

esplenomegalia, assim como também não foram observadas alterações no peso e temperatura dos dois animais. Além disso amostras de soro coletadas antes e depois das inoculações da *L. (L.) amazonensis* não propiciaram a detecção de anticorpo IgG específico através do teste de imunofluorescência indireta. Depois desse período de avaliação *in vivo*, o exame histopatológico do fígado, baço e linfonodo dos quatro animais não revelou nenhuma alteração sugestiva de processo infeccioso nesses tecidos, assim como, não foi possível isolar o parasito e nem demonstrar a presença de resíduos de DNA pela técnica PCR. **Conclusões:** Não foi demonstrada a capacidade de visceralização da *L. (L.) amazonensis* no primata não humano *Cebus apella*, após a inoculação experimental do parasito pela via intraperitoneal.

440P

DIFERENTES PERFIS PROTEICOS EM SORO DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR ATRAVÉS DE IMMUNOBLOTTING COM DUAS CEPAS DE *LEISHMANIA (LEISHMANIA) AMAZONENSIS*.

¹Ramos, Patrícia K. S., ²Sarges, Jacyara dos A., ³ Silva, Edilene O. ⁴Silveira, Fernando T. Universidade Federal do Pará -Laboratório de Parasitologia I Instituto Evandro Chagas - Programa de Leishmanioses. Proint-UFPA, Capes, Sectam-Pa.

Introdução: A técnica de "immunoblotting" vem sendo utilizada como uma importante ferramenta para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar. Contudo, a escolha de antígenos para uso durante testes sorológicos tem recebido especial atenção dos estudiosos. **Objetivos:** Este estudo preliminar tem por objetivo avaliar dois antígenos de *L. (L.) amazonensis*, que diferem quanto ao tempo de isolamento e armazenamento no laboratório, e comparar os perfis protéicos dos soros de pacientes quando se utilizou a técnica de immunoblotting. **Material e Métodos:** Foram utilizados 16 soros de pacientes com leishmaniose (8/16 com infecção confirmada por *L. (L.) amazonensis*, 2/16 infectados com *Leishmania (Viannia) shawi*, 1/16 com subespécie de *Leishmania* e 5/16 com exame parasitológico positivo, porém sem definição de espécie, 1 soro controle positivo e 1 controle negativo). Promastigotas de cultura de cepas de *L. (L.) amazonensis* (IFLA/1967/BR/PH8 – isolada de flebotomíneo e MHOM/2002/BR/M21177 – isolada de paciente) foram cultivadas em meio NNN e posteriormente inoculadas em meio RPMI suplementado com soro bovino fetal a 10% e GPPS a 1%. Ao final da fase logarítmica em meio RPMI, os parasitas foram centrifugados e lavados com solução salina estéril para posterior preparo dos antígenos. À concentração final dos antígenos utilizada foi de 10⁹/mL. Inibidores de protease foram adicionados a massa de promastigotas, e a seguir foram rompidos por 10 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 56°C. Frações protéicas dos extratos antigênicos de *L. (L.) amazonensis* foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) (Laemmli, 1970). Quantidades padronizadas do extrato diluído em tampão de amostra foram fervidas por 3 minutos e aplicadas no gel de poliacrilamida, em sistema vertical - 50V/25mA/4 horas. Utilizou-se o padrão de peso molecular RNP – 800 (Amersham). Depois da corrida eletroforética as proteínas do gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose em sistema úmido por imunodifusão durante 72 horas. As membranas contendo frações antigênicas foram cortadas em fitas de 4mm e bloqueadas com leite 3% em TBS-T. por 18h a 4°C, sob agitação. Foram realizadas 3 lavagens com TBS-T (15', 15' e 5'/TA, sob agitação) e a seguir a reação com plasmas de pacientes, diluídos em BSA 3% TBS-T (4h/TA, sob agitação). Após lavagem, adicionou-se o conjugado peroxidase de anti-IgG humana (2h/TA). Realizou-se novo ciclo de lavagens e posterior adição da solução cromogênica (3,3'-Diaminobenzidina) foram aguardados 15 a 30' para o interrompimento da reação. (Graham & Karnovsky, 1966). **Resultados:** Observou-se maior quantidade de frações protéicas quando os soros de pacientes foram testados com antígeno recentemente isolado. Pacientes com infecção confirmada por *L. (L.) amazonensis* apresentaram as seguintes frações protéicas: 35, 88, 96 e 105 kDa, 92 kDa (pacientes infectados com *L. (V.) shawi* e sem confirmação diagnóstica, 60 e 88 kDa paciente infectado com uma subespécie de *Leishmania*. O comportamento do antígeno de PH8 foi diferente, pois 50% dos soros dos pacientes infectados com *(L.) amazonensis* e aquele infectado com uma sub-espécie não revelaram através da técnica de immunoblotting nenhuma fração protéica, contudo, soros de pacientes infectados *L. (V.) shawi* e sem confirmação diagnóstica demonstraram a fração protéica de 135kDa. É ainda de caráter investigativo a diferença que possa ocorrer entre as cepas devido ao tipo de material isolado. No entanto a observação do tempo é consistente, pois hamsters utilizados durante o estudo apresentaram tempos de doença distintos quando infectados com as referidas cepas (20 dias para a cepa isolada de paciente e 35 dias para a isolada de flebotomíneo) **Conclusões:** A análise deste estudo preliminar sugere que os testes sorológicos devem ser realizados com antígenos recém isolados para a confiabilidade do diagnóstico com intuito de se estabelecer um perfil protéico que caracterize os indivíduos infectados com determinada espécie de *Leishmania*. Contudo, novos ensaios ainda serão necessários para solidificar nossos resultados.