

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Perfil de reconhecimento antigênico de *Leishmania (Viannia) braziliensis* por amostras de soros de pacientes com leishmaniose tegumentar americana**

Lívia de Resende Andrade

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG  
Julho – 2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Perfil de reconhecimento antigênico de *Leishmania (Viannia) braziliensis* por amostras de soros de pacientes com leishmaniose tegumentar americana**

Livia de Resende Andrade

Maria Aparecida de Souza

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG  
Julho – 2004

## RESUMO

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por parasitos do gênero *Leishmania* cujo diagnóstico laboratorial é complexo e, envolve tanto a metodologia utilizada quanto a preparação antigênica. No presente trabalho foram avaliadas diferentes preparações antigênicas de uma cepa *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolada da região do Triângulo Mineiro-MG, utilizando soros de pacientes com leishmaniose, por ELISA e Western blot. Observou-se baixa especificidade e, sensibilidade de 91% e 81% no teste ELISA, dependendo do tipo de preparação antigênica utilizada. O Imunoblot mostrou sensibilidade e especificidade de 100% para o peptídeo de 55 kDa presente no antígeno total de *L. braziliensis*, nas amostras de pacientes com leishmaniose tegumentar americana. Esses resultados demonstraram a importância da utilização de cepas autóctones causadoras desta enfermidade para se utilizar no diagnóstico das leishmanioses.

**Palavras Chaves:** leishmanioses, antígeno, diagnóstico, ELISA, Western blot

## SUMMARY

### **Profile of antigenic recognition of *Leishmania (Viannia) braziliensis* for patients serum samples with American tegumentary leishmaniasis**

Leishmaniasis are a set of illnesses caused by parasites of the genera *Leishmania* which the laboratorial diagnosis is complex and involves the use of an adequate methodology and the antigenic preparation. In the present work it was evaluated different antigenic preparations of a strain of *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from the region of Triângulo Mineiro-MG, using serum samples of patients with leishmaniasis, by ELISA and Western blot. It was observed low titres of specificity and sensitivity of 91% and 81% in test ELISA, depending on the type of used antigenic preparation. The Western blot showed sensitivity and specificity of 100% for the peptide of 55 kDa present in the total antigen of *L. braziliensis*, in the samples of patients with American cutaneous leishmaniasis. These results demonstrated the importance of the use of specific strains causers of this disease in the diagnosis of leishmaniasis.

**Key Words: leishmaniasis, antigen, diagnostic, ELISA, Western blot**

## INTRODUÇÃO

O gênero *Leishmania* é constituído de um grupo de organismos unicelulares que são os agentes etiológicos de várias doenças designadas coletivamente como leishmanioses (MUKHEJEE, 2002). São parasitos intracelulares obrigatórios que causam um complexo quadro de leishmanioses em homens e outros animais, variando desde lesões tegumentares até uma infecção visceral grave (WRIGHT; EL AMIN, 1989). Cada doença tende a estar associada a uma espécie de *Leishmania* (MAALEJ et al., 2003).

A infecção se dá através da picada de flebotomíneos, sendo que o homem e animais silvestres e domesticados podem funcionar como reservatórios do parasito. (WHO, 2004).

Os agentes causais das leishmanioses humanas são protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*. Este gênero apresenta apenas duas formas durante seu ciclo vital: as formas amastigota, quando os parasitos estão no interior das células dos hospedeiros vertebrados e promastigota, quando se desenvolvem no tubo digestivo dos hospedeiros invertebrados (MARZOCHI et al., 1999; REY 1992).

Os membros do complexo *Leishmania (Viannia) braziliensis* são encontrados apenas nas Américas (Região Neotropical), parasitam a pele, mas não apresentam tendência a invadir as vísceras. As lesões no homem podem ser simples ou múltiplas, com caráter expansivo e tendência a produzir metástases, isto é, disseminação e colonização dos parasitos, em áreas distantes do ponto em que foram inoculados, com produção de novas lesões. Os parasitos não costumam ser abundantes nas ulcerações, havendo assim uma certa dificuldade no isolamento. Pertencem a este

complexo: *Leishmania braziliensis*, *Leishmania panamensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania peruviana* (FARZA et al., 1991).

A leishmaniose cutânea é definida pela presença de lesões exclusivamente na pele, que se iniciam no ponto de inoculação das promastigotas infectantes, pela picada do vetor, para qualquer das espécies de *Leishmania* causadoras da doença. A lesão primária é geralmente única, embora eventualmente múltiplas picadas do flebotomíneo ou a disseminação local possam gerar um número elevado de lesões (MARZOCHI, 1992).

Durante seu ciclo de vida, *Leishmania* sobrevive e prolifera em ambientes altamente hostis por meio de mecanismos especiais que permitem enfrentar estas condições adversas, incluindo uma densa superfície celular com glicocálice composto de lipofosfoglicanas (LPG), fosfolipídios glicosil inositol (GIPLs) e glicoconjugados secretados, proteofosfoglicanas (PPG) e fosfatase ácida secretada (PPG) (NIYOGI-GUHA et al., 2001).

As lectinas têm sido usadas na purificação por afinidade de diferentes glicoconjugados de *Leishmania* (GOROCICA et al., 1997). Estas são proteínas que reconhecem especificamente resíduos de carboidratos, podendo fazer a distinção entre amostras patogênicas e não patogênicas do parasita e inclusive distinguir diferentes estados morfológicos do mesmo (ANDRADE; SARAIVA, 1999)

A sorologia tem uma aplicação limitada no diagnóstico da leishmaniose cutânea e não é usada rotineiramente nos diagnósticos clínicos (VEGA-LÓPEZ, 2003). No entanto, várias técnicas têm sido desenvolvidas para o diagnóstico sorológico das leishmanioses, incluindo ensaios de imunofluorescência (IFA – Immunofluorescence assay), ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) e o Western Blot. Sendo que esta última técnica apresenta melhores índices de sensibilidade

e especificidade e fornece maiores informações sobre o perfil antigênico parasitário. Extratos brutos de culturas das formas promastigotas das espécies de *Leishmania* são usualmente utilizados como antígenos nos testes imunossorológicos. (GONÇALVES et al., 2002).

Altos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* são encontrados durante a fase aguda da doença e são detectados por vários testes sorológicos. Especificidade e sensibilidade adequadas podem ser observadas através de testes ELISA, usando tanto antígenos brutos como purificados (MAALEJ et al., 2003).

Neste trabalho foram purificados e caracterizados antígenos glicosilados de espécie de *Leishmania* isolada de paciente proveniente da região de Uberlândia – MG, usando-se estes nos testes sorológicos de ELISA e Western blot, avaliando sensibilidade, especificidade e reatividade cruzada frente a outros anticorpos.

## MATERIAL E MÉTODOS

1. **Amostras de soros** - As amostras de soro foram obtidas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia/MG. Foram utilizadas 58 amostras de soros de pacientes com Leishmaniose tegumentar, 28 com Leishmaniose visceral, 49 com doença de Chagas, 32 com Malária, 13 com Tuberculose e 49 de pacientes saudáveis selecionados ao acaso, porém de região endêmica para Leishmaniose tegumentar. As amostras foram identificadas através de testes parasitológicos. Todas as amostras foram aliqüotadas e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A utilização das amostras de soro humano foi aprovada pelo comitê de ética da Universidade Federal de Uberlândia – MG.

2. **Cultura de *Leishmania*** - Formas promastigotas de *Leishmania* isoladas de paciente da região de Uberlândia – MG (Triângulo Mineiro), caracterizada como *Leishmania (Viannia) braziliensis*, foram cultivadas em meio BHI suplementado com 5% de soro fetal bovino, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e gentamicina, 1 mM de L-glutamina e 3% de urina humana a  $26^{\circ}\text{C}$ . Ao atingirem a fase estacionária, os parasitos foram coletados e processados para a obtenção do antígeno total de *Leishmania*.

3. **Preparação do antígeno total de *Leishmania*** - Para a obtenção do antígeno total de *Leishmania* foi utilizado o método previamente descrito por Scott et al. (1987). As formas promastigotas de *Leishmania* na fase estacionária, obtidas em cultura foram resuspendidas em tampão apropriado, acrescentando-se inibidores de protease (1,6 mM de Fluoreto Fenil-metil-sulfonil – PMSF e 1mM de Benzamidina). Incubou-se por 10 minutos a suspensão em banho de



gelo. Os parasitas foram lisados por seis ciclos sucessivos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 37°C em banho-maria, seguido de dois ciclos em ultra-som. O antígeno obtido foi aliquoteado em eppendorfs que foram centrifugados por 1 hora a 14.000 rpm e 4° C. O sobrenadante foi coletado e congelado a -20° C. A dosagem protéica foi realizada pelo método de Lowry et al (1951).

**4. Cromatografia de afinidade** - O antígeno total de *Leishmania* foi purificado em cromatografia de afinidade em coluna de Concanavalina-A (Con A) imobilizada em Sepharose. Foi aplicado 4 mL de do antígeno total de *Leishmania* na coluna, e incubados por 30 minutos a 4°C. Em seguida, as proteínas não ligantes de Con A foram eluídas com tampão Con A (10mM Tris-HCl pH 7,4, 0,5M NaCl, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>) + 0,1% de octyl. O primeiro eluato foi dializado e concentrado em sistema Amicon com membrana de poro 10 kDa. Todas estas frações obtidas foram monitoradas em espectrofotômetro a 280 nm. Após zerar a absorbância, as proteínas ligantes de Con A foram eluídas com tampão Con A 0,1% octyl + 0,2M de Methyl  $\alpha$ -D-manopiranosídeo, monitorando-se também por espectrofotômetro a 280 nm. As frações ligantes de Con A foram concentradas e dializadas em Amicon com membrana 10 kDa. As proteínas ligantes e não ligantes de Con A foram dosadas pelo método de Lowry et al (1951), adicionados a elas inibidores de protease (Benzamidina e PMSF), aliquoteadas e armazenadas a -20°C.

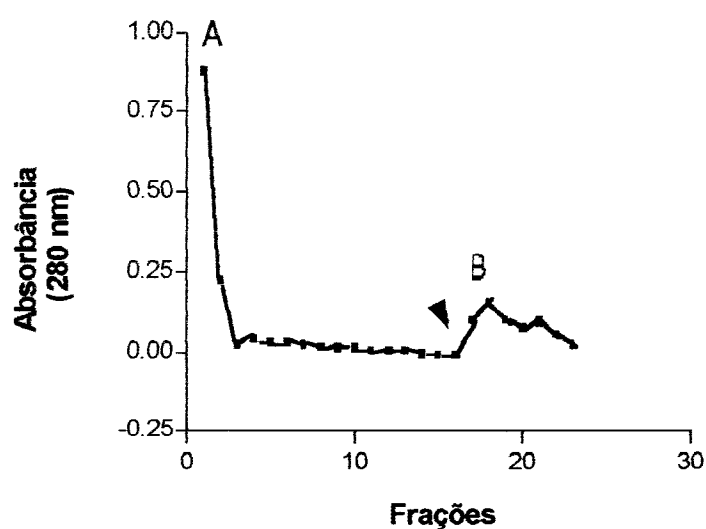
**5. Análise eletroforética** - Os antígenos de *Leishmania* obtidos foram analisados quanto ao perfil protéico por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, contendo dodecil sulfato de sódio a 0,1%, conforme descrito por Laemmli (1970). A coloração utilizada foi o nitrato de prata.

6. **ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)** - Neste teste foram usados três tipos de antígeno, o antígeno total (não purificado), a fração não ligante de Con A e a fração ligante de Con A, obtidas por cromatografia. Placas para ELISA de poliestireno, 96 poços, foram sensibilizadas com 50µL/poço de antígeno numa concentração de 20µg/mL em Tampão Carbonato pH 9,6 e, incubadas por 12 horas a 4°C. Em seguida as placas foram lavadas com PBS-T 0,05% por 3 ciclos em lavadora automática e adicionados 50µL/poço das amostras de soro diluídas 1/50 em PBS-T 0,05% + 10% de soro de cabra normal e incubadas por 45 minutos a 37°C. As placas foram lavadas novamente com PBS-T 0,05% por 6 ciclos. E adicionados 50µL/poço de conjugado enzimático ( $\alpha$ -IgG humana produzido em cabra ligado a peroxidase), diluído 1:2000 em PBS-T 0,05% + 10% de soro de cabra normal e incubado por 45 minutos a 37°C. Após seis ciclos de lavagem com PBS-T 0,05%, foram adicionados 50µL/poço de substrato (5mg de OPD – Orto-fenilenodiamina + 12,5 mL de Tampão OPD – Tampão fostato-ácido cítrico pH 5,0 + 5µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e incubado por 15 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com 25µL/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N e a leitura da absorbância realizada em leitora de microplaca a 492nm.

7. **Western blot** - Após a separação eletroforética, os componentes protéicos foram transferidos para membrana de nitrocelulose, utilizando sistema de transferência semi-úmido de acordo com Towbin et al. (1979). O antígeno utilizado foi o antígeno bruto. Foi preparado um “sandwich” com três folhas de papel de filtro, membrana de nitrocelulose, gel de poliacrilamida contendo as frações antigênicas e mais três folhas de papel de filtro, todos umedecidos em tampão de constituição; foram colocados em uma cuba de transferência para aplicação de uma corrente. As membranas de nitrocelulose foram cortadas em tiras e bloqueadas por 1 hora à temperatura ambiente

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Cromatografia** - O antígeno total e suas respectivas frações ligantes e não ligantes obtidos de isolado *L. braziliensis* por cromatografia de afinidade de Con A está representado na Figura 1. O rendimento protéico foi de 655  $\mu\text{g/mL}$  para a fração não ligante e 690  $\mu\text{g/mL}$  para a fração ligante de Con A. Observou-se um único pico após a eluição com açúcar específico (Fig. 1, pico B)

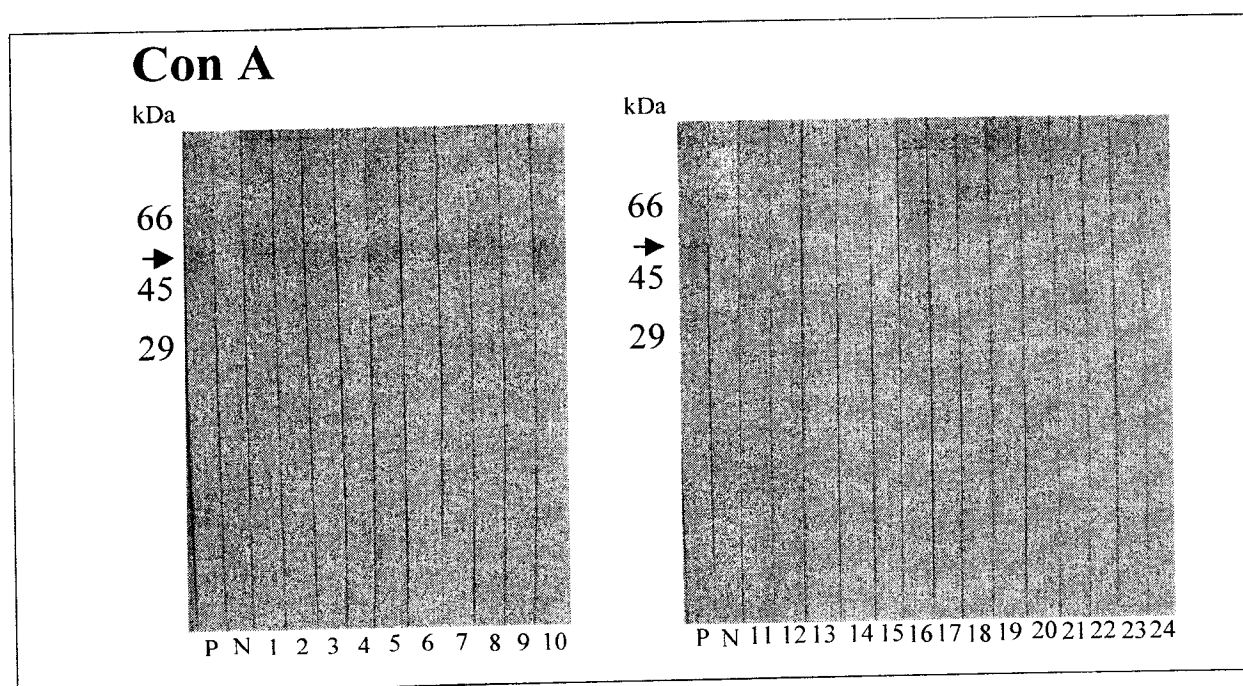


**Figura 1-** Análise cromatográfica do antígeno *L. braziliensis* em coluna de afinidade de Con A. As frações não ligantes estão representadas pela letra A e as frações ligantes representadas pela letra B. A seta indica a adição de 0,2M de Metil  $\alpha$ -D-Manopiranosídeo em tampão Con A na coluna.

Este trabalho confirma o que já tinha sido afirmado por Jaffe; McMahon-Pratt (1988), que vários tipos de *Leishmania* são fortemente aglutinados por Con A, que provém de grupos lectínicos ligantes de D-manose/D-glucose. Sendo assim, configura um excelente material para ser usado na

cromatografia de afinidade para fracionamento de antígenos de *Leishmania*.

**Análise por Western blot** - Através da análise sorológica por Western blot foi identificado o reconhecimento de uma banda em torno de 55 kDa do antígeno total de *L. braziliensis* por todos os soros de pacientes com LTA (Fig. 2, pistas 1-10). Por outro lado, não houve reconhecimento desta banda com soros de pacientes com DC, LV, TB M e voluntários saudáveis N. Foi observada também reatividade inespecífica a outras bandas em soros de pacientes com outras enfermidades e voluntários saudáveis (Fig. 2, pistas 11-24).



**Figura 2** - Reatividade por Western blot utilizando antígeno de *L. braziliensis* preparado em tampão Con A contra soros de pacientes com LTA (pistas 1-10), com TB (pista 11), com M (pistas 12-13), com DC (pistas 14-17), com LV (pistas 18-21) e voluntários saudáveis (pistas 22-24). P – controle positivo e N – controle negativo. Padrão de peso molecular à esquerda. Seta indica banda de 55 kDa. Essas amostras são representativas do total analisado.

O teste sorológico Western blot pode fornecer informações detalhadas sobre a estrutura antigênica do parasita, o que é muito importante na padronização dos procedimentos mais sensíveis

e específicos. As frações protéicas reconhecidas pelas amostras de soro variam com as diferentes amostras de parasitas e os diferentes indivíduos reconhecem diferentes frações protéicas do mesmo parasita. Isso pode ser explicado em parte pela complexidade da constituição antigênica de cada parasita e pelo perfil genético de cada indivíduo, que juntos influenciam a resposta imune (GONÇALVES et al., 2002). Neste estudo, foi reconhecida uma banda de 55 kDa para todos os indivíduos portadores de LTA, já no trabalho de Gonçalves e seus colegas (2002), foram reconhecidas bandas de 42, 58, 63, 30, 38 e 72 kDa. Nesse trabalho também foi observada reatividade cruzada com soros de pacientes portadores de doença de Chagas com uma taxa de 30,43% com as bandas de 63 e 58 kDa, o que não foi observado neste trabalho. Por outro lado, nos estudos de Aisa et al. (1998) foi constatado que o Western blot é capaz de diferenciar fases primárias da doença em cães que são diagnosticados como negativos ou tiveram baixos títulos de anticorpos detectados em outras técnicas como o ELISA.

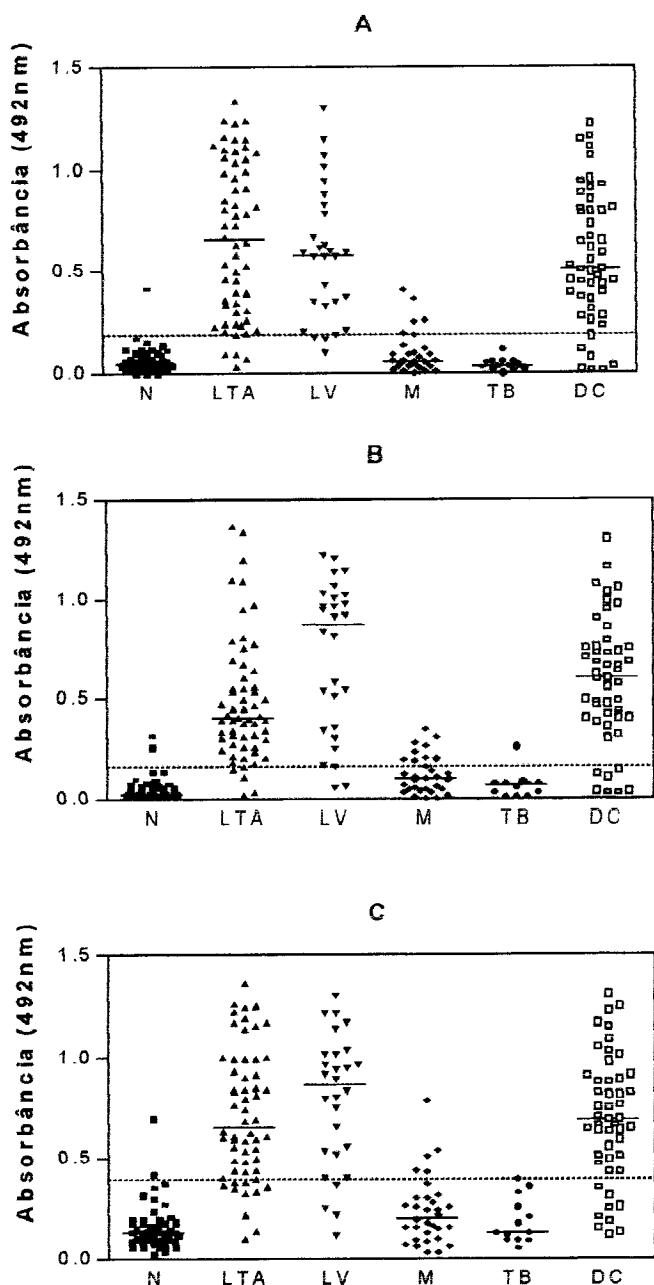
Uma das dificuldades no imunodiagnóstico de infecções por *Leishmania* é a reatividade cruzada com antígenos da mesma família ou com antígenos de organismos distantes filogeneticamente como *Mycobacterium*. Neste sentido, é um aspecto relevante em regiões que a leishmaniose coexiste com estas infecções. Quando não for possível a distinção entre, leishmaniose tegumentar, leishmaniose visceral e doença de Chagas pelo Western blot, pode-se identificar alguns antígenos reconhecidos somente por soros de pacientes com doença de Chagas ou leishmaniose visceral como diagnóstico diferencial em conjunto com outros elementos (BRITO et al., 2000).

**Análise por ELISA** - Em relação aos pacientes com leishmaniose tegumentar americana, foi observada maior reatividade da fração ligante de Con A em relação à fração não ligante de Con A

(Fig. 3 B e C,  $p < 0,001$ ). Quanto aos soros de pacientes saudáveis, observou-se maior reatividade do preparado antigênico da fração ligante Con A, em relação ao antígeno total e à fração não ligante de Con A (Fig. 3 A, B e C,  $p < 0,001$ ).

Quanto aos soros de pacientes com doença de Chagas e leishmaniose visceral, não foi observada nenhuma diferença significativa de reatividade ( $p > 0,05$ ) entre os preparados antigênicos obtidos a partir das frações ligantes e não ligantes de Con A e do antígeno total, havendo alta reatividade dos soros frente aos antígenos.

Houve maior reatividade dos soros de pacientes com tuberculose e malária frente ao preparado antigênico da fração ligante de Con A ( $p < 0,01$ ), em relação ao preparado antigênico da fração não ligante de Con A e do antígeno total.



**Figura 3** – Análise dos antígenos de *L. braziliensis* pelo teste ELISA. (A) Antígeno total em tampão Con A, (B) Fração não ligante de Con A, (C) Fração ligante de Con A. Foram usadas 49 amostras de soro de pacientes saudáveis (N), 58 amostras leishmaniose tegumentar americana (LTA), 28 amostras leishmaniose visceral (LV), 32 amostras malária (M), 13 amostras tuberculose (TB) e 49 amostras doença de Chagas (DC). As linhas pontilhadas representam os valores de corte, e as linhas contínuas são as medianas de cada teste.

Tem-se notado uma certa dificuldade em definir uma única espécie de *Leishmania* com uma simples forma clínica da doença, já que várias espécies podem estar associadas com mais de uma forma clínica da doença. Além de que muitos antígenos apresentam ampla reatividade cruzada entre diferentes espécies de *Leishmania* (FERREIRA et al., 2003). Deste modo, deve-se ressaltar a importância da cromatografia de afinidade na elaboração de antígenos. Um estudo feito na Índia a partir de amostra de *L. donovani* isolada em Con A resultou em apenas um antígeno no eluato, sendo demonstrado, que este pode ser usado, em baixas concentrações na distinção de soros de pacientes com leishmaniose visceral de outros soros, não havendo reatividade cruzada com outras doenças prevalentes no país (BHATTACHARYA; BANERJEE; GHOSH, 1992).

É importante lembrar que vários fatores interferem na obtenção dos antígenos resultando em antígenos mais ou menos reativos, como a idade da cultura de promastigotas, o modo de obtenção dos antígenos e valores de pH (ANDRADE; SARAIVA, 1999). O fato de ter sido utilizado uma cepa de *L. braziliensis*, isolada da região nos preparados antigênicos colaborou para a obtenção de uma boa sensibilidade do teste, já que Passos et al (1999) demonstraram que *L. (V.) braziliensis* é a espécie predominante causadora de LTA em Minas Gerais.

**Avaliação dos parâmetros do teste ELISA** - Os parâmetros sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para a avaliação do teste ELISA estão apresentados na Tabela 1, na qual o antígeno ligante de Con A, apresentou menor sensibilidade (81%) comparado aos demais antígenos (91%,  $p < 0,05$ ). Por outro lado, todos os antígenos apresentaram baixa especificidade, devido provavelmente a origem das amostras de soros, refletindo assim em baixos



valores preditivos positivos e altos valores preditivos negativos para os antígenos total (A) e não ligante de Con A (B) (Tabela 1).

**Tabela 1 - Parâmetros de avaliação do teste ELISA para os antígenos de *L. braziliensis***

Parâmetros	Antígenos do isolado <i>L. braziliensis</i> *		
	A	B	C
Sensibilidade	91%	91%	81%
Especificidade	57%	53%	58%
Valor Preditivo Positivo	42%	40%	39%
Valor Preditivo Negativo	95%	95%	54%

\*A – Antígeno total preparado em tampão Con A, B – Fração não ligante de Con A, C – Fração ligante de Con A (enriquecida de manose).

Muitos antígenos têm sido propostos para utilização no diagnóstico das leishmanioses, porém nenhum deles descarta a reatividade cruzada com outras enfermidades, principalmente aquelas causadas por tripanossomatídeos. Neste contexto, Carmelo et al., (2002) demonstraram que antígeno recombinante de *L. braziliensis* foi reconhecido tanto por soros de pacientes com leishmaniose tegumentar quanto por pacientes com doença de Chagas, evidenciando a dificuldade de se obter antígenos para o diagnóstico específico das leishmanioses em áreas endêmicas.

Em suma, os dados obtidos pelo teste ELISA apresentaram baixa especificidade, em função de as amostras de soros analisadas terem sido obtidas de região endêmica. No entanto, com alta sensibilidade, devido à utilização de uma cepa de *Leishmania* causadora da doença nessa área. Além

disso, o Western blot demonstrou especificidade e sensibilidade de 100% para o antígeno de 55 kDa, demonstrando a presença de determinantes antigênicos específicos na cepa utilizada nos experimentos.

Entre os três preparados antigênicos utilizados, pode-se considerar que o antígeno bruto é um bom padrão para o diagnóstico sorológico de leishmaniose na região, sendo que o Western Blot pode ser usado como teste confirmatório, apresentando uma banda específica. A obtenção de antígenos adequados para o diagnóstico sorológico é de grande relevância, sendo especialmente importante a padronização destes através de kits adequados para o diagnóstico nas diferentes regiões endêmicas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AISA, M. J.; CASTILLEJO, S.; GALLEGO, M.; FISA, R.; RIERA, C.; COLMENARES, M.; TORRAS, S.; ROURA, X.; SENTIS, J.; PORTUS, M. Diagnostic potential of western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic áreas and significance of the pattern. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. 58, n. 2, p. 154-159, 1998.
- ANDRADE, A.F.B; SARAIVA, E.M.B. Lectin-binding properties of different *Leishmania* species. **Parasitology Research**, v. 85, p. 576-581, 1999.
- BHATTACHARYA, M.; BANERJEE, N.; GHOSH, D. K. *Leishmania donovani*: isolation of a Concanavalin-A specific antigen and its evaluation for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 86, n. 4, p. 341-345, 1992.
- BRITO, M. E. F.; MENDONÇA, M. G.; GOMES, Y. A.; JARDIM, M. L.; ABATH, F. G. C. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7. n. 2, p. 318-321, 2000.
- CARMELO, E., MARTINEZ, E., GONZALES, A.C., PINERO, J.E., PATARROYO, M.E., DEL CASTILLO, A., VALLADARES, B. Antigenicity of *Leishmania braziliensis* hostone H1 during cutaneous leishmaniasis: localization onantigenic determinants. **Clinical and Diagnostic**

**Laboratory Immunology**, v. 9, n.4, p. 808-811, 2002.

FARZA, A. M.; ARIAS, J. R.; MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G. *Leishmania e leishmanioses: os parasitos*. In: REY, L. 2 ed. **Parasitologia**. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1991. p. 182-203.

FERREIRA, W. A.; MAYRINK, W.; MARES-GUIA, L.; TAVARES, C. A. P. Detection and characterization of leishmania antigens from an American cutaneous leishmaniasis vaccine for diagnosis of visceral leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 45, p. 35-43, 2003.

GONÇALVES, C. C. M; REICHE, E. M. V.; ABREU FILHO, B. A.; SILVEIRA, T. G. V.; FELIZARDO, T. C.; MAIA, K. R.; COSTACURTA, R.; PADOVESI, E. J.; DIAS FILHO, B. P.; JANKEVICIUS, S. I.; JANKEVICIUS, J. V. Evaluation of antigens from various *Leishmania* species in a western blot for diagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 1, p. 91-102, 2002.

GOROCICA, P.; MONROY, A.; RIVAS, B.; ESTRADA-PARRA, S.; LEROY, Y.; CHAVEZ, R.; ZENLENO, E. Purification of the lipophosphoglycan from two *Leishmania mexicana* strains by lectin affinity cromatography. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 27, p. 10-17, 1997.

JAFFE, C. L.; McMAHON-PRATT, D. The identification of membrane glycoconjugates in *Leishmania* species. **Journal Parasitology**, v. 74, n.4, p. 548-561, 1988.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. '227, p. 660-665, 1970.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 165-275, 1951.

MAALEJ, I. A.; CHENIK, M.; LOUZIR, H.; SALAH, A. B.; BAHLOUL, C.; AMRI, F.; KOUSSAY, D. Comparative evaluation of elisas based on ten recombinant or purified *Leishmania* antingens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.68, n. 03, p. 312-320, 2003.

MARZOCHI, M. C. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 63, p. 82-104, 1992.

MARZOCHI, M. C. A.; SCHUBACH, A. O.; MARZOCHI, K. B. F. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. São Paulo: Editora Atheneu, 1999. p. 39-64.

MUKHEJEE, M.; BHATTACHARYYA, A.; DUTTAGUPTA, S. Serodiagnostic and

imunoprophylatic potential of 78 kDa protein of *Leishmania donovani* of Indian origin. **Medical Science Monitor**, v. 8, n. 04, p. 117-122, 2002.

NIYOGI-GUHA, A.; SULLIVAN, D. R.; TURCO, S. J. Glycoconjugate structures of parasitic protozoa. **Glycobiology**. v.11, n. 4, p. 45R-59R, 2001.

PASSOS, V. M. A.; FERNANDES, O.; LACERDA, P. A. F.; VOLPINI, A. C.; GONTIJO, C. M. F.; DEGRAVE, W.; ROMANHA, A. J. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infectin patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. **Acta Tropica**. v. 72, p. 251-258, 1999.

REY, L. Leishmanioses cutâneas e mucocutâneas do Novo Mundo. In: **Bases da Parasitologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. p. 46-57.

SCOTT, P.; PEARCE, E.; NATOVITZ, P.; SHER, A. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model: induction of protective immunity with a soluble extract of promastigotes. **Journal Immunology**. v.139, p. 221-227, 1987.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 76, p. 4350-4354, 1979.

VEGA-LÓPEZ, F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.16, p. 97-101, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis: disease information**. Disponível na internet em: <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>. Arquivo consultado em 2004.

WHRIGHT, E. P; EL AMIN, E. R. M. *Leishmania* infection: surfaces and immunity. **Biochemistry Cell Biology**, v. 67, p. 525-536, mar. 1989.

# INFORMAÇÕES PARA AUTORES

A Bioscience Journal é uma revista científica ligada à Universidade Federal de Uberlândia, editada quadrimestralmente, em português ou inglês, destinada à divulgação de trabalhos ligados a área de Biociências que se enquadrem no regulamento dos mesmos. Os trabalhos aprovados para publicação tornar-se-ão propriedade da Revista e os não aprovados serão devolvidos aos autores. São de exclusiva responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, cabendo, ao Conselho Editorial, orientação para possíveis mudanças.

A Revista Bioscience Journal é indexada nos sistemas de base: AGRIS (Agrindex), AGROBASE, CAB ABSTRACTS, LILACS(BBO), PERIODICA.

---

## Normas para publicação

- A redação deve primar por clareza, brevidade e ser conciso;
- Os trabalhos devem ser apresentados em uma via no original e duas cópias (inclusive os anexos, fotos e gravuras);
- Os trabalhos devem ser apresentados digitados em uma só face em formato A4(21,0x29,7cm), fonte Times New Roman, tamanho 12, em espaço duplo e com margem de, no mínimo, 2 cm.
- O texto será escrito cordialmente, com intercalação de tabelas e figuras, em quantidade mínima necessária para a compreensão do texto.
- O material deverá ser encaminhado em disquete 3"1/2 de alta densidade no programa Microsoft Word for Windows®. Todo material ilustrativo deverá ser apresentado de tal forma que seja possível sua reprodução fotográfica sem retoques. Nas fotos coloridas, o autor deverá arcar com as despesas de fotolito.
- Todo material ilustrativo deverá ser marcado no verso com o título do trabalho e legenda que deverá ser publicada.
- No corpo do trabalho não deverá constar o nome dos autores, que deverá ser encaminhado em folha separada, com dados pessoais (títulos, endereço para correspondência, e-mail e Instituição a que está ligado), como medida de sigilo;
- O autor principal deverá enviar juntamente com o trabalho, um ofício assinado por todos os autores, solicitando a sua publicação exclusivamente nesta revista;
- O artigo será encaminhado a três (03) revisores da área, sem a identificação dos autores e, será considerado aprovado com pareceres favoráveis, em maioria.

A reprodução total ou parcial dos trabalhos da Revista é permitida desde que seja citada a fonte.

Os autores e co-autores receberão um exemplar da revista. Os autores que desejarem receber mais cópias devem comunicar com a Comissão editorial antes de assumir o custo



- Oliveira e Leonardo (1943, p. 146) dizem que “a relação da série São Roque com os granitos porfiróides pequenos é muito clara”.
- Citação indireta: Conforme Castro (1978), uma tese deve ser original e viável.
  - A capacidade do homem de produzir e ler símbolos deve ser o ponto de partida da estética (BARBOSA, 1984).
- Citação de citação: - (ETANS, 1987 apud SAGE, 1992, p.2-3).
  - Segundo Silva (apud ABREU, 1999, p.3) diz ser [...].

Toda citação feita no decorrer do texto deverá ser incluída na lista de Referências Bibliográficas no final do texto

### Referências Bibliográficas

As Referências Bibliográficas incluídas no final de cada artigo devem ser escritas em folhas separadas do texto principal, em ordem alfabética de acordo com as normas da ABNT (NBR-6023, ago. 2002). Apenas nas entradas das referências bibliográficas, mencionar todos os autores (excluir et al.).

Observar os exemplos das referências bibliográficas abaixo:

1. Livro no todo:

GRAZIANI, Mário. **Cirurgia buco-maxilo-facial**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1976. 676 p.

2. Capítulo de livro sem autoria própria:

PERRINS, C. M. Social systems. In: \_\_\_\_\_. **Avian ecology**. Glasgow: Blackie, 1983. cap. 2, p. 7-32.

3. Capítulo de livro com autoria própria:

GETTY, R. The Gross and microscopic occurrence and distribution of spontaneous atherosclerosis in the arteries of swine. In: ROBERT JUNIOR.; A., ATRAUSS, R. (Ed.). **Comparative atherosclerosis**. New York: Harper & Row, 1965. p. 11-20.

4. Monografias, Dissertações e Teses:

CORRALES, Edith Alba Lua Segovia. **Verificação dos efeitos genotóxicos dos agentes antineoplásicos citrato de tamoxifen e paclitaxel**. 1997. 84f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1997.

5. Trabalhos apresentados em eventos: Congressos, Seminários, Reuniões...

NOVIS, Jorge Augusto. Extensão das ações de saúde na área rural. In: CONFERÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE, 7. 1980, Brasília. **Anais...** Brasília: Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 1980. p. 37-43.

6. Artigos de periódicos

COHEN, B. I.; CONDOS, S.; DEUTSCH, A. S.; MUSIKANT, B. L. La fuerza de fractura de tres tipos de materiales para el muñon en combinacion com tres espigas endodontiacales distintas. **R. Cent. C. Biomed. Univ. Fed. Uberlândia**, Uberlândia, v.13, n. 1, p. 69-76, dez. 1997.

**Nota:**

Quando se tratar de documento eletrônico, deve-se fazer a referência normal, acrescentando-se ao final informações sobre a descrição do meio ou suporte.

Exemplo:

1. Capítulo de livro com autoria própria disponível em CD-ROM:

FAUSTO, A. I. da F.; CERVINI, R. (Org.). O trabalho e a rua. In: BIBLIOTECA nacional dos direitos da criança. Porto Alegre: Associação dos juizes do Rio Grande do Sul, 1995. ICD-ROM.

Artigo de periódicos em meio eletrônico:

ROCHA-BARREIRA, C. A. Caracterização da gônada e ciclo reprodutivo da *Collisella subrugosa* (Gastropoda: Acmaeidae) no Nordeste do Brasil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v.62, n. 4b, Nov. 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br>. Acesso em 20 abr. 2003.

---

A reprodução total ou parcial dos trabalhos da Revista é permitida desde que seja citada fonte.

Os autores e co-autores receberão um exemplar da revista.

Os autores que desejarem receber mais cópias devem comunicar com a Comissão editorial antes de assumir o custo para cópias adicionais.

Informações mais detalhadas sobre a apresentação de trabalhos para serem publicados poderão ser obtidas junto à Comissão Editorial.

---

Universidade Federal de Uberlândia  
Bioscience Journal  
Editor - André Luiz Quagliatto Santos, Prof. Dr.  
Av. Para, 1720  
38400-902 Uberlândia - MG  
Brasil – fone- (34) 3218-2546  
[www.biosciencejournal.ufu.br](http://www.biosciencejournal.ufu.br) e-mail – [biosciencej@ufu.br](mailto:biosciencej@ufu.br)

com salina tamponada com Tris contendo Tween 20 a 0,05% , adicionada de leite desnatado a 5%. Após o bloqueio foram adicionadas as amostras de soros humanos, na diluição de 1/100 em PBS-T 0,05% e incubadas por uma noite a 4°C sob agitação horizontal lenta. Em seguida, foi adicionado o conjugado imunoenzimático na diluição de 1/500 e incubou-se à temperatura ambiente por 2 horas, sob agitação horizontal lenta. A revelação da reatividade foi efetuada pela adição de solução de PBS contendo diaminobenzidina e peridrol. A reação foi interrompida após o aparecimento de bandas por lavagens sucessivas em água corrente. Em seguida, as tiras foram secas em papel de filtro e fotografadas.

**8. Cálculo dos parâmetros do teste ELISA** - Os parâmetros sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo do teste ELISA foram calculados como a seguir. Para estabelecer valores positivos e negativos de reatividade utilizou-se valores de corte (VC) obtidos para cada antígeno “VC = média das absorbâncias das amostras de soros de voluntários saudáveis mais duas vezes o desvio padrão”. A sensibilidade foi calculada como a seguir: número de amostras LTA positivas sobre o número de amostras LTA x 100. A especificidade foi calculada como: somatória das amostras LV, TB, M, N e DC negativas sobre a somatória anterior mais a somatória de amostras LV, TB, M, N e DC positivas x 100. O valor preditivo positivo foi calculado como número de amostras LTA positivas sobre a somatória de amostras LTA, DC, N, M, LV e TB positivas x 100. O valor preditivo negativo foi calculado como: a somatória de amostras DC, N, M, LV e TB negativas, sobre a somatória de amostras LTA, DC, N, M, LV e TB negativas x 100.

**9. Análise estatística** - A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Graph Pad Prism, versão 4 para Windows. Para a comparação entre as medianas de reatividade dos soros contra os diferentes antígenos utilizou-se o teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Para comparar os

valores dos parâmetros de sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo foi empregado o teste de comparação entre proporções (diferença entre dois percentuais). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.