativamente a positividade ($P < 0,0001$), sugerindo que os anticorpos eram dirigidos aos epítomos de carboidratos.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose. Leishmaniose. *Paracoccidioides brasiliensis*. Reação-cruzada. gp63. gp43.

AMARAL, Aline Cavalcanti. **Evaluation of cross reactivity of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Leishmania amazonensis* antigens.** 2012. 59 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* and Leishmaniasis is parasitic disease caused by protozoans of the *Leishmania* genus. The domestic dog has an important role in Leishmaniasis epidemiology and its transmission to humans. It has been reported recently cases of PCM-disease, and infections in dogs and in other domestic animals species. Leishmaniasis is mainly diagnosed by serological methods, but cross-reactivity with other endemic diseases may occur. In a previous study with dogs seropositive and seronegative for Leishmaniasis, a significantly higher reactivity to gp43 (79.9%) and exoantigen (12.7%) of *P. brasiliensis* was observed in animals seropositive for Leishmaniasis. The objective of this study was to evaluate the cross-reactivity between *P. brasiliensis* and *Leishmania* antigens. Male rats *Rattus norvegicus* (Wistar), were immunized intraperitoneally with *P. brasiliensis* exoantigen, (n=2) inactivated yeast cells of Pb (n=2) and *Leishmania amazonensis* antigen (n=2) and a reactivity antigen-antibody of this pathogen was evaluated by ELISA and Western blotting. The sera from rats immunized with *P. brasiliensis* antigens reacted with *L. amazonensis* antigen and the sera from rats immunized with *L. amazonensis* antigens reacted with *P. brasiliensis* antigens. In the Western Blot the rats immunized with *P. brasiliensis* was recognized a gp63, that is predominantly expressed in Leishmania antigen and the immunized rats with *L. amazonensis* recognized a band with diffuse aspect reported as a protein antigen of the *P. brasiliensis* antigen. In addition, was analyzed the reactivity to *P. brasiliensis* exoantigen in serum samples from dogs of the municipality of Três Lagoas, State of Mato Grosso do Sul (positive and negative for Leishmaniasis) by Immunodiffusion Test and ELISA. The pretreatment of exoantigen with sodium metaperiodate reduced the cross-reactivity in the ELISA test. The seropositive dogs for Leishmaniasis showed a higher reactivity to *P. brasiliensis* exoantigen (85.05% on ELISA and 17.5% on Immunodiffusion Test). The treatment of Pb exoantigen with Sodium Metaperiodate reduced significantly the positivity ($P < 0.0001$), suggesting that the antibodies were directed against carbohydrate epitopes.

Keywords: Paracoccidioidomycosis. Leishmaniasis. *Paracoccidioides brasiliensis*. Cross reactivity. gp43. gp63.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag	antígeno
BSA	Albumina de Soro Bovino
DAB	3 3'-Diaminobenzidina
DO	Densidade óptica
IDRD	Imunodifusão Radial Dupla
IFI	Imunofluorescência Indireta
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
ExoAg	Exoantígeno
gp43	Glicoproteína de 43 kDa
gp70	Glicoproteína de 70 kDa
gp63	Glicoproteína de 63 kDa
IFI	Imunofluorescência Indireta
Ig	Imunoglobulina
kDa	Quilodaltons
LV	Leishmaniose visceral
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCM	Leishmaniose Cutâneo-mucosa
M	Molar
nm	Nanômetros
PBS	Tampão Fosfato Salino
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
TMBZ	Tetra metil benzidina
V	Volts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	PARACOCCIDIOIDOMICOSE	12
1.2	LEISHMANIOSE	16
1.2.1	LEISHMANIOSE TEGUMENTAR	19
1.2.2	LEISHMANIOSE VISCERAL.....	20
1.2.3	LEISHMANIOSE CANINA	22
2	OBJETIVOS	25
2.1	OBJETIVO GERAL	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	OBTENÇÃO DO EXOANTÍGENO DE P. BRASILIENSIS	26
3.2	OBTENÇÃO DE ANTÍGENO CELULAR DE P. BRASILIENSIS	26
3.3	PRODUÇÃO DO ANTÍGENO SOLÚVEL DE L. AMAZONENSIS	26
3.4	PREPARAÇÃO DO ANTÍGENO CELULAR DE L. AMAZONENSIS	27
3.5	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.....	27
3.6	IMUNIZAÇÃO DE RATOS COM ANTÍGENOS DE P. BRASILIENSIS E L. AMAZONENSIS	27
3.7	ANÁLISE EM SORO DE RATOS IMUNIZADOS	28
3.7.1	ELISA	28
3.7.2	Western Blot	29
3.8	ANÁLISE EM SORO DE CÃES.....	29
3.8.1	Análise de soropositivos e soronegativos de cães para Leishmaniose por ELISA	30
3.8.2	Análise de soros de cães soropositivos e soronegativos para Leishmaniose por por Imunodifusão Radial Dupla (IDRD)	30
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
4	RESULTADOS	32
4.1	AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE CRUZADA DE SOROS DE RATOS IMUNIZADOS COM ANTÍGENOS DE P. BRASILIENSIS	32

4.2	AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE CRUZADA DE SOROS DE RATOS IMUNIZADOS COM L. AMAZONENSIS.....	38
4.3	AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DE SOROS DE CÃES SOROPOSITIVOS E SORONEGATIVOS DE TRÊS LAGOAS PARA EXOANTÍGENO DE P. BRASILIENSIS	41
5	DISCUSSÃO	45
6	CONCLUSÕES	49
	REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 PARACOCCIDIOIDOMICOSE

Paracoccidioides brasiliensis é um fungo dimórfico que causa a Paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica endêmica em muitos países latino-americanos, incluindo o Brasil. A PCM afeta principalmente indivíduos do sexo masculino, no período produtivo da vida (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). O primeiro relato da doença foi feito em 1908 por Adolpho Lutz, em dois pacientes com lesões na nasofaringe (ALBORNOZ, 1971; SILVA-VERGARA et al., 1998).

Por vários anos *P. brasiliensis* foi considerado um fungo imperfeito, quando apenas era conhecido o seu estágio anamórfico, porém recentemente, com o avanço das técnicas moleculares, foi proposto um clado a partir da família Onygenaceae (Onygenales, Ajellomycetaceae) que inclui os patógenos dimórficos dos gêneros *Blastomyces*, *Emmonsia*, *Histoplasma*, *Paracoccidioides* (UNTEREINER et al., 2004; BAGAGLI et al., 2008).

Na temperatura ambiente o fungo cresce na forma micelial. A fase leveduriforme ocorre entre 35°C a 37°C ou em tecidos infectados (PUCCIA et al., 1986). A transição da fase micelial para a fase leveduriforme no hospedeiro é essencial à sobrevivência do fungo, assim como sua invasão tecidual (SAN-BLAS; NIÑO-VEGA, 2008, BORBA; SCHÄFFER, 2002). Kanetsuna e Carbonel (1970) demonstraram que as formas de levedura e micélio apresentam a quitina como um polissacarídeo comum. Na forma micelial de *P. brasiliensis* há predomínio de β -(1,3) glucana enquanto na forma de levedura a α -(1,3) glucana predomina. Além disso, uma galactomanana amorfa é encontrada na parede celular da forma micelial, responsável por propriedades antigênicas e foi descrita como antígeno comum a outros fungos, proporcionando reatividade cruzada.

O parasitismo por *P. brasiliensis* ocorre quando o fungo se transforma em levedura no início do processo infeccioso, evadindo-se, assim, da ação de enzimas fagocíticas, uma vez que os fagócitos humanos são capazes de produzir apenas β -glucanases (SAN-BLAS, 1982). Portanto, os polissacarídeos apresentam relação com o dimorfismo e a patogenicidade de *P. brasiliensis* (SAN-BLAS; SAN-BLAS, 1977).

O habitat natural do fungo é provavelmente o solo e a infecção ocorre por meio da inalação de propágulos infectantes denominados conídios (RESTREPO, 1985). McEwen e colaboradores (1987) demonstraram que a PCM pode ser induzida em camundongos pela inalação dos conídios de *P. brasiliensis*.

A PCM pode ser classificada de acordo com suas formas clínicas e gravidade em: PCM infecção, PCM doença de forma aguda ou subaguda e PCM doença crônica (FRANCO, 1986). A PCM infecção pode ser adquirida nas duas primeiras décadas de vida e ocorre em indivíduos de ambos os sexos. Os pacientes são assintomáticos embora tenham entrado em contato com o fungo (WANKE; LONDERO, 1994; SHIKANA-YASUDA et al., 2006). A PCM doença de forma aguda ou subaguda também denominada juvenil, afeta ambos os sexos e progride rapidamente através do sistema linfático, apresentando linfadenomegalia e lesões graves em vários órgãos. Os pacientes tendem a desenvolver boa resposta imune humoral, mas com baixa resposta celular (DINIZ et al., 2002; FRANCO, 1986). A forma crônica da PCM é prevalente em homens adultos entre 30 e 60 anos, a progressão ocorre de forma lenta e silenciosa, podendo levar vários anos até seu diagnóstico. Apresenta-se na forma unifocal, ou multifocal de acordo com a quantidade de órgãos afetados, e as manifestações pulmonares geralmente acometem 90% dos pacientes (FRANCO, 1986; SHIKANA-YASUDA et al. 2006).

De acordo com os sinais clínicos, a PCM pode ser confundida com outras infecções, sendo as formas respiratórias agudas semelhantes às infecções causadas por vírus ou bactérias. A forma crônica pode ser confundida com Sepses, Tuberculose, Leucemias e Linfomas, e deve ser diferenciada de Carcinomas Epiteliais e de Mucosas, assim como de Leishmaniose Cutânea Mucosa, Tuberculose, Sífilis e Sarcoidose (NEGRONI, 1995).

O diagnóstico da PCM pode ser realizado por pesquisa direta do fungo em amostras, como escarro e raspado de lesões cutâneas, além da pesquisa de anticorpos e antígenos (PUCCIA et al., 1986). Os principais métodos sorológicos utilizados em laboratório clínico são: Imunodifusão Radial Dupla, Contraimunoeletroforese, Imunofluorescência Indireta, ELISA e Western Blot (CAMARGO, 2008).

Na PCM humana a reatividade sorológica no teste de Imunodifusão é indicativo de PCM-doença, um teste altamente específico, mas com baixa sensibilidade (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; CAMARGO et al., 1988).

Nos ensaios sorológicos os antígenos brutos obtidos a partir de filtrado de cultura do fungo podem ser utilizados (TABORDA; CAMARGO, 1994; CAMARGO et al., 1988). Estes antígenos podem conter componentes que são comuns a outros patógenos e apresentar reações cruzadas com outras micoses como Histoplasmose, Candidíase, Blastomicose e Doença de Jorge Lobo (CAMARGO; FRANCO, 2000; PUCCIA; TRAVASSOS, 1991; TABORDA; CAMARGO, 1994).

Suzuki e colaboradores (1997) produziram um anticorpo monoclonal específico contra um glicolípido de *P. brasiliensis* e verificaram que esse anticorpo também reconheceu promastigotas de *Leishmania major* e epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

A glicoproteína gp43, descrita inicialmente por Puccia e Travassos (1991), também é utilizada no imunodiagnóstico da PCM. A gp43 é um antígeno de *P. brasiliensis* que pode ser purificado da cultura do fungo por meio de cromatografia de afinidade. Outra importante glicoproteína expressa pelo fungo é a gp70, reconhecida por 96% dos soros de pacientes com PCM (BLOTTA; CAMARGO, 1993).

A reatividade cruzada associada a gp43 parece ser devido à epítomos de carboidratos, mais de 85% das reações específicas de gp43 com anticorpos no soro de pacientes com PCM envolveram epítomos de peptídeos (PUCCIA; TRAVASSOS, 1991).

Taborda e Camargo (1994) avaliaram o efeito do tratamento do antígeno gp43 com metaperiodato de sódio na sorologia para PCM, em soros de pacientes com PCM, Histoplasmose, Doença de Jorge Lobo, Aspergilose, Candidíase, Criptococose e indivíduos saudáveis, e observaram positividade em todos os soros de pacientes com PCM e nenhum resultado falso positivo com os demais soros. O metaperiodato de sódio oxida epítomos de carboidratos, reduzindo a ligação dos anticorpos dirigidos contra esta porção (ALBUQUERQUE et al., 2005).

Além do diagnóstico, a gp43 pode ser utilizada no acompanhamento da terapêutica. O antígeno de 43 kDa é detectado antes do tratamento em pacientes com a forma aguda da PCM, e começa a desaparecer após 10 meses do início da terapia, e após dois anos do tratamento torna-se praticamente indetectável. Nos casos da PCM crônica o antígeno somente foi detectado nos pacientes sem tratamento e foi ausente nos casos curados (MENDES-GIANINI et al., 1989).

Salina e colaboradores (1998) avaliaram o diagnóstico e o tratamento de pacientes com PCM utilizando o *Immunoblotting* e ELISA através da detecção de antígenos em amostras de urina. No Immunoblot as bandas de 70 e 43kDa foram observadas com maior frequência na urina de pacientes antes do tratamento. A detecção de gp43 e gp70 separadamente ou concomitantemente ocorreu em 11 (91,7%) dos 12 pacientes. A gp43 permaneceu presente nas amostras de urina coletadas durante o período de tratamento, com uma significativa diminuição da reatividade nas amostras coletadas na recuperação clínica. No teste de ELISA por competição, os antígenos na urina foram detectados em nove (75%) dos 12 pacientes. Quanto à terapêutica uma diminuição do antígeno urinário correlacionava-se bem com a melhora clínica. Quando comparados os dois métodos, o ELISA demonstrou menor sensibilidade que o *Immunoblotting*, e vários fatores podem ter contribuído para as determinações falso-negativos no ELISA, como a baixa concentração do antígeno de *P. brasiliensis* detectada por este teste.

Não somente métodos sorológicos, mas também métodos moleculares vêm sendo utilizados para o diagnóstico da PCM (principalmente, PCR sozinho, ou em conjunto com outras metodologias) e incorporados na rotina dos laboratórios clínicos, para aumentar a eficácia dos atuais métodos imunológicos (SAN-BLAS; NIÑO-VEGA, 2008).

Estudos epidemiológicos revelaram a infecção por Pb em diversas espécies de animais domésticos e silvestres. Corte e colaboradores (2005) analisaram 100 amostras de soro de cavalos na Região Norte do Paraná e observaram positividade de 30% por ELISA com gp43 de *P. brasiliensis*. Corte e colaboradores (2007) analisaram a prevalência da infecção em macacos da espécie *Cebus sp.* e *Alouatta caraya* capturados no Noroeste do Paraná, e observaram por ELISA utilizando a gp43, positivities de 44,1% e 60%, respectivamente. Silveira e colaboradores (2008) analisaram 400 amostras de soro de bovinos do Mato Grosso do Sul por ELISA com gp43 e observaram positividade de 17,5%. Oliveira e colaboradores (2011) analisaram a infecção por *P. brasiliensis* em galinhas criadas livres em comparação com as criadas em granjas no Paraná e obtiveram positivities de 16% e 0%, respectivamente.

Em cães o primeiro estudo de infecção experimental de PCM foi realizado por Pereira e Viana em (1911) com a inoculação de pus de paciente com PCM em um animal que morreu 22 dias após a infecção, apresentando sinais

clínicos de PCM. Ono e colaboradores (2003) realizaram infecção experimental com *P. brasiliensis* em quatro cães filhotes por via endovenosa e uma semana após a infecção, dois animais morreram apresentando lesões granulomatosas nos pulmões, baço e fígado, dos quais foi possível isolar o fungo. Os dois animais que sobreviveram foram eutanasiados 1 e 5 meses após a infecção, e não apresentaram lesões microscópicas ou macroscópicas. Eisele e colaboradores (2004) realizaram a infecção experimental de cães adultos jovens e embora tenham observado imunidade humoral com a produção de IgG e IgM para a gp43, não foram detectados sinais de doença ou lesões nos órgãos dos animais, sugerindo que os cães adultos possam ser mais resistentes que os filhotes ao desenvolvimento de PCM doença.

Ono e colaboradores (2001) analisaram 305 amostras de soro de cães da região Norte do Paraná provenientes de áreas urbana, suburbana e rural e observaram positivities para gp43 de 14,8%, 48,8% e 89,5%, respectivamente.

Ricci e colaboradores (2004) relataram o primeiro caso da PCM doença em um cão com linfadenomegalia cervical com inflamação granulomatosa, sem, contudo, o isolamento do fungo. Farias e colaboradores (2011) descreveram o segundo caso de PCM naturalmente adquirida em um cão de 6 anos de idade que apresentava linfadenomegalia e hepatoesplenomegalia. Além dos achados clínicos, a PCM foi confirmada, por cultura, imunohistoquímica e histopatologia e o fungo foi isolado do linfonodo poplíteo do animal.

Silveira e colaboradores (2006) detectaram a presença de anticorpos para antígenos de *P. brasiliensis* em soros de cães soropositivos e soronegativos para Leishmaniose. Os autores observaram que os cães positivos para Leishmaniose apresentavam 79,9% de reatividade para o ELISA com gp43 e 12,7% para o exoantígeno na imunodifusão com exoantígeno, sugerindo reação cruzada ou co-infecção.

1.2 LEISHMANIOSE

A Leishmaniose é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que são transmitidos pela picada das fêmeas de insetos vetores. Os vetores naturais de todas as espécies de *Leishmania* pertencem à subfamília

Phlebotominae (flebotomíneos) da família *Psychodidae* (SACKS; KAMHAWI, 2001; OMS, 2010).

A Leishmaniose ainda é uma das doenças mais negligenciadas do mundo, afetando principalmente os países mais pobres e em desenvolvimento. No mundo, 350 milhões de pessoas apresentam condições de risco para contrair Leishmaniose, e cerca de dois milhões de novos casos ocorrerem anualmente (OMS, 2010).

As formas clínicas da Leishmaniose são particularmente diferentes e se dividem em: Visceral e Tegumentar. A Leishmaniose tegumentar abrange as formas cutâneas, cutânea difusa e cutânea mucosa. Os fatores determinantes para a doença são: a imunidade celular, que desempenha um papel essencial no controle da Leishmaniose; a virulência; o tropismo e a patogenicidade, que é modulada por fatores ambientais e genéticos de seus hospedeiros mamíferos e dos vetores flebótomos (YURDAKUL, 2005).

Laison e Shaw (1987) adotaram uma classificação separando as espécies de *Leishmania* em dois subgêneros: o subgênero *Viannia*, que engloba espécies *braziliensis*, *guyanensis*, *lainsoni*, *naiffi*, *shawi* e o subgênero *Leishmania* que inclui as espécies: *chagasi*, *mexicana*, *infantum*, *amazonensis*, *enriettii*, *hertigi*.

A Leishmaniose Visceral (LV) é causada no Brasil por *L. (Leishmania) chagasi* e apresenta como principais manifestações a hepato e esplenomegalia. Enquanto sete espécies são descritas como causadoras da Leishmaniose Tegumentar (LT), sendo as três principais: *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2006; BRASIL, 2007).

A Leishmaniose Cutânea (LC) é caracterizada por grande número de úlceras na pele e nas partes expostas do corpo. A Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) no Brasil está associada exclusivamente à infecção por *L. (L.) amazonensis*, onde a imunodeficiência na LC pode favorecer a anergia. Observam-se lesões disseminadas, de forma semelhante à lepra-lepromatosa. A Leishmaniose Cutâneo-Mucosa (LCM) tem como agente etiológico principal a *L. (V.) braziliensis* e é caracterizada pela resposta celular anti-*Leishmania* e pela escassez de parasitos, além da presença de lesões intensas, que podem levar à destruição extensiva e

desfigurante das membranas mucosas da boca, nariz e cavidade oral (BRASIL, 2006; SHARMA; SINGH, 2008).

As espécies de *Leishmania* apresentam duas morfologias principais em seu ciclo de vida, a forma amastigota, que é intracelular nos hospedeiros mamíferos e a forma promastigota presente no inseto vetor (BATES; ROGERS, 2004).

Na superfície das promastigotas das espécies de *Leishmania* existem diversas glicoproteínas ancoradas. As mais abundantes são as glicoproteínas de 63 e 46 kDa, denominadas MSP (*Major Surface Protease*) e PSA (*Parasite Surface Antigen*), respectivamente (MYUNG et al., 2002). MSP é também conhecida como leishmanolisina, e representa mais de 1% da proteína total do parasito. Esta enzima cliva o componente C3b do Sistema Complemento em C3bi, facilitando assim a fixação da *Leishmania* ao macrófago. A função do PSA ainda não está esclarecida (LÓPEZ, 2010, MYUNG et al., 2002).

Exoantígenos de *Leishmania* podem ser eliminados, secretados e excretados em meio de cultura pelas formas promastigotas e a partir dessa mistura de exoantígenos foram produzidos anticorpos para a detecção por ELISA e kits utilizados no diagnóstico de LV, e LT (RAJASEKARIAH et al., 2007).

O inseto vetor contaminado com o protozoário no momento da picada no hospedeiro inocula a forma promastigota que é fagocitada pelos macrófagos, transformando-se no interior destes em amastigotas, 12 a 24 h após a inoculação. Depois da transformação, as formas amastigotas multiplicam-se causando a ruptura dos macrófagos e os parasitos livres invadem outras células ou são fagocitados. Os macrófagos infectados podem permanecer localizados na pele, como no caso da LC levando à formação de úlcera; ou podem se disseminar para outros órgãos, como na LV ou para a mucosa, na LCM (SHARMA; SINGH, 2008; ETTINGER; FELDMAN, 1997).

Outras espécies como os roedores e os cães têm sido relatadas como reservatórios dos protozoários *Leishmania* (SHARMA; SINGH, 2008). Os cães domésticos constituem o principal reservatório de *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi*, e desempenham um papel fundamental na transmissão para os seres humanos (MORENO; ALVAR, 2002).

Para o diagnóstico da Leishmaniose nos laboratórios clínicos são utilizadas metodologias parasitológicas, com a demonstração do parasito, de forma

direta em espécimes biológicos e de forma indireta através de cultivo. Os testes imunológicos utilizados rotineiramente são os de Intradermorreação de Montenegro e testes sorológicos como Imunofluorescência Indireta e ELISA (BRASIL, 2007).

Szargiki et al., (2009) avaliaram a eficácia de métodos sorológicos e parasitológicos para o diagnóstico de Leishmaniose, utilizando soros de pacientes com outras doenças, como a PCM, Doença de Chagas e Toxoplasmose, comparando com pacientes com diagnóstico positivo para Leishmaniose Cutânea. O grupo de indivíduos diagnosticados com PCM apresentaram nos testes sorológicos 70% de reatividade para antígeno de *L.(L) amazonensis* e 43% para *L. (V.) braziliensis* pelo ELISA. Na Imunofluorescência Indireta a reatividade foi de 23% para ambos os antígenos. No Western Blot com o antígeno de *L. (V.) braziliensis* uma proteína de 70,8 kDa foi reconhecida pelos soros de pacientes com PCM e nos pacientes com Leishmaniose. Com o antígeno de *L. (L.) amazonensis*, as proteínas reativas foram as de 63,0 kDa e 145,5 kDa, também detectadas nos casos confirmados de Leishmaniose.

1.2.1 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

O primeiro relato de Leishmaniose Tegumentar no Brasil é de 1895, ano da observação clínica do “Botão da Bahia”. O segundo ocorreu em 1909, quando foi identificado e descrito o agente etiológico da doença conhecida como “úlceras de Bauru” (VALE; FURTADO, 2005).

A LT é uma zoonose que afeta animais silvestres e seres humanos podem estar envolvidos secundariamente. No estado do Paraná a LT é descrita desde o início do século XIX, e tornando-se endêmica a partir de 1980 (VALE; FURTADO, 2005). A *Leishmania (Leishmania) amazonensis* neste estado é o agente etiológico da Leishmaniose Tegumentar. A *Leishmania (Viannia) braziliensis* é encontrada em todas as zonas endêmicas do País, desde o Norte ao Sul, tanto em áreas de colonizações antigas ou recentes, e está geralmente associada à presença de animais domésticos, incluindo Mato Grosso do Sul, que também apresenta *Leishmania (Leishmania) amazonensis* como agente transmissor da LT (BRASIL, 2007).

Em 2010 foram registrados 21.981 casos de casos de LT no Brasil. O PR foi responsável por 228 dos 253 casos da região Sul do país, enquanto o Mato Grosso do Sul apresentou 89 casos (BRASIL, 2011).

Classicamente as lesões de LT apresentam formas ulceradas, indolores, normalmente localizadas em áreas expostas da pele, com formato arredondado ou ovalado; medindo de alguns milímetros até alguns centímetros; base eritematosa infiltrada e de consistência firme, com bordas bem delimitadas e elevadas. As lesões iniciais costumam ser nodulares, localizadas profundamente na hipoderme, ou pequenas pápulas, semelhantes à picada de inseto, que evoluem aumentando em tamanho e profundidade e ulcerando no vértice. Infecções por bactérias e fungos podem estar associadas causando dor e exsudato purulento (BRASIL, 2007; DE ARRUDA, 2010).

Devem-se diferenciar as lesões cutâneas causadas por espécies de *Leishmania*, de Úlceras Traumáticas, Úlceras de Estase, Neoplasias Cutâneas, Sífilis, Tuberculose Cutânea e Paracoccidiodomicose (GONTIJO; CARVALHO, 2003; BRASIL, 2007).

O diagnóstico laboratorial da LT pode ser feito pela pesquisa direta do parasito em material obtido de úlceras, por Intradermorreação de Montenegro e pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania*, principalmente por Imunofluorescência Indireta e ELISA. As reações sorológicas não devem ser utilizadas como critério isolado para diagnóstico de LT, pois podem apresentar reação cruzada com outros tripanosomatídeos. Além desses, a PCR é um método que vem sendo amplamente utilizado para fins de pesquisa. Na rotina de diagnóstico, porém, é ainda pouco utilizada, porém possui elevada sensibilidade quando utilizada com os métodos parasitológicos tradicionais (BRASIL, 2007).

1.2.2 LEISHMANIOSE VISCERAL

A principal espécie responsável pela Leishmaniose Visceral nas Américas é *Leishmania (Leishmania) chagasi*, embora já se tenha descrito *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* (BARRAL et al., 1986).

O registro do primeiro caso da doença no Brasil ocorreu em 1913, quando Migone, no Paraguai, descreveu o caso em material de necrópsia de

paciente oriundo de Boa Esperança, Mato Grosso (ALENCAR; DIETZE, 1991). Desde então, a transmissão da doença é descrita em vários municípios, de todas as regiões do Brasil. A doença tem apresentado mudanças importantes no padrão de transmissão, inicialmente ocorria em ambientes rurais e periurbanos e, mais recentemente, em centros urbanos como Rio de Janeiro (RJ), Corumbá (MS), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Palmas (TO), Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS), entre outros (BRASIL, 2007).

No início de 2009, no município de São Borja-RS e na região de fronteira com a Argentina foram identificados cães com diagnóstico clínico de Leishmaniose Visceral. Posteriormente isolou-se o agente *Leishmania chagasi*, destes animais. Paralelamente foram descritos os primeiros casos autóctones em humanos no Rio Grande do Sul (DE ARRUDA, 2010).

Em 2010 no Brasil foram registrados 3.526 casos de LV, no Mato Grosso do Sul ocorreram 212 casos dos 303 apresentados pela região Centro-Oeste. Na região Sul os dois únicos casos foram registrados no Rio Grande do Sul (BRASIL, 2011).

As manifestações da LV são caracterizadas por três períodos, o inicial ou fase aguda, caracterizado pelo início do aparecimento dos sintomas, como febre, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia. O segundo é o período em que o paciente apresenta febre irregular, geralmente associada ao emagrecimento progressivo, palidez cutâneo-mucosa e aumento da hepatoesplenomegalia. Caso não seja feito o diagnóstico e tratamento adequado, a doença evolui progressivamente para a fase final em que ocorre febre contínua e comprometimento mais intenso do estado geral. Instala-se a desnutrição (cabelos quebradiços, cílios alongados e pele seca), icterícia e ascite. Nestes pacientes o óbito é determinado por infecções bacterianas e/ou sangramento (BRASIL, 2007; DE ARRUDA, 2010).

O diagnóstico é rotineiramente realizado com base em parâmetros clínicos e epidemiológicos. Entretanto, o diagnóstico definitivo requer a demonstração do parasita em métodos parasitológicos (GONTIJO; MELO 2004). O exame imunológico mais utilizado no Brasil é a IFI e recentemente ensaios imunoenzimáticos, como o ELISA estão sendo empregados. A Intradermorreação de Montenegro, ou teste de *Leishmania*, ao contrário do que ocorre na Leishmaniose Tegumentar, é sempre negativo durante o período de estado da doença, não sendo

assim, utilizado para o diagnóstico. O método de PCR constitui uma nova perspectiva para o diagnóstico da LV, com 94% de sensibilidade (BRASIL, 2007).

1.2.3 LEISHMANIOSE CANINA

Os cães domésticos constituem o principal reservatório de *Leishmania spp.* e são importantes na transmissão para os seres humanos (MORENO; ALVAR, 2002). A importância dos cães tem sido justificada pela sua elevada susceptibilidade à infecção, a elevada frequência de parasitismo cutâneo e, principalmente, devido a sua estreita relação com o homem (ASHFORD, 1996). Pode-se observar em cães tanto a Leishmaniose Visceral ou a Leishmaniose Tegumentar, ou ambas simultaneamente (CFSPH, 2009).

Na Leishmaniose Tegumentar canina ocorre úlcera cutânea sugestiva, que costuma ser única, eventualmente múltipla, localizada nas orelhas e no focinho. No entanto, deve-se diferenciar de outras doenças que causam úlceras, tais como neoplasias, piodermites e micoses. Entre as micoses, especialmente a esporotricose deve ser considerada, por se tratar também de uma zoonose e apresentar-se com lesões muito semelhantes as da LT (BRASIL, 2006).

As lesões cutâneas são comuns também em cães com doença visceral. A síndrome cutânea mais comum é a excessiva descamação da epiderme com adelgaçamento da mesma, despigmentação encontrada especialmente em torno dos olhos, na face, orelhas e patas. Ocorre também o ressecamento do focinho e coxins, letargia, perda de peso, diminuição do apetite, linfadenopatia local ou generalizada, distúrbios hemorrágicos, incluindo epistaxe, hematúria e melena e áreas de alopecia. Em alguns casos, as lesões podem ser generalizadas, o pêlo perde o brilho, fica áspero e se desprende por zonas mal delimitadas e os gânglios regionais ficam hipertrofiados. Em alguns cães com lesões cutâneas, ocorre onicogribose, e as lesões oculares mais comuns são a blefarite, conjuntivite, ceratite e uveíte. Alguns animais apresentam múltiplos granulomas nas margens das pálpebras. Como sequelas incluem-se: glaucoma, cerato conjuntivite sicca, pigmentação da córnea, atrofia da íris, catarata, descolamento de retina entre outras. Entretanto, cães infectados podem permanecer sem sinais clínicos por um longo período (NELSON; COUTO, 2000; TILLEY; SMITH JUNIOR, 2003; BRASIL, 2006).

A onicogribose é considerada um sinal patognomônico para leishmaniose visceral (CIARAMELLA et al., 1997). A provável explicação para essa alteração é a baixa atividade dos cães e consequente falta de desgaste natural das unhas (MARZOCHI et al., 1985).

A LV apresenta semelhança com outras enfermidades infecto-contagiosas que acometem os cães, permitindo que o diagnóstico clínico da LV seja possível quando o animal apresenta sinais clínicos comuns à doença, ou quando o animal se originar de regiões ou áreas de transmissão estabelecida. A imunossupressão causada por *Leishmania* pode gerar infecções oportunistas, dificultando do mesmo modo o diagnóstico da LV (SILVA, 2007).

Atualmente, para inquéritos sorológicos de Leishmaniose em saúde pública os exames disponíveis para diagnóstico são: IFI e ELISA, que expressam os níveis de anticorpos circulantes. Essas duas técnicas sorológicas são recomendadas pelo Ministério da Saúde para avaliação da soroprevalência em inquéritos caninos amostrais e censitários. O método de ELISA por estar em fase de implantação, inicialmente está sendo recomendado para a triagem de cães sorologicamente negativos e a IFI para a confirmação dos cães sororreagentes ao teste ELISA ou como uma técnica diagnóstica de rotina (BRASIL, 2006). Em animais com resultados discordantes entre as metodologias, é indicado considerar o quadro clínico do animal e repetir o exame após um mês, e pode-se também realizar o exame parasitológico direto ou PCR (BANETH; AROCH, 2008).

Reis e colaboradores (2011) avaliaram a soroprevalência de LT em 489 cães do município de Bela Vista do Paraíso no PR, por meio dos testes de IFI e ELISA. Observou-se positividade de 45,4% e 38,7%, respectivamente.

Dias e colaboradores (2008) realizaram a sorologia por IFI para Leishmaniose Visceral em 76 cães sem raça definida no estado do Maranhão. Os resultados demonstraram 28 (36,84%) de positividade, sendo que 15 (53,57%) eram assintomáticos e 13 (46,43%) sintomáticos. Os sinais clínicos mais frequentes foram onicogribose, lesões de pele (alopecia, úlceras, descamação furfurácea) e linfadenopatia localizada.

De acordo com o Ministério da Saúde, a prática da eutanásia canina é recomendada a todos os animais soropositivos e/ou com exame parasitológico positivo para LV, ou apenas um teste sorológico positivo para regiões endêmicas. No caso da LT, a eutanásia é indicada somente quando os animais doentes evoluem

para o agravamento das lesões cutâneas, com surgimento de lesões mucosas e infecções secundárias que poderão conduzir o animal ao sofrimento.

Silva e colaboradores (2011) avaliaram um programa de controle de Leishmaniose no Rio de Janeiro, descrevendo os resultados dos testes laboratoriais realizados em cães eutanasiados pelo programa. Soros de 155 cães foram reavaliados em amostras obtidas após a eutanásia. O isolamento do parasita foi obtido em 29 (19%) animais. Na avaliação sorológica de 144 amostras de soro, 28% foram positivos para o IFI, enquanto 22% foram positivos para o ELISA. Considerando os 155 animais estudados, 91 (59%) foram simultaneamente negativos nas quatro técnicas (cultura parasitológica, IFI, ELISA e PCR) realizadas. Todos os animais avaliados neste estudo apresentaram-se sororreagentes para LV, uma condição primária para a eutanásia. No entanto, considerando todas as técnicas utilizadas, 59% dos cães apresentaram resultados negativos, indicando que em alguns cães soropositivos submetidos à eutanásia não apresentavam infecção por *L. chagasi* ou outro agente, embora não seja possível descartar completamente a possibilidade de infecção por *Leishmania* ou outro protozoário.

O tratamento de animais doentes não é uma medida aceita para o controle da LT, pois poderá selecionar parasitos resistentes aos medicamentos utilizados para o tratamento de casos humanos (BRASIL 2007).

Considerando a alta reatividade aos antígenos de *P. brasiliensis* por soros de cães positivos para Leishmaniose, a reatividade cruzada pode estar gerando resultados falso-positivos e conseqüentemente, cães estão sendo eutanasiados desnecessariamente. Este estudo teve como objetivo avaliar a reatividade cruzada entre antígenos de *P. brasiliensis* e *Leishmania amazonensis*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a possível reatividade cruzada entre antígenos de *P. brasiliensis* e *L. amazonensis*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar a produção de anticorpos em ratos imunizados com *P. brasiliensis* e *L. amazonensis* por meio de ELISA.

Avaliar por meio de ELISA a reatividade dos anticorpos de rato anti-*P. brasiliensis* e anti-*L. amazonensis* com exoantígeno de *P. brasiliensis* e antígeno de *L. amazonensis*.

Avaliar por meio de *Western Blot* as proteínas de *L. amazonensis* reconhecidas por anticorpos de ratos anti-*P. brasiliensis*.

Avaliar por meio de *Western Blot* as proteínas de *P. brasiliensis* reconhecidas por anticorpos de rato anti-*L. amazonensis*.

Avaliar por meio de ELISA e Imunodifusão Radial Dupla a reatividade a *P. brasiliensis* em soros de cães soropositivos e soronegativos para Leishmaniose.

Avaliar a reatividade de cães soropositivos e soronegativos para Leishmaniose com exoantígeno de *P. brasiliensis* tratado com metaperiodato de sódio.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DO EXOANTÍGENO DE *P. brasiliensis*

O isolado de *P. brasiliensis* B-339 foi cultivado em tubos com ágar Sabouraud por 3-4 dias a 35°C. As células foram inoculadas em um frasco Erlenmeyer de 50 mL contendo o meio YPD- Difco e incubadas por 3 dias a 35°C sob agitação a 50 rpm. O pré-inóculo foi transferido para outro frasco com 250 mL de meio YPD por 7 dias a 50 rpm. Posteriormente a cultura foi inativada com Timerozal 0,02 % por 18 horas a 4°C e filtrada em papel filtro. O filtrado foi liofilizado e dialisado contra água destilada e PBS 0,15 M. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando BSA como padrão.

3.2 OBTENÇÃO DO ANTÍGENO CELULAR DE *P. BRASILIENSIS*

O isolado de *P. brasiliensis* B-339 foi cultivado em ágar Sabouraud por 7 dias à 37°C e inativado com timerozal 0,02% por 24h a 4°C. Após a homogeneização no vórtex, a contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer e a concentração ajustada para 1×10^6 células/mL.

3.3 PRODUÇÃO DO ANTÍGENO SOLÚVEL DE *L. AMAZONENSIS*

Os parasitos foram obtidos por meio de cultivo do isolado de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/1977/LTB0016), na forma promastigota. As células foram cultivadas em meio 199 completo (GIBCO - Invitrogen) suplementado com 10% de soro bovino fetal, urina feminina e L-glutamina. As células foram lavadas por centrifugação em solução salina por três vezes a 2500 rpm por 10 minutos. O *pellet* final foi ressuspendido em aproximadamente 2 mL de solução salina.

A suspensão de células foi diluída em formalina 4% para a contagem na câmara de Neubauer e após a adição do inibidor de proteases PMSF 4mM, foram congeladas a -20°C.

Em seguida, os parasitos foram submetidos a três ciclos de congelamento em N₂ líquido seguido do descongelamento (Banho-Maria, 60°C) e rompidos por sonicação sob gelo. Os pulsos foram de 6 vezes cada um com 10 segundos e intervalos de 60 segundos a uma frequência de 20 kHz (Bandelin Electronic, Sonopuls HD 2070). Depois desse processo, a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando BSA como padrão.

3.4 PREPARAÇÃO DO ANTÍGENO CELULAR DE *L. AMAZONENSIS*

A forma promastigota de *Leishmania amazonensis* usada para imunização foi lavada como descrito anteriormente. Realizou-se a contagem na câmara de Neubauer e os parasitas foram inativados com formalina 0,1% a 25°C, *overnight*. Posteriormente realizou-se a lavagem com PBS 1X centrifugando a 2500 rpm por 10 minutos.

3.5 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Os antígenos de *P. brasiliensis* (exoantígeno) e de *L. amazonensis* foram submetidos a eletroforese em gel de SDS-PAGE 10% para avaliação das frações proteicas e para a transferência em membrana de nitrocelulose.

3.6 IMUNIZAÇÃO DE RATOS COM ANTÍGENOS DE *P. BRASILIENSIS* E *L. AMAZONENSIS*

Foram utilizados seis ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, adultos jovens, divididos em três grupos. Dois animais foram imunizados com o exoantígeno de Pb, dois com as células leveduriformes inativadas de *P. brasiliensis* 1x10⁶ células/mL e dois com *Leishmania amazonensis* 2,2x10⁷ células/mL, quantidades padronizadas anteriormente. Os antígenos (exoantígeno ou células de *P. brasiliensis* e células de *L. amazonensis*) foram emulsificados em Adjuvante Incompleto de Freund (Sigma) (v/v). Os animais foram imunizados via intraperitoneal com três doses com intervalo de 7 dias entre as doses. Os ratos foram anestesiados

com cetamina e xilazina (80 mg/kg e 15 mg/kg, respectivamente), seguido da coleta de sangue por punção cardíaca e estes animais foram mantidos no Biotério Central do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, com fornecimento de água e ração comercial *ad libitum*.

3.7 ANÁLISE EM SORO DE RATOS IMUNIZADOS

3.7.1 ELISA

Microplacas de poliestireno (Corning Corporation Corning, NY, USA) de 96 poços foram sensibilizada com 100µL de antígeno (exoantígeno de *Pb*, célula de *Pb* ou antígeno de *Leishmania*) em tampão carbonato bicarbonato 0,1 M, pH 9,6 por 18 horas, a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com PBS contendo 0,1% de tween-20, e os pocinhos foram bloqueados com PBS-leite em pó desnatado 5% por uma hora a 25°C. Após lavar as placas três vezes com PBS-tween 0,05% as amostras de soros dos ratos imunizados foram diluídas em 1:100 em PBS-leite 1%, adicionadas à placa em duplicata por uma hora, a 25°C. As placas foram lavadas como descrito acima e 100µL do conjugado (Anti-IgG de Rato-Peroxidase; Sigma, Saint Louis, MO, USA) (diluído 1:4000 em PBS leite 1%) foram adicionados nas cavidades. As placas foram incubadas por 1h, a 25°C. Após lavar as placas três vezes com PBS-Tween 0,05%, 100 µL do substrato cromógeno (100µL TMBZ em 10 mL de tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0 + 100µL de H₂O₂ 30%) foram adicionados e incubados por quinze minutos. Após o desenvolvimento da reação foi feito o bloqueio com ácido sulfúrico 4N (50µL por poço) e a leitura feita a 450nm em leitora de microplaca Bio Rad (iMark Microplate Reader).

No ELISA foram testados os soros dos ratos imunizados com *P. brasiliensis* (exoantígeno e célula) e os ratos imunizados com antígeno de *L. amazonensis*, tanto em placas sensibilizadas com exoantígeno de *P. brasiliensis*, como em placas sensibilizadas com antígeno de *Leishmania amazonensis*.

3.7.2 Western Blot

O antígeno (exoantígeno de Pb ou antígeno solúvel de *Leishmania*) foi submetido à eletroforese em gel SDS-PAGE 10%, em tampão tris-glicina pH 8,8, a 100V, utilizando padrão de massa molecular (Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range – Bio-Rad). Após a separação foi realizada a transferência para a membrana de nitrocelulose, a 4°C, 30V, overnight, em tampão tris-glicina 20% metanol. A membrana foi bloqueada com uma solução de PBS-leite 5%, com leite desnatado em pó a 25°C, lavada por três vezes, durante 10 minutos com PBS Tween 0,05%. As tiras da membrana foram incubadas com os soros dos ratos imunizados diluído 1:50 em PBS-leite desnatado 1% por 1 hora sob agitação. Após a lavagem com PBS Tween 0,05 %, as tiras foram incubadas com o conjugado anti-IgG de rato-peroxidase (Sigma) por uma hora. A reação foi revelada com solução de DAB e H₂O₂.

No Western Blot foram testados os soros dos ratos imunizados com *P. brasiliensis* (exoantígeno e células) e os ratos imunizados com antígeno celular de *L. amazonensis*, tanto em membranas sensibilizadas com exoantígeno de *P. brasiliensis*, como sensibilizadas com antígeno de *L. amazonensis*.

3.8 ANÁLISE EM SORO DE CÃES

Os soros dos cães de Três Lagoas foram analisados por testes sorológicos como ELISA e Imunodifusão Radial Dupla. Estes soros foram obtidos e diagnosticados como soropositivos e soronegativos para Leishmaniose pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do Município de Três Lagoas, no Leste do Mato Grosso Do Sul, latitude de 20°45'04" Sul e longitude de 51 40'42" Oeste. Três Lagoas apresenta clima quente e úmido, com temperatura média de 26°C. A média das precipitações anuais é de 900 mm a 1.400 mm. O período mais chuvoso ocorre em novembro, dezembro e janeiro e vegetação predominante é o Cerrado (gramíneo-lenhosa arbórea densa e arbórea aberta).

O diagnóstico de Leishmaniose Visceral foi realizado pelos métodos de Imunofluorescência Indireta e ELISA com kits do Ministério da Saúde no CCZ de

Três Lagoas. Foram analisados soros de 318 animais (88 fêmeas e 230 machos), dos quais 87 eram soropositivos e 231 eram soronegativos.

As análises foram realizadas com o exoantígeno do fungo *P. brasiliensis*, tanto nos testes por ELISA como pela Imunodifusão Radial Dupla.

3.8.1 Análise de soros de cães soropositivos e soronegativos para Leishmaniose por ELISA

Realizou-se o ELISA conforme descrito anteriormente para testar os soros de cães de Três Lagoas, na placa sensibilizada com exoantígeno de Pb, utilizando o conjugado (anti-IgG de cão-Peroxidase Sigma, Saint Louis, MO, USA), diluído 1:4000.

Simultaneamente a esse ELISA indireto foi realizado outro ELISA com o exoantígeno de Pb tratado com metaperiodato de sódio, na tentativa de reduzir a reatividade cruzada, uma vez que esta ocorre principalmente pela presença de epítomos carboidratos com resíduo de galactosil. A placa foi sensibilizada com o exoantígeno de *P. brasiliensis* e incubada overnight a 4°C, posteriormente lavada com PBS Tween 0,05 %, e antes do bloqueio com PBS leite 5%, foi incubado com metaperiodato de sódio 4mM em tampão acetato de sódio. As próximas etapas foram realizadas como descrito no item 3.7.

3.8.2 Análise de soros de cães soropositivos e soronegativos para Leishmaniose por Imunodifusão Radial Dupla (IDRD)

O teste foi realizado de acordo com Camargo e colaboradores (1988) utilizando o exoantígeno de *P. brasiliensis*. Preparou-se 3,5 mL de ágar 1% em PBS 1X em lâminas de microscopia. Após a gelificação, com o auxílio de uma roseta foram feitos orifícios no gel. No orifício central foram adicionados 20 µL do exoantígeno e ao redor foram adicionados 20 µL das amostras de soro. Em um dos orifícios foi colocado o soro controle positivo. A lâmina foi incubada em câmara úmida em temperatura ambiente para a difusão (24 a 48 horas), foram feitas lavagens com salina 0,9% por 24 horas, as lâminas foram secas com papel filtro. Após secarem completamente, as lâminas foram coradas com Coomassie Brilliant

Blue (Azul de Coomasie 0,15%- Sigma em etanol e ácido acético-água (4:2: 2 v/v) e descoradas com o mesmo diluente.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados pelo Teste exato de Fischer, programa Prisma 5. O nível de significância adotado foi de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE CRUZADA DE SOROS DE RATOS IMUNIZADOS COM ANTÍGENOS DE *P. brasiliensis*.

As respostas humorais a antígenos de *P. brasiliensis* dos ratos imunizados com exoantígeno e células inativadas de *Pb* estão representadas nas figuras 1, 2 e 3.

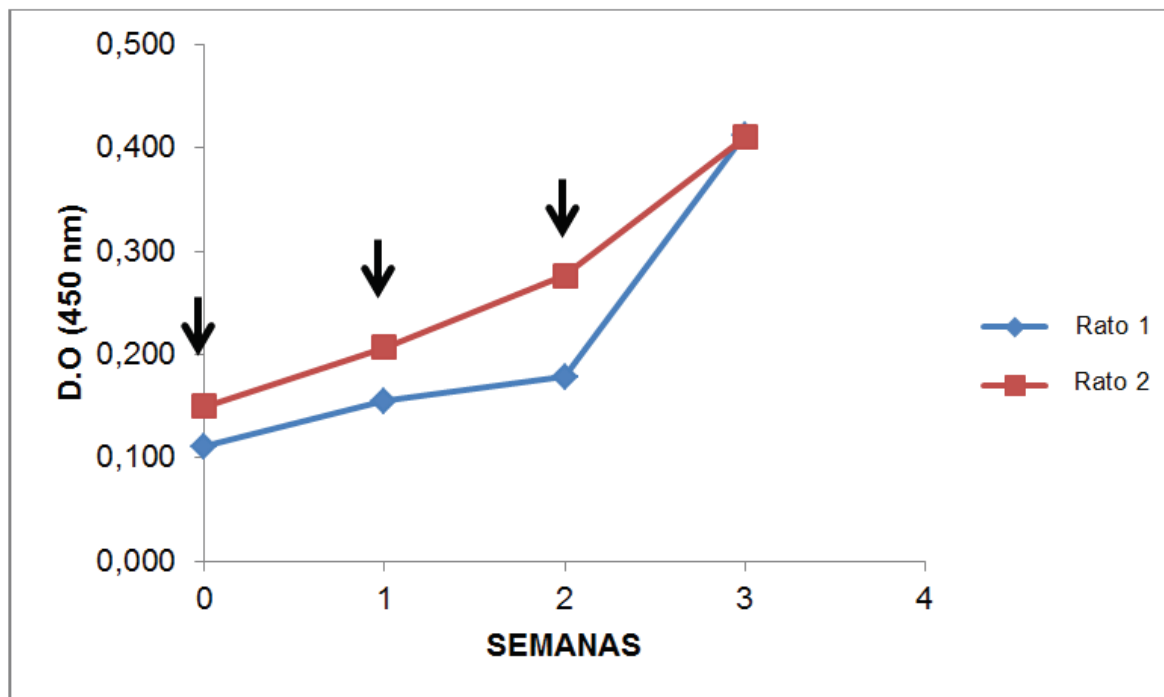


Figura 1 – Avaliação da resposta imune humoral em ratos imunizados com exoantígeno de *P. brasiliensis*. Os animais foram imunizados com 3 doses de exoantígeno de *P. brasiliensis* em adjuvante incompleto de Freund (setas) e a detecção de anticorpos foi feita em microplacas de ELISA sensibilizadas com exoantígeno de *Pb*.

Os ratos 1 e 2 imunizados com exoantígeno de *P. brasiliensis* apresentaram resposta imune humoral ao mesmo exoantígeno, o que ficou demonstrado através do aumento da D.O na medida em que foram realizadas as imunizações.

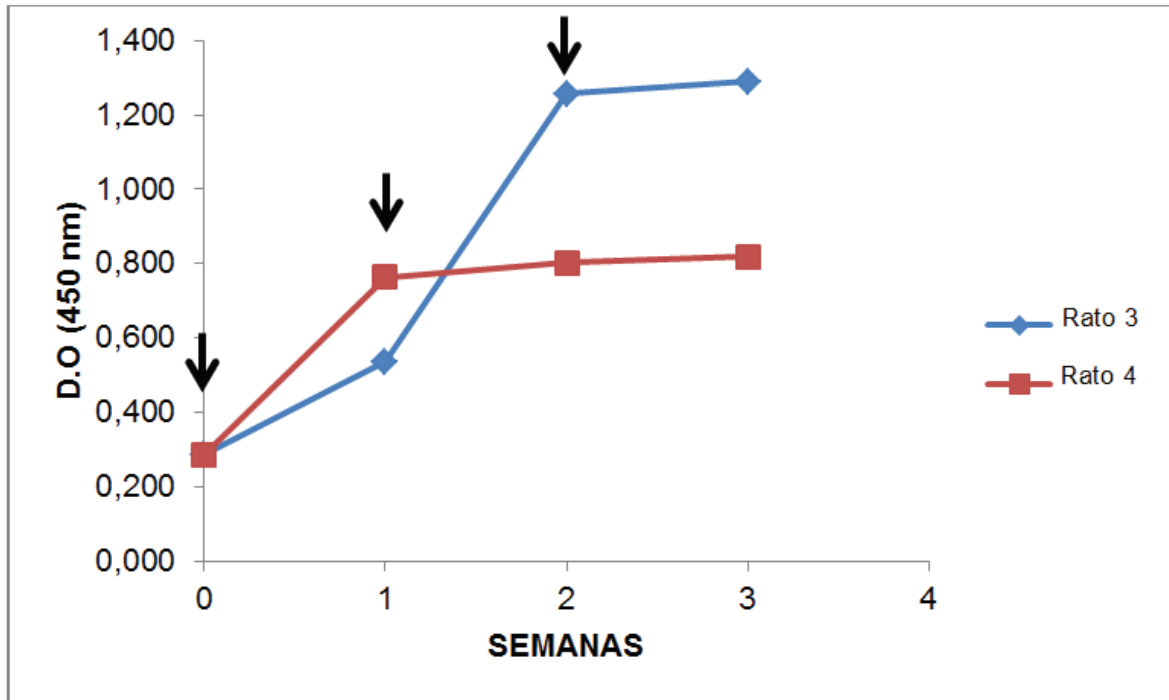


Figura 2 – Avaliação da resposta imune humoral em ratos imunizados com células inativadas de *P. brasiliensis*. Os animais foram imunizados com 3 doses de células inativadas de *P. brasiliensis* em adjuvante incompleto de Freund (setas) e a detecção de anticorpos foi feita em microplacas de ELISA sensibilizadas com células de *P. brasiliensis* inativadas.

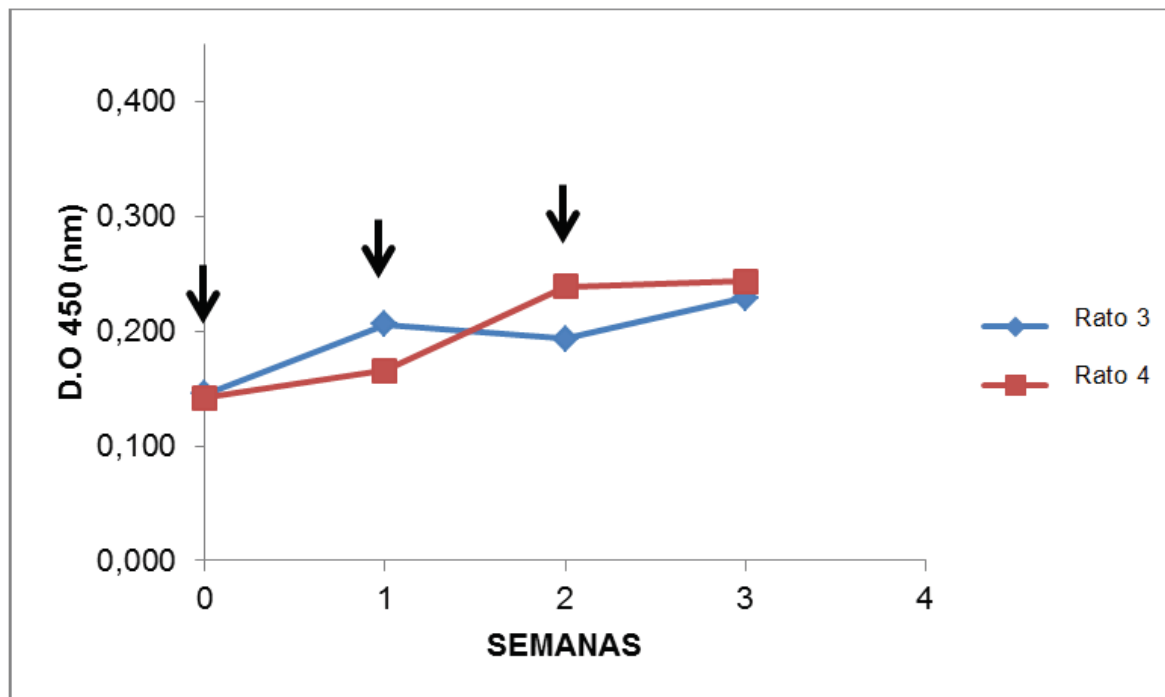


Figura 3 - Avaliação da resposta imune humoral em ratos imunizados com células inativadas de *P. brasiliensis*. Os animais foram imunizados com 3 doses de células inativadas de *P. brasiliensis* em adjuvante incompleto de Freund (setas) e a detecção foi feita em microplacas de ELISA sensibilizadas com exoantígeno de *P. brasiliensis*.

Os ratos 3 e 4, imunizados com células inativadas de *P. brasiliensis*, apresentaram resposta humoral para células de *P. brasiliensis* avaliada por ELISA, com maior reatividade do animal 3. A resposta humoral para exoantígeno de *P. brasiliensis* foi menor que para células de *P. brasiliensis*, provavelmente pelo fato das células de *P. brasiliensis* possuírem antígenos em sua maioria de parede, enquanto o exoantígeno corresponde aos antígenos liberados pelo fungo em cultura.

As reatividades dos soros dos ratos imunizados com antígenos de *P. brasiliensis* ao antígeno de *L. amazonensis* estão representadas nas figuras 4 e 5.

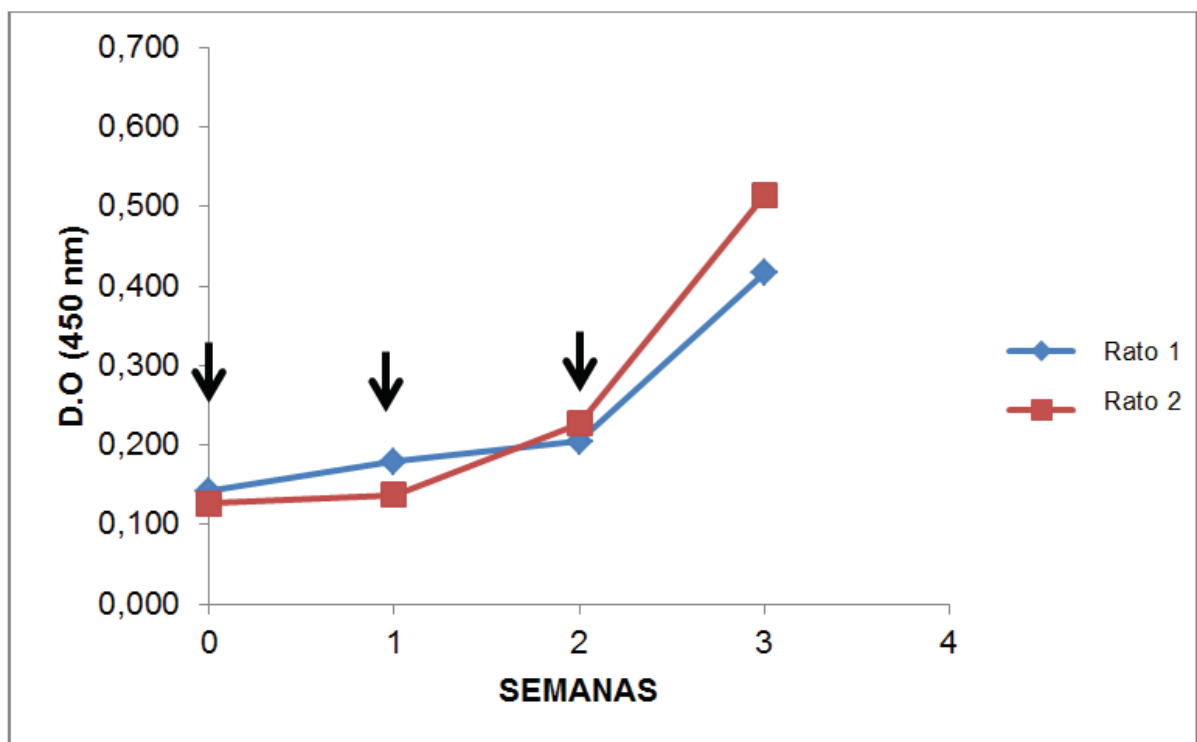


Figura 4 – Avaliação da resposta imune humoral em ratos imunizados com exoantígeno de *P. brasiliensis*. Os animais foram imunizados com 3 doses de células inativadas de *P. brasiliensis* em adjuvante incompleto de Freund (setas) e a detecção da resposta foi feita em microplacas de ELISA sensibilizadas com antígeno celular de *L. amazonensis*.

Os soros dos ratos 1 e 2, imunizados com exoantígeno de *P. brasiliensis*, apresentaram reatividade com antígeno de *L. amazonensis*, como é possível observar na figura 4.

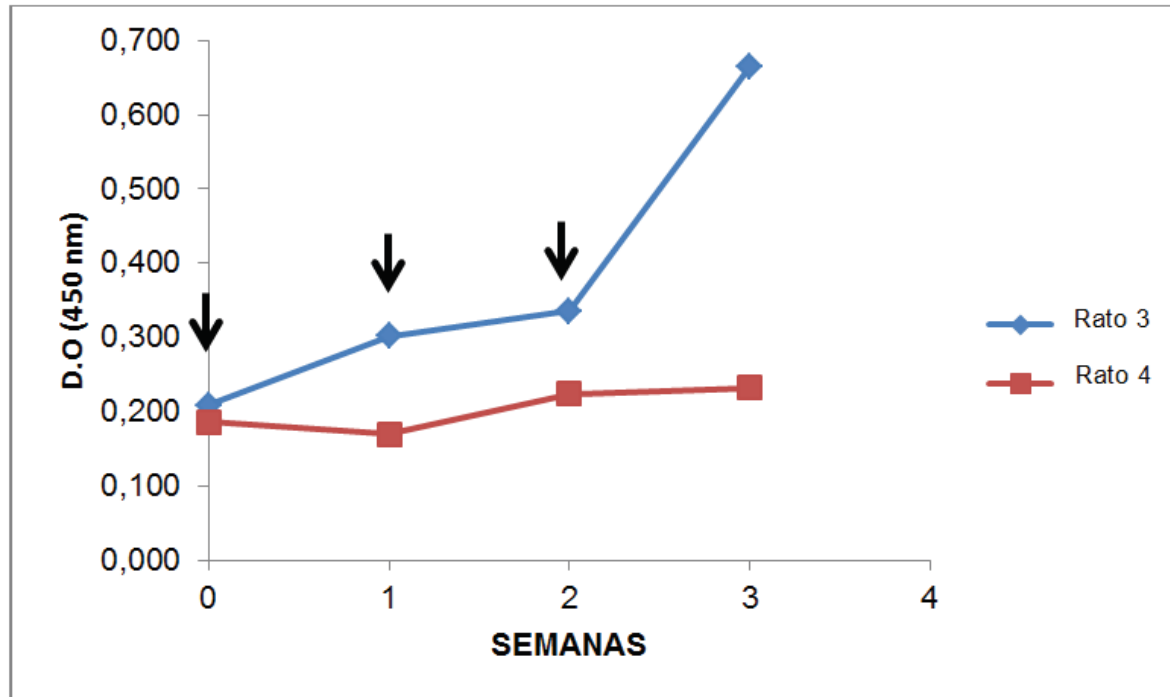


Figura 5 – Avaliação da resposta imune humoral em ratos imunizados com células inativadas de *P. brasiliensis*. Os animais foram imunizados com 3 doses de células inativadas de *P. brasiliensis* em adjuvante incompleto de Freund (setas) e a detecção de anticorpos foi feita microplacas de ELISA sensibilizadas com antígeno celular de *L. amazonensis*.

Da mesma forma que aconteceu com a resposta imune ao Pb, o rato 4 não respondeu ao antígeno de Pb, apenas o rato 3, com o aumento da D.O pós imunizações.

Os perfis dos antígenos reconhecidos pelos soros de ratos imunizados com exoantígeno e antígeno celular de *P. brasiliensis* foram avaliados por Western Blot com exoantígeno de *P. brasiliensis* (Figura 6).

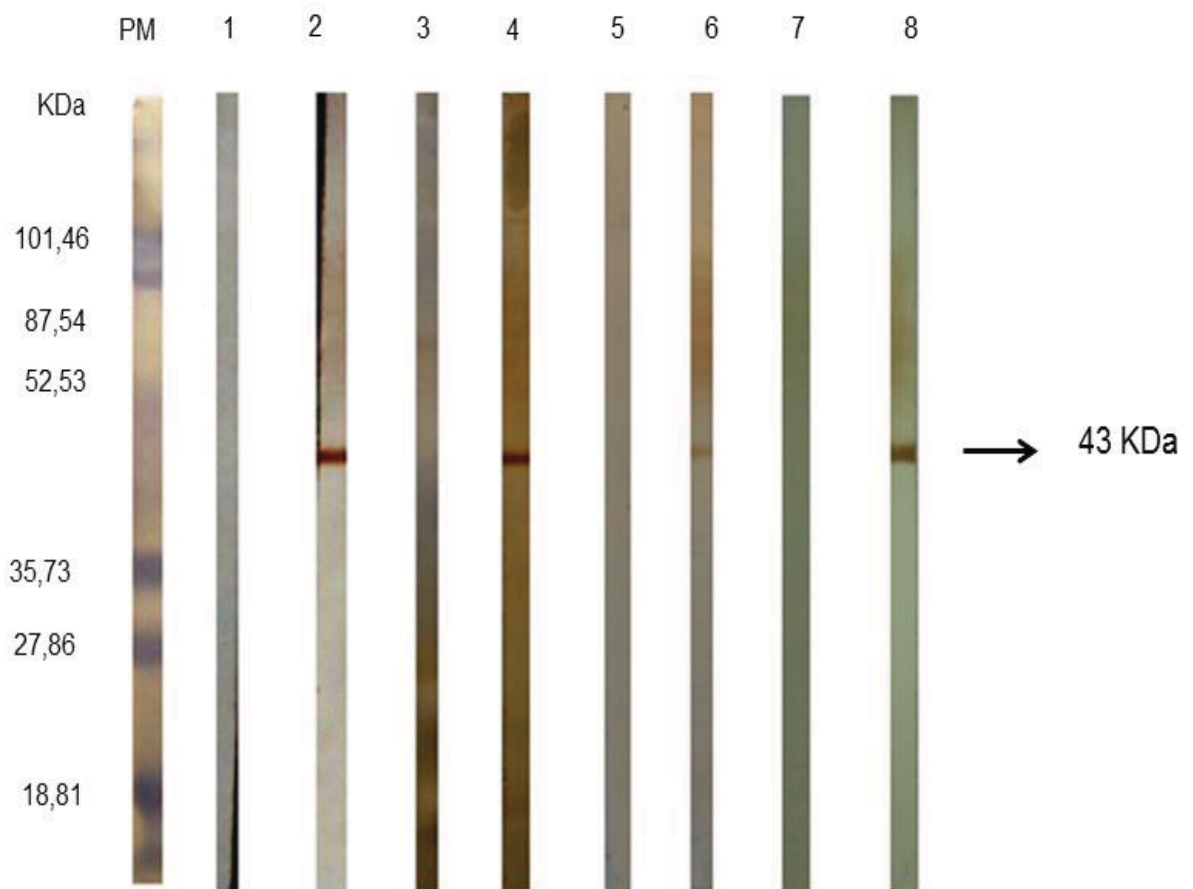


Figura 6 – Avaliação por Western Blot dos antígenos reconhecidos pelos soros de ratos imunizados com exoantígeno de Pb ou células inativadas de Pb, em membrana sensibilizada com exoantígeno de Pb. PM- Padrão de Massa da Bio-Rad, 1-Soro pré-imune do Rato 1; 2-Soro do Rato 1 após três imunizações com exoantígeno de Pb; 3-Soro pré-imune do Rato 2; 4-Soro do Rato 2 após três imunizações com exoantígeno de Pb; 5-Soro pré-imune do Rato 3; 6-Soro do Rato 3 após três imunizações com células de Pb inativado; 7-Soro pré-imune do Rato 4; 8-Soro do Rato 4 após três imunizações com célula de Pb inativado.

É possível notar que os animais após serem imunizados reconheceram a principal glicoproteína do antígeno de Pb, a gp43, além de uma banda com aspecto polidisperso.

As reatividades dos soros dos ratos imunizados com antígenos de *P. brasiliensis* foram avaliadas por Western blot com antígeno de *Leishmania*. Houve o reconhecimento da banda de aproximadamente 63 kDa após a imunização com antígenos de *P. brasiliensis* em todos os animais (Figura 7).

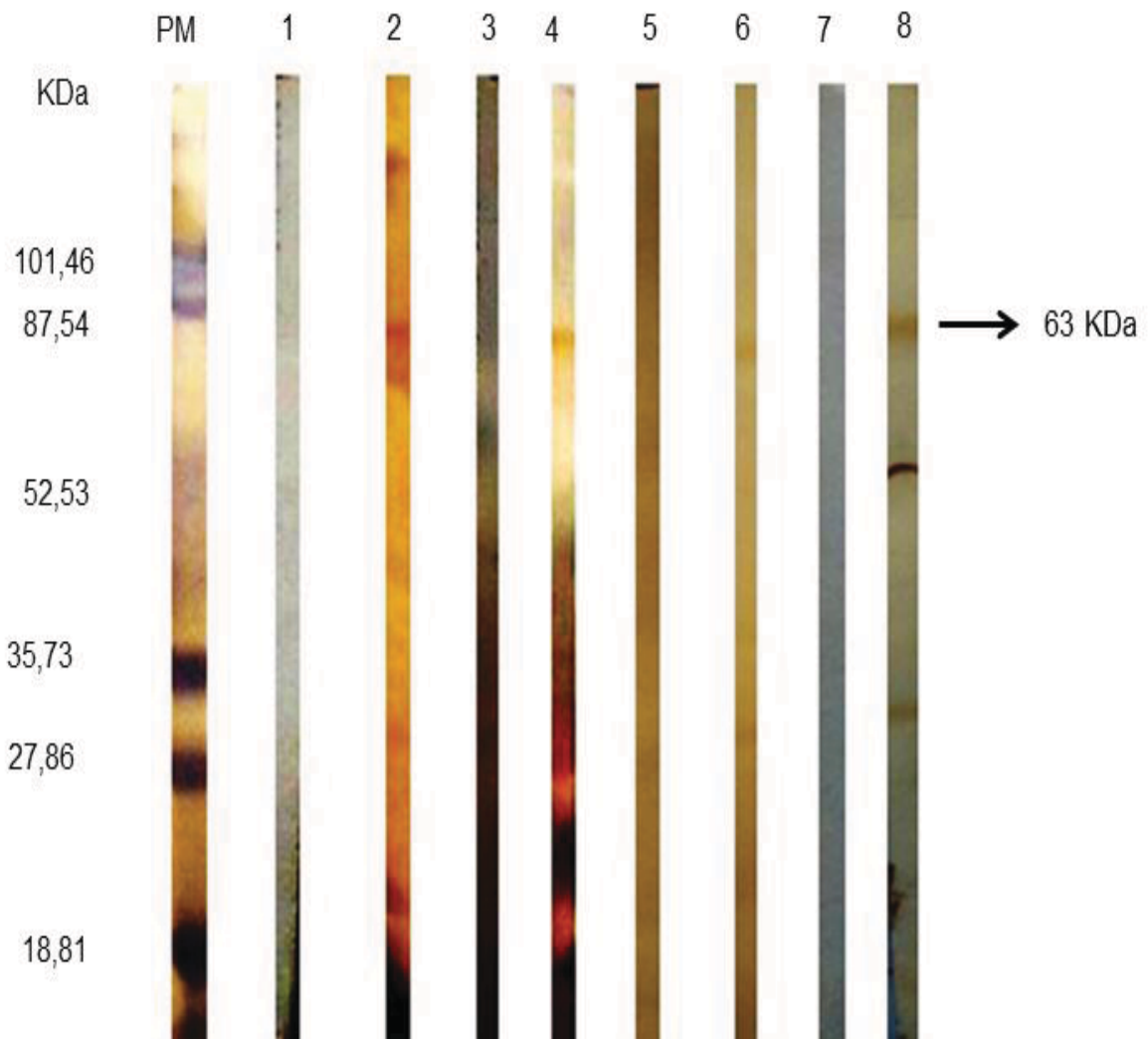


Figura 7 – Avaliação por Western Blot dos antígenos reconhecidos pelos soros dos ratos imunizados com exoantígeno de Pb e células inativadas de Pb em membrana com o antígeno celular de *L. amazonensis*. PM padrão de massa da Bio-Rad; 1-Soro pré-imune do Rato 1; 2-Soro do Rato 1 após três imunizações com exoantígeno de Pb; 3-Soro pré-imune do Rato 2; 4-Soro do Rato 2 após três imunizações com exoantígeno de Pb; 5-Soro pré-imune do Rato 3; 6-Soro do Rato 3 após três imunizações com células de Pb; 7-Soro pré-imune do Rato 4; 8-Soro Rato 4 imunizado com células de Pb.

No Western Blot foi possível observar que os soros dos ratos imunizados com *P. brasiliensis* reconheceram a glicoproteína de 63 kDa de *L. amazonensis*.

4.2 Avaliação da Reatividade Cruzada de Soros de Ratos Imunizados com *L. AMAZONENSIS*

A resposta humoral para *L. amazonensis* e *P. brasiliensis* em ratos imunizados com *L. amazonensis* foi avaliada por ELISA indireto (figuras 8 e 9).

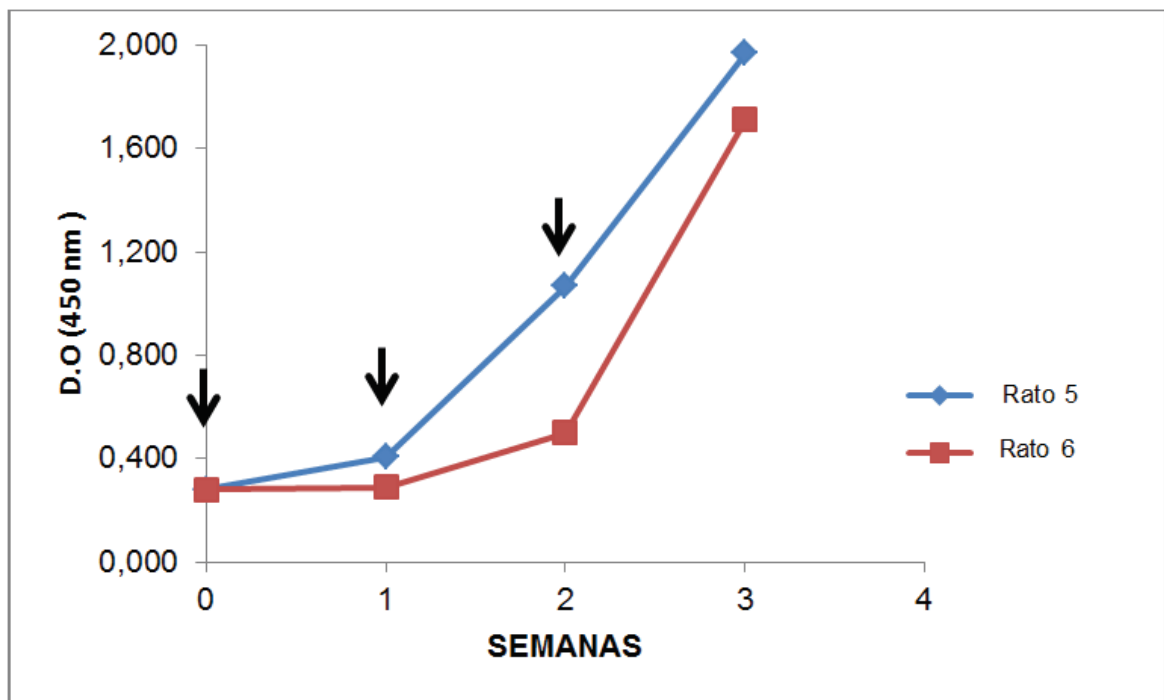


Figura 8 – Avaliação da resposta imune humoral em ratos imunizados com antígeno solúvel de *L. amazonensis*. Os animais foram imunizados com 3 doses do antígeno de *L. amazonensis* em adjuvante incompleto de Freund (setas) e a detecção de anticorpos foi feita em microplacas de ELISA sensibilizadas com antígeno celular de *L. amazonensis*.

Observa-se que os ratos imunizados com *L. amazonensis* apresentaram resposta imune humoral a este mesmo antígeno com maior reatividade após a terceira dose de antígeno.

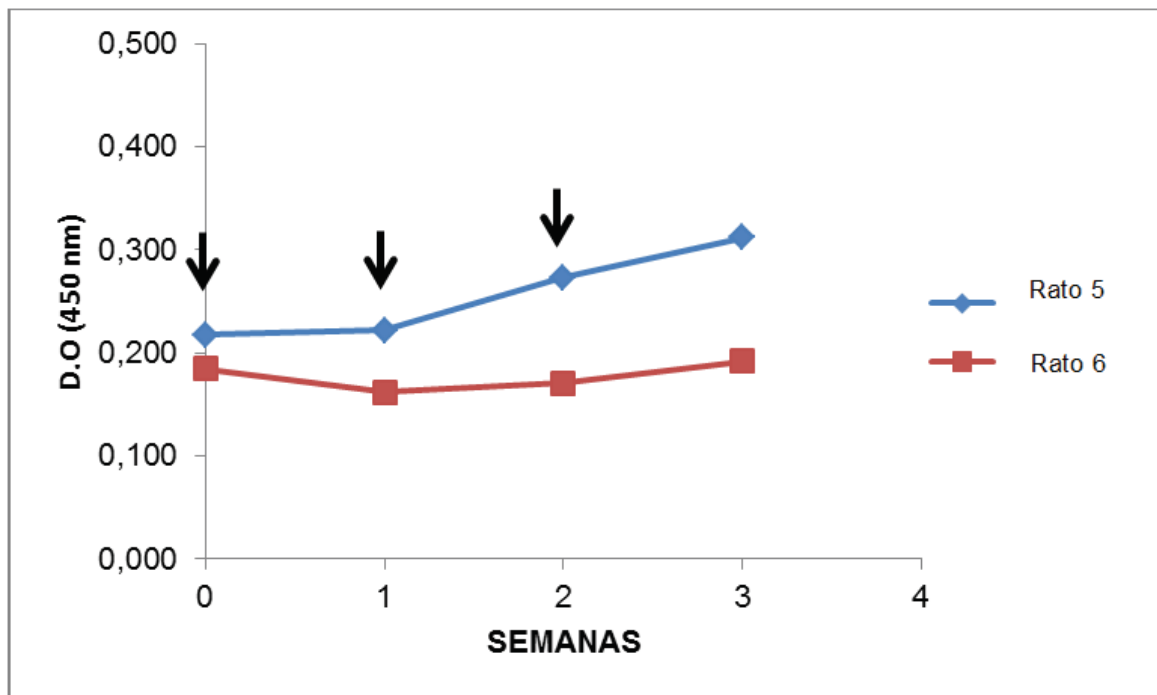


Figura 9 – Avaliação da resposta imune humoral em ratos imunizados com antígeno solúvel de *L. amazonensis*. Os animais foram imunizados com 3 doses do antígeno de *L. amazonensis* em adjuvante incompleto de Freund (setas), a de anticorpos foi feita em microplacas ELISA sensibilizadas com exoantígeno de Pb.

Os ratos 5 e 6 apresentaram pouca resposta ao antígeno de Pb, porém o Rato 5 teve maior resposta tanto para o exoantígeno de Pb como ao antígeno solúvel de *L. amazonensis*, quando comparado ao Rato 6.

As reatividades dos soros dos ratos imunizados com antígenos de *L. amazonensis* foram avaliadas por Western Blot com antígeno de *L. amazonensis* (Figura 10) e com o antígeno de *P. brasiliensis* (Figura 11).

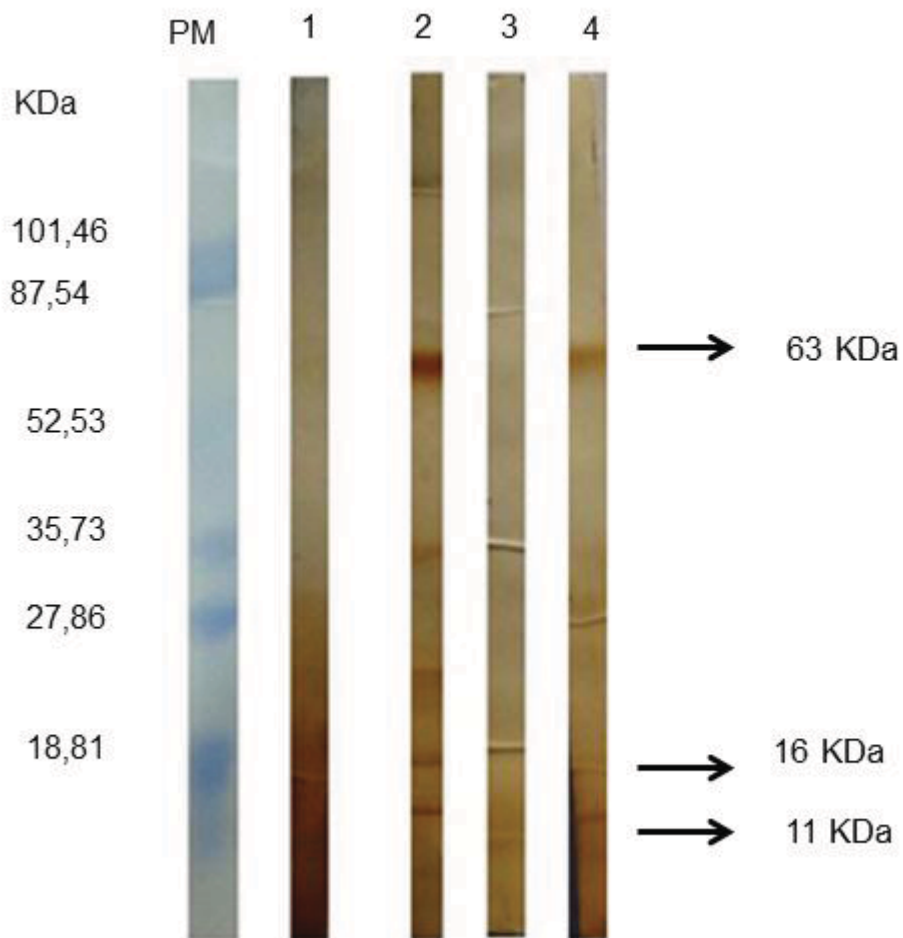


Figura 10 – Avaliação das frações proteicas por Western Blot de soros dos ratos imunizados com antígenos solúvel de *L. amazonensis* e a membrana com o antígeno celular de *L. amazonensis*. PM padrão de massa da Bio-Rad, 1-Soro pré-imune do Rato 5; 2-Soro do Rato 5 após três imunizações com antígeno de *L. amazonensis*. 3-Soro pré-imune do rato 6; 4-Soro do Rato 6 após três imunizações com exoantígeno de *L. amazonensis*.

Observou-se reconhecimento de bandas de aproximadamente 63 kDa, de 16 kDa e 11 kDa. O reconhecimento da gp63 demonstra a presença de anticorpos contra esta glicoproteína presente em antígenos do gênero *Leishmania*.

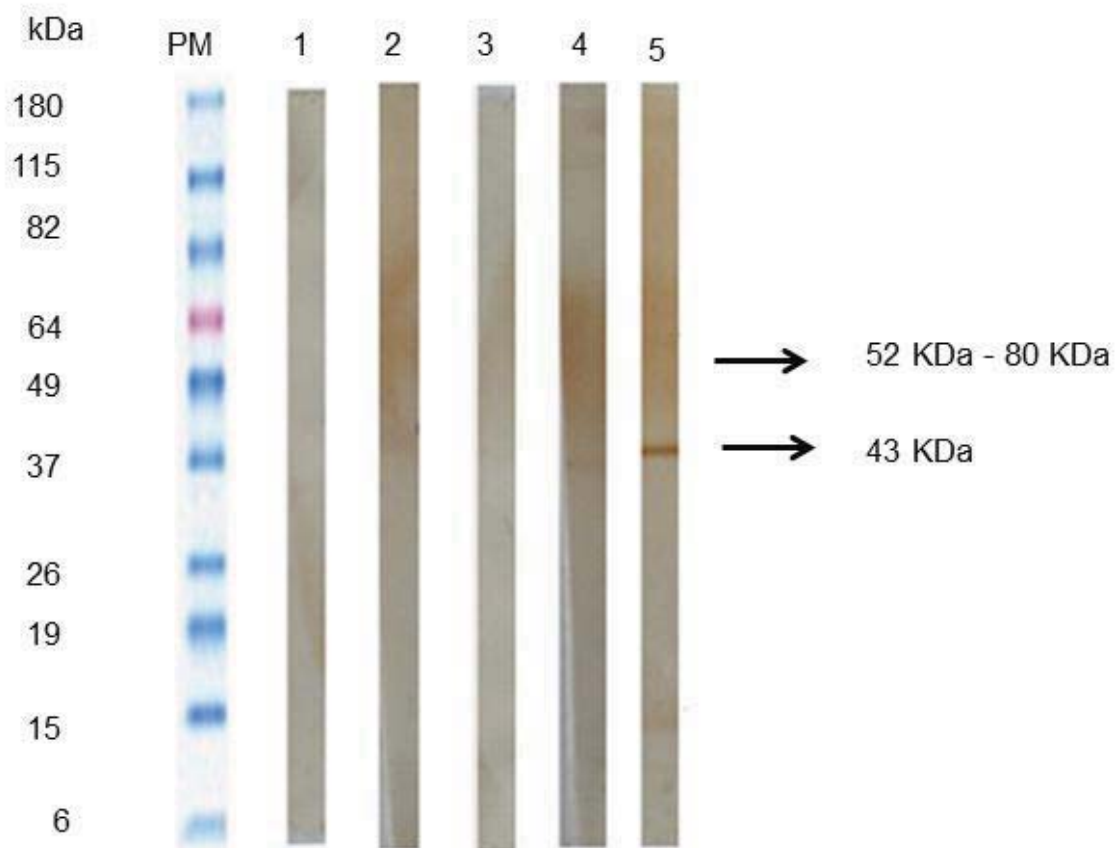


Figura 11 – Avaliação das frações proteicas por Western blot de soro de ratos imunizados com *L. amazonensis* em membrana com exoantígeno de Pb. PM-Padrão Molecular (BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder); 1-Soro Pré-imune do Rato 5; 2-Soro do Rato 5 imunizado com *L. amazonensis*; 3-Soro pré-imune do Rato 6; 4-Soro do Rato 6 imunizado com *L. amazonensis*; 5-Soro controle positivo (Rato imunizados com *P. brasiliensis*).

Verificou-se o reconhecimento de banda com aspecto difuso de migração (52 kDa - 80kDa) relatado por outros autores no antígeno de *P. brasiliensis*, nos soros dos ratos imunizados com *L. amazonensis*.

4.3 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DE SOROS DE CÃES SOROPOSITIVOS E SORONEGATIVOS DE TRÊS LAGOAS PARA EXOANTÍGENO DE *P. brasiliensis*.

Nesta etapa do trabalho foram utilizados os soropositivos e soronegativos para Leishmaniose de cães de Três Lagoas, os soropositivos na maioria dos casos apresentavam sinais clínicos de Leishmaniose Visceral (Figuras 12 e 13).



Figura 12 – Cão soropositivo para Leishmaniose com onicogrifose.
Fonte: Arquivo Pessoal - CCZ Três Lagoas.



Figura 13 – Cão soropositivo para Leishmaniose apresentando excessiva descamação da epiderme com adelgaçamento da mesma, despigmentação encontrado especialmente em torno dos olhos e na face.

Fonte: Arquivo Pessoal - CCZ Três Lagoas.

A positividade na IDRDR para *P. brasiliensis* observada nos soros positivos (n=87) e negativos (n=231) para Leishmaniose foi de 17,25% e 2,5%, respectivamente.

No ELISA a positividade para *P. brasiliensis* foi de 85,05% para os soropositivos e de 43,72% nos soronegativos para Leishmaniose e a redução da reatividade após o tratamento do exoantígeno com metaperiodato foi estatisticamente significativa (Tabela 1). O tratamento do exoantígeno com metaperiodato de sódio reduziu a positividade de 85,05% para 42,52% nos cães

soropositivos para leishmaniose e de 43,72% para 10,82% nos cães soronegativos para leishmaniose (Figura 15).

Tabela 1. Reatividade de soros de cães soropositivos e soronegativos para Leishmaniose contra exoantígeno de *P. brasiliensis* analisado por ELISA e ELISA com metaperiodato (ELISA MP).

	ELISA*	ELISA MP*
Soropositivos		
Leishmaniose		
Positivo	85,05% (74)	42,52% (37)
Negativo	14,95% (13)	57,48% (50)
n	87	87
Soronegativos		
Leishmaniose		
Positivo	43,72% (101)	10,82% (25)
Negativo	56,28% (130)	89,18% (206)
n	231	231

* P<0,0001

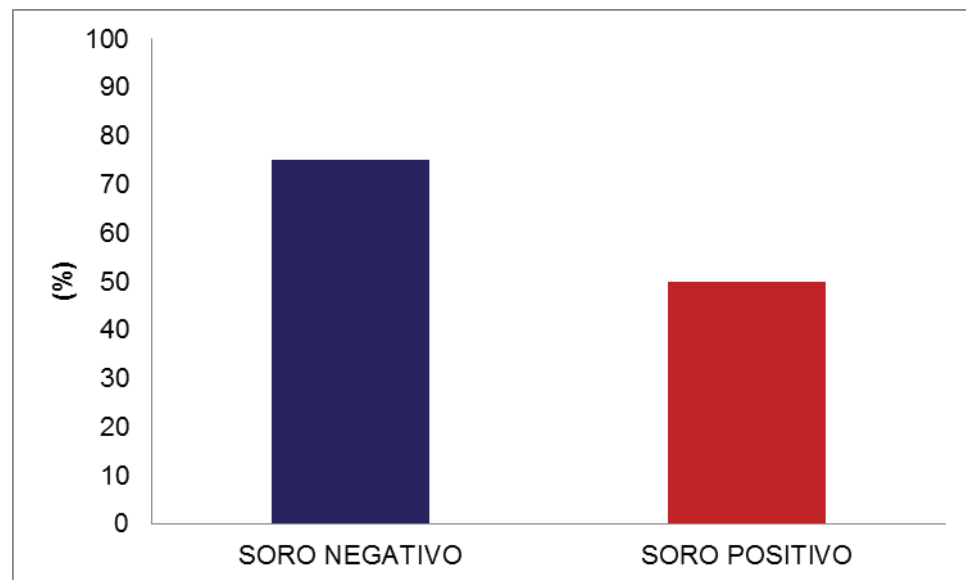


Figura 15 – Avaliação da redução da reatividade dos soros de cães soropositivos e soronegativos para Leishmaniose por ELISA e ELISA MP.

Na figura 16 estão representadas algumas das amostras dos soros de cães analisadas por IDR com o exoantígeno de *P. brasiliensis*.

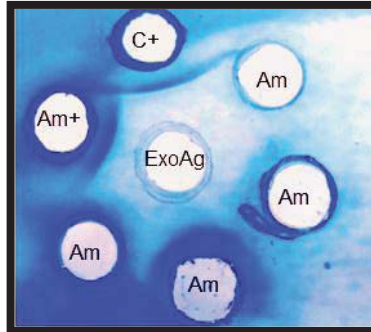


Figura 16 – Avaliação da reatividade dos soros de cães com diagnóstico positivo e negativo para Leishmaniose pelo método de Imunodifusão Radial Dupla com antígeno de *P. brasiliensis*. ExoAg= Exoantígeno de *P. brasiliensis*. C+ = controle positivo. Am+= amostras positiva. Am= Amostras negativas.

5 DISCUSSÃO

Os testes sorológicos têm sido utilizados por várias décadas no diagnóstico e acompanhamento do tratamento da PCM (CAMARGO, 2008). Um dos principais problemas apresentados por esses testes é a possibilidade de reatividade cruzada, que ocorre principalmente devido aos epítomos carboidratos. Em testes como ELISA e IDR são frequentes reações cruzadas com outras micoses como a Histoplasmose, Doença de Jorge Lobo, Candidíase e Blastomicose (RESTREPO, 1985; PUCCIA; TRAVASSOS, 1991).

Nos métodos utilizados na sorologia da Leishmaniose também podem ocorrer reações cruzadas com outras doenças, principalmente com Doença de Chagas, uma vez que os protozoários causadores dessas doenças pertencem à mesma família *Trypanosomatidae*, e possuem proteínas antigênicas comuns ao grupo, dificultando o diagnóstico sorológico. Os soros de pacientes com infecções por *Trypanosoma cruzi* reconheceram bandas de aproximadamente 25 kDa, 38 kDa, e superior a 97 kDa em lisados de *T. cruzi* e reconheceram uma banda de 38 kDa de 66 kDa em lisados de *Leishmania* (CHILLER; SAMUDIO; ZOULEK, 1990). Pacientes chagásicos apresentaram de 98 a 100% de soropositividade pelo ELISA quando antígenos de *Leishmania braziliensis* e de *Leishmania chagasi* foram usados, respectivamente (VEXENAT; SANTANA; TEIXEIRA, 1996).

A reatividade cruzada também foi observada entre os antígenos de *Leishmania* e anticorpos de pacientes com micoses profundas, quando estas doenças compartilham a mesma área de transmissão. Schubach e colaboradores (2001) detectaram por IFI a presença de anticorpos IgG anti-*Leishmania* em dois pacientes com PCM. Barros e colaboradores (2005) relataram que soros de pacientes com Esporotricose apresentavam reatividade com antígenos de *Leishmania* nos ensaios de IFI (6,5%) e ELISA (22,2%).

As imunizações com *P. brasiliensis* e *L. amazonensis* quando analisados com o mesmo antígeno apresentaram resultados semelhantes aos obtidos por outros autores como Silveira e colaboradores (2008) que realizaram a imunização em gado leiteiro com células inativadas de Pb, assim como Oliveira e colaboradores (2011) em galinhas, as quais apresentaram resposta imune humoral após a imunização. Assim como Mutiso e colaboradores (2010) ao imunizarem

camundongos com promastigotas de *Leishmania major* observaram aumento significativo e específico de resposta IgG à *Leishmania*.

Para os animais imunizados quando desafiados com antígenos diferentes aos da imunização não existem dados similares em literatura. No que se refere à PCM em humanos e sua relação com a Leishmaniose, Szargiki e colaboradores (2009) observaram na reação de ELISA que 70% dos soros reagiram ao antígeno de *L. amazonensis*.

No Western Blot verificou-se que os soros de ratos imunizados com exoantígeno e células de *P. brasiliensis* reconheceram a gp43, o antígeno mais utilizado na sorologia da PCM e reconhecida pela maioria dos soros de pacientes com PCM (PUCCIA et al., 1986; CAMARGO et al., 1994). Observou-se também uma banda com aspecto difuso de migração eletroforética, semelhante ao relatado por Puccia et al., (1986).

Os soros dos ratos imunizados com Pb no Western Blot utilizando o antígeno de *L. amazonensis* reconheceram a gp63. Essa glicoproteína também foi reconhecida em soros de pacientes com PCM analisados por Western Blot com antígeno de *L. amazonensis* (SZARGIKI et al., 2009).

No Western Blot com os soros dos ratos imunizados com *L. amazonensis* e a membrana sensibilizada com o mesmo antígeno, a principal banda reconhecida foi a gp63. Essa glicoproteína foi demonstrada por Russel e Wilhelm, (1986) com uma marcação radioativa em um exame inicial de proteínas de superfície de promastigotas, como um polipeptídeo abundante de peso molecular próximo a 63 kDa. Segundo Frommel e colaboradores (1990) a gp63 é expressa em ambas as fases e em todas as espécies de *Leishmania*. Outras proteínas com massas moleculares entre 35 e 10 kDa foram detectadas.

Quando a membrana foi sensibilizada com exoantígeno de Pb os soros dos ratos imunizados com *L. amazonensis* reconheceram uma banda com aspecto difuso de migração eletroforética, como observado nos soros de ratos imunizados com Pb.

Como citado anteriormente as principais metodologias sorológicas para o diagnóstico de Leishmaniose são o ELISA e a IFI. Normalmente as pesquisas com identificação e isolamento de proteínas têm sido voltadas para a padronização de vacinas e pouco vem sendo aplicado ao diagnóstico em larga escala (CARDOSO et al., 2003).

Os resultados obtidos nos soros de cães positivos e negativos para Leishmaniose assemelham-se aos obtido por outros autores. Para os 318 soros analisados neste estudo 6,6% foram positivos na IDRDR e 54,5% positivos no ELISA, ambos utilizando exoantígeno de Pb. Silveira e colaboradores (2006) analisaram 836 soros de cães (449 positivos e 387 negativos para leishmaniose) e a positividade na IDRDR com exoantígeno de Pb foi de 7,3% enquanto que no ELISA utilizando gp43 a positividade foi de 67,8%. As reatividades dos cães soropositivos para leishmaniose foram maiores para gp43 e exoantígeno (79,9% e 12,7%, respectivamente) que os animais soronegativos (54,0% e 1,0%, respectivamente).

Em nosso estudo os cães soropositivos e soronegativos para Leishmaniose apresentaram positividade de 85,05% e 43,72%, respectivamente no ELISA com exoantígeno. O hábito dos cães de cavar e farejar o solo são provavelmente fatores que podem aumentar o risco de infecção por Pb (ONO *et al.*, 2001).

O metaperiodato de sódio por meio da oxidação de epítomos de carboidratos pode reduzir a reatividade cruzada e, conseqüentemente aumentar a especificidade da reação (ALBUQUERQUE *et al.*, 2005; NEVES *et al.*, 2003). A redução da positividade após o tratamento do exoantígeno com metaperiodato foi maior no animais soronegativos para Leishmaniose, sugerindo que os anticorpos eram dirigidos aos epítomos de carboidratos, enquanto a maioria dos anticorpos dos animais soropositivos para Leishmaniose era dirigido às porções proteicas.

Neves e colaboradores (2003) determinaram os perfis de anticorpos em soros de pacientes soropositivos e soronegativos no teste IDRDR para Pb. Foram analisados 46 soros de pacientes com PCM ativa e as respostas de IgG para gp43 (tratada ou não com metaperiodato de sódio) por ELISA. Soros de pacientes negativos para IDRDR foram positivos no ELISA com gp43, no entanto, os títulos de anticorpos eram menores, do que os positivos para IDRDR. Quando os soros foram testados com gp43 tratada com metaperiodato de sódio, os valores de absorbância dos soros negativos para a imunodifusão, reduziram significativamente, ficando abaixo do valor de corte, enquanto os soros positivos para IDRDR, embora mostrando uma diminuição significativa nos valores de absorbância, mantiveram D.O acima do corte.

Os resultados dos experimentos com ratos imunizados e a sorologia para Pb em cães soropositivos e soronegativos para Leishmaniose indicam uma provável reatividade cruzada entre PCM e Leishmaniose.

No Brasil é preconizada a eutanásia dos cães diagnosticados com Leishmaniose Visceral, doença considerada letal, porém essa medida é alvo de controvérsias. O risco de diagnósticos falso-positivos é eminente e as metodologias atuais disponíveis ainda apresentam reações cruzadas. Além disso, muitos animais que não desenvolvem a doença podem atuar como transmissores. Dessa forma, é necessário investigar a existência de reação cruzada entre estas doenças para tornar o diagnóstico mais específico, evitando assim que animais sejam eutanasiados desnecessariamente.

6 CONCLUSÕES

- Os soros de ratos imunizados com antígenos de *P. brasiliensis* reconheceram antígenos de *L. amazonensis* nos ensaios de ELISA e Western Blot.
- Os soros de ratos imunizados com antígenos de *L. amazonensis* reconheceram antígenos de *P. brasiliensis* nos testes de ELISA e Western Blot.
- Cães soropositivos para leishmaniose apresentam maior positividade para exoantígeno de *P. brasiliensis* que cães soronegativos para leishmaniose.
- A redução da positividade com o tratamento do exoantígeno de *P. brasiliensis* com metaperiodato foi maior nos soronegativos para Leishmaniose do que nos soropositivos.

REFERÊNCIAS

- ASHFORD, R.W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinic in Dermatology*, v.14, p.523-532, 1996.
- ALBORNOZ, M. B. Isolation of *Paracoccidoides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia*, v. 9, n. 3, p. 248-253, 1971.
- ALBUQUERQUE C.F.; MARQUES da SILVA, S.H.; CAMARGO. Z.P. Improvement of the specificity of an ELISA-linked immunosorbent assay for diagnosis of Paracoccidioidomycosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.43, p. 1944-1946, 2005.
- ALENCAR J.E; DIETZE P. Leishmaniose visceral (Calazar). In: Veronesi R. Doenças Infecciosas e Parasitárias. 8 ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1991.
- BANETH G.; AROCH I. Canine Leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. *The Veterinary Journal*, v.175, p. 14-15, 2008.
- BAGAGLI, E. et al. *Paracoccidoides brasiliensis*: Phylogenetic and ecological aspects. *Mycopathologia*, v.165, p.197-207, 2008.
- BARRAL A.; BADARÓ, R.; BARRAL-NETTO M. et al. Isolation of *Leishmania mexicana amazonensis* from the bone marrow in a case of American visceral Leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 35, p.732-734, 1986.
- BARROS M.B.L.; SCHUBACH A.; FRANCESCONI A.C.V. et al. Positive Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio de Janeiro. *Acta Tropica*, v. 93, p.41-47, 2005.
- BATES, P.A.; ROGERS, M.E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Current Molecular Medicine*, v. 4, n.6, p.601-609, set, 2004.

BLOTTA, M. H. S. L.; CAMARGO Z.P. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, p. 671-676, 1993.

BORBA, C. M.; SCHÄFFER G. M. V. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and an attempt to induce the dimorphic process with fetal calf serum. *Mycoses*, v.45, p.174-179, 2002.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytic Biochemistry*, v.72, p.248-254, 1976.

BRASIL, Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, Brasília-DF, 1 ed., Editora MS, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Leishmaniose Tegumentar Americana, Brasília-DF, 2 ed. Editora MS, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Situação epidemiológica Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2010, 2011.

CAMARGO, Z. P.; UNTERKIRCHER, C.; CAMPOY, S. P.; TRAVASSOS, L. R. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion test. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 26, n. 10, p. 2147-2151, 1988.

CAMARGO Z.P.; FRANCO M.F. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Revista Iberoamericana Micología*, v. 17, p. 41-48, 2000.

CAMARGO, Z.P. Serology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*, v. 165, p. 289-302, 2008.

CARDOSO S.R.A.; SILVA, J. C. F.; COSTA, R. T. et al. Identification and purification of immunogenic proteins from nonliving promastigote polyvalent *Leishmania* vaccine (Leishvacin[®]). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.36, n.2, 2003.

CFSPH (The Center for Food Security and Public Health). Leishmaniasis (cutaneous and visceral), out, 2009.

CHILLER T.M.; SAMUDIO M.A.; ZOULEK G. IgG antibody reactivity with *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* antigens in sera of patients with Chagas disease and Leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 43, p. 650-660, 1990.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R.D. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Research*, v.22, p.539-543, 1997.

CORTE, A.C.; ITANO, E.N.; ONO, M.A.; CAMARGO, Z.P. Paracoccidioidomycosis-infection in horses in the north Paraná state, Brazil. IX International Meeting on Paracoccidioidomycosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.47, n. 14, 2005.

CORTE, A.C.; SVOBODA, W.K.; NAVARRO, I.T. et al. Paracoccidioidomycosi in wild monkeys from Paraná State, Brazil, *Mycopathologia*, v. 164, p. 225-228, 2007.

DE ARRUDA, M.M. Leishmanioses. *Zoonoses (org.)*, p. 68-90, 2010.

DIAS, E.L.; BATISTA, Z.S.; GUERRA, R. M. S. N. et al. Canine Visceral Leishmaniasis (CVL): seroprevalence, clinical, hematological and biochemical findings of dogs naturally infected in an endemic area of São José de Ribamar municipality, Maranhão state, Brazil. *Ciência Animal Brasileira*, v. 9, n. 3, p. 740-745, jul./set. 2008.

DINIZ S.N.; CARVALHO, K.C.; CISALPINO, P.S. et al. Expression in bacteria of the gene encoding the gp43 antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*: Immunological reactivity of the recombinant fusion proteins. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v.9, n.6, p.1200-1204, 2002.

EISELE, R.C.; JULIANI, L.C.; BELITARDO, D.R. et al. Immune response in dogs experimentally infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Medical Mycology*, v.42, p. 549-553, 2004.

ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. *Medicina Interna Veterinária*. 4 ed. São Paulo: Manole, 567p, 1997.

FARIAS M.R. CONDAS L.A.; RIBEIRO M.G. et al. Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly. *Mycopathologia*, v. 172, n. 2, p.147-52, 2011.

FRANCO, M. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, v. 25, p. 5-18, 1986.

FROMMEL T.O.; BUTTON, L.L.; FUJIKURA, Y.; McMASTER,W.R. The major surface glycoprotein (gp 63) is present in both life stages of *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 38, n. 1, p.25-32, jan. 1990.

GONTIJO B.; CARVALHO M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.6, n. 1, p.71-80, 2003.

GONTIJO C.M.F.; MELO M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectiva. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 7, n. 3, p.338-349, 2004.

KANETSUNA F.; CARBONEL L.M. Cell Wall Glucans of the Yeast and Mycelial Forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal Of Bacteriology*, v.101, n. 3, p. 675-680, 1970.

LAISON R.; SHAW J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In W Peters, R Killick-Kendrick (eds), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, v.1, Academic Press, London, p. 1-120. 1987.

LÓPEZ, R.E.S. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. *Química Nova*, v.33, n.7, p. 1541-1548, 2010.

MARZOCHI M.C.; COUTINHO, S.G.; SOUZA, W.J. S. et al. Canine Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutic and epidemiological findings (1977-1983). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 80, p. 349-357, 1985.

Mc EWEN J.G.; BEDOYA V.; PATIÑO, M.M.; SALAZAR M.E.; RESTREPO A. Experimental murine paracoccidiodomycosis induced by the inhalation of conidia. *Journal of Medical Veterinary Mycology*, v. 25, n. 3, p. 165-75, jun 1987.

MENDES-GIANNINI M.J., BUENO, J. P.; SHIKANAI-YASUDA M. A. et al. Detection of 43,000-molecular-weight glycoprotein in serum of patients with paracoccidiodomycosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.27, p. 2842-5, 1989.

MORENO J.; ALVAR J. Canine Leishmaniasis:epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*, v.18, n. 9, 2002.

MUTISO, J. M.; MACHARIA, J.C.; MUTISYA, R.M.; TARACHA, E. Subcutaneous immunization against *leishmania major* - infection in mice: efficacy of formalin-killed promastigotes combined with adjuvants. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.52, n.2, p. 95-100, 2010.

MYUNG, K. S.; BEETHAM J.K.; WILSON M.E.; DONELSON J.E. Comparison of the post-transcriptional regulation of the mRNAs for the surface proteins PSA (gp46) and MSP (gp63) of *Leishmania chagasi*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, p. 16489-16497, 2002.

NEGRONI B. R. Paracoccidioidomicosis. En: Torres Rodriguez JM, editor. Introducción a la Micología Médica. México, Ed. Panamericana, p. 263-73, 1995.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Medicina Interna de Pequenos Animais. 2. ed. São Paulo, Guanabara Koogan, 2000.

NEVES, A.R.; MAMONI, R. L.; ROSSI, C.L. et al. Negative Immunodiffusion Test Results Obtained with Sera of Paracoccidioidomycosis Patients May Be Related to Low-Avidity Immunoglobulin G2 Antibodies Directed against Carbohydrate Epitopes. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 10, n. 5 p. 802–807, Sept. 2003

OLIVEIRA G.G.; SILVEIRA, L.H.; ITANO, E.N. et al. Serological Evidence of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in chickens from Paraná and Mato Grosso do Sul States, Brazil. *Mycopathologia*, v. 171, n. 3, p.197-202, mar. 2011.

ONO, M.A.; BRACARENSE A.P.; MORAIS H.S. et al. Canine paracoccidioidomycosis: a soroepidemiologic study. *Medical Mycology*, v. 39, p. 277-282, 2001.

ONO, M.A.; KISHIMA, M.O.; ITANO, E.N.; BRACARENSE, A.P.F.R.L; CAMARGO, Z.P. Experimental paracoccidioidomycosis in dogs. *Medical Mycology*, v. 41, p.265-268, 2003.

OMS. Control Of The Leishmaniases: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22–26 March 2010. p. 1-186, 2010.

PEREIRA, M.; VIANA, G. A propósito de um caso de blastomicose (*Pyohemia blastomycotica*). *Arquivo Brasileiro de Medicina*, v. 1, p. 65-83, 1911.

PUCCIA, R.; SCHENKMAN S., GORIN, P.A.; TRAVASSOS L.R. Exocellular Components of *Paracoccidioides brasiliensis*: Identification of a Specific Antigen. *Infection and Immunity*, v. 53, p.199-206, 1986.

PUCCIA, R. TRAVASSOS, L.R. 43-Kilodalton Glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: Immunochemical Reactions with Sera from Patients with Paracoccidioidomycosis, Histoplasmosis, or Jorge Lobo's Disease. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 29, n. 8, p. 1610-1615, ago, 1991.

RAJASEKARIAH G.H.; SMITHYMAN A. M.; GUPTA R.K.; MARTIN, S.K. The utility of exoantigens for detection of Leishmania infections. *Military Medicine*, v. 172, n. 5, p. 482-5, 2007.

REIS H.R.; LOPES-MORI, F.M.R.; REIS C.R. et al. Soroprevalência da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) canina e fauna de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em Bela Vista do Paraíso, Paraná. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 32, n.3, 2011.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, v.23, p. 323-334, 1985.

RICCI, G.; MOTA F.T.; WAKAMATSU A. et al. Canine paracoccidioidomycosis. *Medical Mycology*, v. 42, p. 379-383, 2004.

RUSSEL, DG.; WILHELM H. The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. *The Journal of Immunology*, v.136, n.7, p. 2613-2620, 1986.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and Vector-host interactions in Leishmaniasis. *Annual Review of Microbiology*, v.55, p.453–83, 2001.

SALINA M.A. SHIKANAI-YASUDA M.A.; MENDES R.P. et al. Detection of circulating *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in urine of paracoccidioidomycosis patients before and during treatment. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 6, p.1723-8. jun 1998.

SAN-BLAS G.; SAN-BLAS F. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. *Mycopathology*, v. 62, n. 2, p.77-86, 1977.

SAN-BLAS G. The cell wall of fungal human pathogens: its possible role in host-parasite relationship. *Mycopathology*, v. 79, n. 3, p.159-84, 1982.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA G. *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. *Mycopathology*, v. 165, n.4-5, p.183-95 2008.

SCHUBACH A.; CUZZI-MAYA T.; OLIVEIRA A.V. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary Leishmaniasis patients. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, p. 987-96, 2001.

SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *Journal of Vector Borne Diseases*, v. 45, p. 255-272, 2008.

SHIKANAI-YASUDA, M.A.; TELLES FILHO, F. Q.; MENDES, R.P. et al. Consenso em Paracoccidioidomicose. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, n. 3, p. 297-310, 2006.

SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. *Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológica*, v.1, n.1, p. 20-31, 2007.

SILVA D.A.; MADEIRA, M.F.; TEIXEIRA, A.C. et al. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the Leishmaniasis control program. *Veterinary Parasitology*, v. 179, p. 257-61, 2011.

SILVA-VERGARA M.L.; MARTINEZ R.; CHADU A. et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil. *Medical Mycology*, v.36, p.37-42, 1998.

SILVEIRA, L. H.; DOMINGOS, I.H.; KOUCHI,K. et al. Serological detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in dogs with Leishmaniasis. *Mycopathologia*, v. 162, n. 5, p. 325-329, 2006.

SILVEIRA, L.H.; PAES, R.C.S.; MEDEIROS, E.V. et al. Occurrence of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in dairy cattle from Mato Grosso do Sul, Brazil. *Micopathologia*, v.165, p.367-371, 2008.

SUZUKI E.; TOLEDO M.S.; TAKAHASHI H.K.; STRAUS A.H. A monoclonal antibody directed to terminal residue of b- galactofuronase of a glycolipid antigen isolated from *Paracoccidioides brasiliensis*: cross-reactivity with *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi*. *Glycobiology*, v. 7, p. 463-468, 1997.

SZARGIKI R.; CASTRO E. A.; Luz E. et al. Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous Leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Disease*, v.13, p. 47–52, 2009.

TABORDA, C.P.; CAMARGO, Z.P. Diagnosis of Paracoccidioidomycosis by dot immunobinding assay for antibody detection using the purified and specific antigen gp43. *Journal of Clinical Microbiology*, v.32, p. 554-6, 1994.

TILLEY, L.P.; SMITH JUNIOR, F. W. K. *Consulta Veterinária em 5 minutos*. 2 ed. São Paulo: Manole, 2003. 892 p.

UNTEREINER W.A.; JAMES A. S.; NAVEAU, F. A. et al. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. *Mycologia*, v. 96, n.4, p. 812-821, 2004.

VALE E.C.S.; FURTADO T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 80, p. 421-8, 2005.

VEXENAT, A. C.; SANTANA, J.M.; TEIXEIRA, A. R.L. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 38, n.3, p. 177-185, 1996.

WANKE, B.; LONDERO, A. T. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, editors. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton: *CRC Press*, p. 109-120, 1994.

YURDAKUL P. Immunopathogenesis of *Leishmania* infections. *Mikrobiyoloji Bülteni*, v.39, n.3, p.363-81, jul.2005.