

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE JABOTICABAL  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIA**

**EXPRESSÃO EM *Escherichia coli* DE UMA PROTEÍNA  
RECOMBINANTE DO GENE A2 DE *Leishmania chagasi* E UTILIZAÇÃO  
DESTA PROTEÍNA NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL  
CANINA**

**Márcia Mariza Gomes Jusi**

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Fevereiro de 2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE JABOTICABAL  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**EXPRESSÃO EM *Escherichia coli* DE UMA PROTEÍNA  
RECOMBINANTE DO GENE A2 DE *Leishmania chagasi* E  
UTILIZAÇÃO DESTA PROTEÍNA NO DIAGNÓSTICO DA  
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

**Márcia Mariza Gomes Jusi**

**Orientadora: Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Microbiologia Agropecuária – Área de Imunoparasitologia.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Fevereiro de 2011

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**MÁRCIA MARIZA GOMES JUSI** – solteira, nascida na cidade de São João da Boa Vista, em 30 de maio de 1984. É bióloga, formada pela Universidade Estadual Paulista – FCAV-UNESP, campus de Jaboticabal-SP, em 2008. Durante o curso de graduação foi bolsista de iniciação científica do CNPq de 2005 a 2006, na área de Controle Biológico, bolsista do Programa de Apoio ao Estudante – Pró-Reitoria de Extensão Universitária e Assuntos Comunitários (PAE-PROEX) – Bolsa de Apoio Acadêmico I, durante o período de 2006 a 2007, na área de Imunologia. Novamente bolsista de iniciação científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP de 2007 a 2008, na área de Imunoparasitologia e bolsista de Apoio Técnico à Pesquisa do CNPq, durante o período de 2008 a 2009. Em março de 2009, iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agropecuária, área de imunoparasitologia, na mesma faculdade (FCAV-UNESP), sob orientação da Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado.

**“ Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim” (Chico Xavier).**

**Dedico**

**A Deus,**

**E, aos meus pais, Fernando Jusi e Mariza Gomes Jusi, pelo apoio, amor imensurável, exemplo de honestidade e caráter. Vocês foram e serão sempre a minha base. Fica registrado aqui, para vocês, meu amor maior do mundo, meu imenso respeito e admiração para todo o sempre.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me permitir realizar mais esse sonho.

Aos meus pais, por toda dedicação e apoio.

Aos meus irmãos, Fernando, André e Marco e minhas cunhadas Raquel e Renata.

A todos os meus queridos sobrinhos que tanto amo.

A todos os meus familiares que de alguma forma me incentivaram.

A professora Rosangela, pela credibilidade, por todo aprendizado, paciência e solidariedade tanto profissional quanto pessoalmente. E, por me mostrar as infinitas possibilidades que a ciência nos proporciona.

A professora Ana Paula Úlian de Araújo pela gentileza, disponibilidade e ajuda imprescindível para a realização deste trabalho.

A professora Rosemeire de O. Vasconcelos pela gentileza, profissionalismo e participação valiosa nessa banca de mestrado.

A professora Isabel Kinney Ferreira de Miranda Santos pelas prezadas contribuições na finalização deste trabalho.

A Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira e Andrea Higa Nakaghi que tiveram paciência e iniciaram minhas práticas em biologia molecular.

Ao Marcos Rogério André (Marquinhos) por toda ajuda desde meu primeiro dia no laboratório, pelo profissional excelente que você é e que eu tenho o privilégio de desfrutar e, claro, pela amizade que tanto prezo.

A Carla Roberta Freschi pela amizade que eu tanto considero, por toda ajuda, inclusive na banca de qualificação, por ter com quem trocar conhecimentos e também

dividir todas as alegrias, risadas e, inevitavelmente, compartilhar as angústias que acontecem no ambiente de trabalho.

A Meire Seki Carrasco pelas ajudas, incentivo e amizade. Uma pessoa maravilhosa que tive o privilégio de conhecer e conviver.

Ao grupo do laboratório que ainda tenho, ou já tive, o prazer de compartilhar diariamente a companhia e que tantas vezes também me auxiliaram: Marquinhos, Carla, Meire, Rafaela (CBPV), Márcia Teixeira, Ana Carolina Trompieri (Xucruets), Mayra, Luís, Bia, Tamires, Vanessa, Trícia, Andreinha Higa, Adriano Carrasco, Carinão, e Arvelino.

As minhas amigas e amigos que tenho a mais profunda estima. Acredito que a grande maioria sabe a importância que tem na minha vida e como os considero minha família em Jaboticabal: Letícia, Fernanda, Margoto, Analuê (Valita), Cintia (Foguinho), Aline (Kokotinha), Suzana (Chôia), Fabrício (Bgay-cola), Thiago (Nogento) e Mateus.

A todas essas pessoas, além de meus agradecimentos também lhes desejo:  
“Que Deus nos abençoe e acompanhe sempre, que nossos desejos se tornem realidade, que sempre façamos para os outros e deixemos que os outros façam por nós. Que cada um construa uma escada para as estrelas e suba cada degrau, que crescamos para sermos justos e verdadeiros, que sempre saibamos a verdade e vejamos as luzes ao nosso redor, que sejamos sempre corajosos, fiquemos em pé e fortes, que nossas mãos estejam sempre ocupadas que nossos pés sejam sempre rápidos, que tenhamos uma base forte quando os ventos das mudanças voltarem. Que nossos corações sejam sempre felizes, que nossa canção seja sempre cantada, e que fiquemos eternamente jovens!” (Bob Dylan)

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	xii
SUMMARY.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. OBJETIVOS.....	10
3.1 Objetivo geral.....	10
3.2 Objetivos específicos.....	10
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
4.1 Amostras.....	11
4.1.1. Soros de cães controles (Grupo A).....	11
4.1.2. Animais naturalmente infectados (Grupo B).....	11
4.1.3. Cães vacinados (Grupo C).....	11
4.2. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI).....	12
4.2.1. Preparo do antígeno.....	12
4.2.2. Descrição da reação.....	12
4.3. Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA teste).....	13
4.3.1. Preparação do antígeno total solúvel de <i>Leishmania</i> <i>chagasi</i> .....	13
4.3.2. Descrição da reação.....	14
4.4. Obtenção do gene A2 isolado em <i>L. chagasi</i> .....	14
4.5. Produção do antígeno recombinante A2.....	15

4.5.1. Minipreparação de DNA plasmidial (Método da lise alcalina).....	15
4.5.2. Amplificação do DNA de A2 de <i>L. chagasi</i> através da reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	16
4.5.3. Purificação do fragmento gênico amplificado por PCR.....	17
4.5.4. Quantificação do fragmento purificado.....	17
4.5.5. Vetor de clonagem pGEM T-Easy.....	18
4.5.6. Reação de ligação com o vetor de clonagem pGEM T-Easy.....	19
4.5.7. Transformação das células competentes de <i>Escherichia coli</i> One Shot Match 1™ T1 <sup>R</sup> .....	19
4.5.8. Análise e seleção dos clones recombinantes.....	20
4.5.9. Digestão e purificação do pGEM-A2 e do vetor de expressão pET 28a.....	21
4.5.10. Subclonagem do gene A2 no vetor de expressão pET 28a.....	22
4.5.11. Transformação das diferentes células competentes de <i>Escherichia coli</i> : BL21 (DE3), ER 2566 e Rosetta.....	23
4.5.12. Análise e seleção dos clones recombinantes.....	24
4.5.13. Produção de His6_A2 em pequena escala.....	25
4.5.14 Produção de His6_A2 em grande escala.....	25
4.5.15. Purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade.....	26
4.6. Imunização dos camundongos.....	26
4.7. Análise da proteína His6_A2 em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	27
4.8 Reatividade da proteína His6-A2 pelo Western-blotting.....	28
4.9. Análise da imunogenicidade de His6-A2 por Dot-ELISA e Western-blotting.....	29
4.10. ELISA indireto com o antígeno recombinante A2.....	30



4.10.1. Preparo do antígeno recombinante.....	30
4.10.2. Dose de reatividade ótima de antígeno, soro e conjugado.....	30
4.10.3. Tratamento dos dados.....	31
5. RESULTADOS.....	32
5.1. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	32
5.1.1. RIFI dos animais soropositivos, soronegativos para <i>Leishmania</i> sp e dos soros dos animais vacinados.....	32
5.2. ELISA indireto com antígeno solúvel total .....	32
5.2.1. ELISA dos animais com diagnóstico sorológico positivo para <i>Leishmania</i> sp.....	32
5.2.2. ELISA dos animais vacinados.....	33
5.2.3. ELISA dos animais soronegativos.....	33
5.3. Produção do antígeno recombinante A2.....	33
5.3.1. Amplificação do gene A2 de <i>L. chagasi</i> pela PCR.....	33
5.3.2. Reação de ligação com o vetor de clonagem pGEM-T Easy.....	34
5.3.3. Sequenciamento e análise dos clones recombinantes.....	34
5.3.4. Reação de ligação com o vetor de clonagem e expressão pET-28a.....	35
5.3.5. Análise da produção de His6_A2 em <i>E. coli</i> .....	37
5.3.6. Análise da proteína recombinante His6_A2 por Western-blotting.....	39
5.4. Imunização de camundongos com His6_A2.....	40
5.5. Teste de ELISA indireto com antígeno recombinante His6_A2....	43
6. DISCUSSÃO.....	45
7. CONCLUSÕES.....	48
8. REFERÊNCIAS.....	49

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Mapa físico do vetor de clonagem em *E. coli* pGEM-T Easy (Promega).....17
- Figura 2. Mapa do vetor de expressão pET-28a (Novagen).....22
- Figura 3. Fragmentos obtidos pela PCR, utilizando-se o par de oligonucleotídeos A2b e A2c. Linha 1: padrão 100pb (Invitrogen®). Linhas de 2 a 5: Reação dos primers A2b e A2c com o clone recombinante no vetor pGEM-T Easy (a região marcada corresponde à região extraída do gel para clonagem). Linha 6: Controle negativo.....33
- Figura 4. Fragmentos obtidos pela clivagem do vetor pGEM após reação de ligação com o fragmento A2 obtido da PCR com os primers A2b e A2c, utilizando-se as endonucleases *EcoRI* e *NdeI*. Linha 1: padrão 100pb (Invitrogen®). Linhas 2 e 3: Controles negativos. Linhas de 4 a 6: DNA plasmidial extraído de diferentes colônias de bactérias para clivagem utilizando as enzimas de restrição para simples conferência de que o fragmento encontrava-se no vetor.....34
- Figura 5. Fragmentos obtidos pela PCR, utilizando-se o par de oligonucleotídeos A2b e T7 promoter. Linha 1: padrão 100pb (Invitrogen®). Linha 2: Colônia 01 da One Shot Match (pET28a\_A2). Linha 3: Colônia 02 da One Shot Match (pET28a\_A2). Linha 4: Colônia 03 da One Shot Match (pET28a\_A2). Linha 5: Colônia 04 da One Shot Match (pET28a\_A2). Linha 6: Colônia 05 da One Shot Match (pET28a\_A2). Linha 7: Colônia 06 da One Shot Match (pET28a\_A2). Linha 8: Colônia 07 da One Shot Match (pET28a\_A2). Linha 9: Colônia 08 da One Shot Match (pET28a\_A2). Linha 10: Colônia 09 da One Shot Match (pET28a\_A2). Linha 11: Colônia 10 da One Shot Match (pET28a\_A2).....35
- Figura 6. Fragmentos obtidos pela PCR, utilizando-se o par de oligonucleotídeos A2b e T7 promoter. Linha 1: padrão 100pb (Invitrogen®). Linha 2: Colônia 03 da One Shot Match (pET28a\_A2). Linha 3: Colônia 05 da One Shot Match (pGEM\_A2). Linha 4: Colônia 02 da BL21 (pET28a\_A2). Linha 5: Colônia 03 da BL21 (pET28a\_A2). Linha 6: Colônia 04 da BL21 (pET28a\_A2). Linha 7: Colônia 05 da BL21 (pET28a\_A2). Linha 8: Colônia 02 da ER 2566 (pET28a\_A2). Linha 9: Colônia 03 da ER 2566 (pET28a\_A2). Linha 10: Colônia 04 da ER 2566 (pET28a\_A2). Linha 11: Colônia 05

da ER 2566 (pET28a\_A2). Linha 12: Colônia 02 da Rosetta (pET28a\_A2). Linha 13: Colônia 03 da Rosetta (pET28a\_A2). Linha 14: Controle negativo.....36

Figura 7. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (A) e Western-blotting (B) da proteína His6\_A2. As amostras correspondem, respectivamente: **Linha 1**, Marcador de peso molecular de proteínas (Fermentas). **Linha 2**: extrato de *E. coli* ER 2566 transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 3 horas de adição de IPTG (1,5 mM). **Linha 3**: extrato de *E. coli* ER 2566 transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 3 horas sem adição de IPTG. **Linha 4**: extrato de *E. coli* Rosetta transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 3 horas de adição de IPTG (1,0 mM). **Linha 5**: extrato de *E. coli* Rosetta transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 3 horas de adição de IPTG (0,5 mM). **Linha 6**: extrato de *E. coli* Rosetta transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 3 horas de adição de IPTG (1,5 mM). **Linha 7**: extrato de *E. coli* Rosetta transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 3 horas sem adição de IPTG. **Linha 8**: extrato de *E. coli* BL21 (DE3) transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 3 horas de adição de IPTG (1,0 mM). **Linha 9**: extrato de *E. coli* BL21 (DE3) transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 3 horas de adição de IPTG (0,5 mM). **Linha 10**: extrato de *E. coli* BL21 (DE3) transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 3 horas de adição de IPTG (1,5 mM). O gel SDS foi corado com *Comassie Brilliant Blue R-250* e a membrana de western-blotting foi incubada com anticorpo monoclonal anti-PoliHistidina.....37

Figura 8. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (A) e Western-blotting (B) da proteína His6\_A2. As amostras correspondem, respectivamente: **Linha 1**, Marcador de peso molecular de proteínas (Fermentas). **Linha 2**: extrato de *E. coli* BL21 (DE3) transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 3 horas sem adição de IPTG. **Linha 3**: extrato de *E. coli* ER 2566 transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 6 horas de adição de IPTG (1,0 mM). **Linha 4**: extrato de *E. coli* ER 2566 transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 6 horas de adição de IPTG (0,5 mM). **Linha 5**: extrato de *E. coli* ER 2566 transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 6 horas de adição de IPTG (1,5 mM). **Linha 6**: extrato de *E. coli* ER 2566 transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 6 horas sem adição de IPTG. **Linha 7**: extrato de *E. coli* Rosetta transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 6 horas de adição de IPTG (1,0 mM). **Linha 8**: extrato de *E. coli* Rosetta transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 6 horas de adição de IPTG (0,5 mM). **Linha 9**: extrato de *E. coli* Rosetta transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 6 horas de adição de IPTG (1,5 mM). **Linha 10**: extrato de *E. coli* Rosetta transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 6 horas sem adição de IPTG. O gel SDS foi corado com *Comassie Brilliant Blue R-250* e a membrana de western-blotting foi incubada com anticorpo monoclonal anti-PoliHistidina.....38

Figura 9. Banda protéica correspondente à proteína recombinante His6-A2 em membrana de nitrocelulose incubada com anticorpo monoclonal Anti-His pelo Western-blotting. As amostras correspondem, respectivamente: **Linha 1**: Marcador de peso molecular de

proteínas (Fermentas). **Linha 2:** extrato de *E. coli* BL21 (DE3) transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 3 horas de indução com IPTG (0,5mM). **Linha 3:** extrato de *E. coli* BL21 (DE3) transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 3 horas sem adição de IPTG. **Linha 4:** extrato de *E. coli* ER 2566 transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 6 horas de indução com IPTG (0,5mM). **Linha 5:** extrato de *E. coli* ER 2566 transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 6 horas sem indução de IPTG. **Linha 6:** extrato de *E. coli* Rosetta transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 6 horas de indução com IPTG (0,5mM). **Linha 7:** extrato de *E. coli* Rosetta transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 6 horas sem indução de IPTG. **Linha 8:** proteína A2 purificada obtida da célula BL21 (DE3) após 3 horas de indução com IPTG (0,5mM). **Linha 9:** proteína A2 purificada obtida da célula Rosetta após 6 horas de indução com IPTG (0,5mM). **Linha 10:** proteína A2 purificada obtida da célula ER 2566 após 6 horas de indução com IPTG (0,5mM).....39

Figura 10. **A:** Reatividade da proteína His6\_A2 purificada expressa pela BL 21 (DE3) no Dot-ELISA com soro de camundongos. **B:** Reatividade da proteína His6\_A2 purificada expressa pela ER 2566 no Dot-ELISA com soro de camundongos. **C:** Reatividade da proteína His6\_A2 purificada expressa pela Rosetta no Dot-ELISA com soro de camundongos. Todos os números **1, 2 e 3:** soros dos camundongos 1, 2 e 3 respectivamente, inoculados com a proteína recombinante obtida da célula BL 21 (DE3), após 3 horas de indução. Todos os números **4, 5 e 6:** soros dos camundongos 4, 5 e 6 respectivamente, inoculados com a proteína recombinante obtida da célula BL 21 (DE3), após 12 horas de indução. Todos os números **7, 8 e 9:** soros dos camundongos 7, 8 e 9 respectivamente, inoculados com a proteína recombinante obtida da célula ER 2566, após 12 horas de indução. Todos os números **10, 11 e 12:** soros dos camundongos 10, 11 e 12 respectivamente, inoculados com a proteína recombinante obtida da célula Rosetta, após 12 horas de indução. Todos os números **13:** soros controles de camundongos não inoculados com a proteína recombinante A2.....40

Figura 11. Reatividade da proteína His6\_A2 pelo Western-blotting. **Linha 1:** Marcador de peso molecular de proteínas (Fermentas); **Linhas 2 a 4:** reação dos soros de três camundongos, inoculados com a proteína recombinante obtida da célula BL21 (DE3), após 3 horas de indução, frente à proteína His6\_A2 purificada; **Linha 5 a 7:** reação dos soros de três camundongos, inoculados com a proteína recombinante obtida da célula ER 2566, após 3 horas de indução, frente à proteína His6\_A2 purificada; **Linha 8 a 10:** reação dos soros de três camundongos, inoculados com a proteína recombinante obtida da célula BL21 (DE3), após 12 horas de indução, frente à proteína His6\_A2 purificada.....41

Figura 12. Reatividade da proteína His6\_A2 pelo Western-blotting. **Linha 1:** Marcador de peso molecular de proteínas (Fermentas); **Linhas 2 a 4:** reação dos soros de três camundongos, inoculados com a proteína recombinante obtida da célula Rosetta, após 3 horas de indução, frente à proteína His6\_A2 purificada; **Linha 5 a 6:** reação dos soros de dois camundongos, inoculados com a proteína recombinante obtida da

célula BL21 (DE3), após 3 horas de indução, frente à proteína His6\_A2 purificada; **Linha 7:** reação dos soros de um camundongo, inoculado com a proteína recombinante obtida da célula ER 2566, após 3 horas de indução, frente à proteína His6\_A2 purificada; **Linha 8 a 9:** reação dos soros de dois camundongos, inoculados com a proteína recombinante obtida da célula Rosetta, após três horas de indução, frente à proteína His6\_A2 purificada; **Linha 10:** reação do soro de camundongo não inoculado frente à proteína His6\_A2 purificada.....41

Figura 13. Número de soros de cães parasitologicamente positivos (n=27, Grupo B), soros de cães vacinados (n=30, Grupo C) e soros de cães soronegativos (n=36, Grupo A) triados em níveis de densidade óptica (DO) pelo ELISA His-A2.....44

## **EXPRESSÃO EM *Escherichia coli* DE UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE DO GENE A2 DE *Leishmania chagasi* E UTILIZAÇÃO DESTA PROTEÍNA NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

**RESUMO** – A leishmaniose visceral é uma zoonose, considerada como uma entre seis doenças tropicais mais importantes nos países em desenvolvimento. O agente etiológico da enfermidade no Brasil, a *Leishmania chagasi*, é transmitida pela picada do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, que adquire o parasito ao realizar o hematofagismo em animais infectados. No ambiente doméstico, o cão é considerado o principal reservatório da leishmaniose visceral e, em consequência disso, é também o principal alvo das campanhas de controle da forma humana da doença. Neste trabalho foi avaliado o potencial diagnóstico para a leishmaniose visceral canina de um antígeno recombinante, produzido a partir do gene de uma proteína, isolado em *L. chagasi*, amostra Jaboticabal. O gene isolado apresenta similaridade com a família A2 de *L. chagasi* e foi expresso utilizando o vetor pET28a em *E. coli*. A proteína de 11 KDa expressa, foi avaliada pelo ensaio imunoenzimático (ELISA). O ELISA com o antígeno recombinante His6\_A2 detectou anticorpos anti-A2 em 52% dos cães infectados com *L. chagasi*. Enquanto que, 67% dos soros de animais vacinados e 65% dos animais de áreas-não endêmicas, foram negativos pelo ELISA\_A2. Os testes de Western-blotting e Dot-ELISA realizado com soros de camundongos inoculados com essa proteína His\_A2 demonstrou resultados positivos de antigenicidade e imunogenicidade. Todos os sequenciamentos de DNA mostraram homologia com genes da família A2.

**Palavras-chaves:** *Leishmania chagasi*, A2, pET 28a, diagnóstico, *Escherichia coli*.

**EXPRESSION IN *E. coli* OF A RECOMBINANT PROTEIN FROM A2 GENE OF  
*Leishmania chagasi* AND USE OF THIS PROTEIN IN DIAGNOSIS OF CANINE  
VISCERAL LEISHMANIASIS**

**SUMMARY** – Visceral leishmaniasis is a zoonosis and one of six most important tropical diseases in developing countries. The causative agent of the disease in Brazil, *Leishmania chagasi*, is transmitted by the bite of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*, who acquired the parasite biting infected animals. In domestic environment, the dog is considered the main reservoir of visceral leishmaniasis, and in consequence it is also the main target of campaigns to control the disease in human beings. This study evaluated the potential of a recombinant antigen produced from the A2 gene Jaboticabal strain *L. chagasi* for diagnosis of canine visceral leishmaniasis (LVC). The isolated gene showed similarity with *L. chagasi* family A2 gene, and was expressed using pET28a expression vector in *E. coli*. The 11-kDa protein expressed was evaluated by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using known positive and negative sera, previously tested by Indirect Immunofluorescence Assay (IFA). The His-A2 recombinant-antigen detected anti-A2 antibodies in 52% of *L. chagasi* infected dogs. Seventy-seven percent of vaccinated dogs and 65% of dogs from non-endemic areas were both negative by A2-ELISA. The antigenicity and immunogenicity of the expressed protein was confirmed by Western blot and Dot-ELISA assays, performed using sera from mice inoculated with this protein.

**Keywords:** *Leishmania chagasi*, A2, pET 28a, diagnostic, *Escherichia coli*.

## 1. INTRODUÇÃO

As medidas de controle da leishmaniose visceral visam os três elementos da cadeia de transmissão: os vetores (flebotomíneos), o reservatório principal (cães domésticos) e o homem doente (CASTRO et al., 1996). A eliminação do cão positivo para leishmaniose, com sinais clínicos ou não, é o ponto mais controverso, mesmo sendo este o principal reservatório doméstico. Veterinários e sociedades protetoras de animais têm questionado a eutanásia de cães positivos. Porém, não existe um tratamento comprovado que elimine definitivamente o parasito do organismo canino, evitando que este seja fonte de infecção para os flebotomíneos e conseqüentemente para o homem (SANTA ROSA & OLIVEIRA, 1997).

O impacto da remoção dos cães soropositivos para leishmaniose, no Brasil, tem sido questionado por vários autores devido a sua eficácia dúbia, custo e resistência dos proprietários a aderir ao controle (PALATNIK de SOUSA et al., 2001). A utilização de uma vacina profilática humana ou canina poderia representar uma forma de controle eficiente da enfermidade (BORJA-CABRERA et al., 2002).

Vários estudos foram conduzidos na tentativa de criar uma vacina para a leishmaniose canina e atualmente há duas vacinas comercializadas, a Leishmune® (Fort Dodge) e a Leish-Tec® (Hertape Calier). Porém, ambas apresentam restrições. A primeira, Leishmune, consiste de antígeno purificado (FML – Fucose Manose Ligand), feito de um extrato inativado de *Leishmania donovani*, e impossibilita diferenciar animais vacinados de animais infectados. Portanto, o uso dela é restrito à clínicas veterinárias, e o médico veterinário que utilizá-la é responsável pelo teste sorológico do animal, que deve ser negativo para a enfermidade antes da vacinação.



Uma vez vacinado, o cão será soropositivo para leishmaniose e estará sujeito às normas de controle da doença impostas pelo Ministério da Saúde, ou seja, o sacrifício de todos os cães soropositivos (WERKHAUSER, 2004). Enquanto que a Leish-Tec ainda necessita estabelecer a taxa de proteção em áreas endêmicas.

Antígenos recombinantes têm sido testados como antígenos alternativos para o diagnóstico da leishmaniose visceral e outras doenças em medicina veterinária, sendo uma ótima fonte para o desenvolvimento de testes diagnósticos simples, rápidos, específicos que possam ser utilizados a campo e que também possam diferenciar animais naturalmente infectados de animais imunizados.

Cabe ressaltar que Oliveira et al. (2010) clonaram, pela primeira vez no Brasil, o gene da proteína A2 de um isolado de *L. chagasi*, no laboratório de Imunoparasitologia, do departamento de Patologia Veterinária, na FCAV Unesp Jaboticabal, a qual poderá também ser utilizada no diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

O estudo de genes obtidos em *L. chagasi* e a produção de proteínas, a partir desses genes, são de grande interesse para um maior conhecimento sobre a biologia desse parasita. Proteínas da família A2 são de especial importância para diagnóstico de LVC, uma vez que são exclusivas da fase amastigota, podendo auxiliar no diagnóstico entre animais vacinados daqueles naturalmente infectados. De modo que, a partir do gene A2, isolado em *L. chagasi*, foi expressa e purificada uma proteína. Essa proteína foi testada no diagnóstico sorológico da leishmaniose

visceral canina, na tentativa de se obter um teste não só mais específico da doença, mas que também pudesse diferenciar animais infectados de animais imunizados.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A leishmaniose visceral, também conhecida como Calazar, no Brasil é uma zoonose, causada por um protozoário do gênero *Leishmania* (CASTRO, 1996).

As primeiras observações e descrições de protozoários do gênero *Leishmania* foram feitas no fim do séc. XIX e, atualmente, são descritas cerca de trinta espécies neste gênero. Todas as espécies são morfologicamente muito semelhantes entre si, porém, são responsáveis pela ocorrência de enfermidades com características clínicas e epidemiológicas bastante diferentes (REY, 2005). Pertencentes à Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae e divididas em subgêneros, complexos, espécies e subespécies; a espécie *Leishmania chagasi*, do complexo *Donovani*, subgênero *Leishmania* é a espécie responsável pela ocorrência da leishmaniose visceral no Brasil (NEVES, 2005).

A transmissão dos parasitas para os hospedeiros vertebrados ocorre pela picada do inseto vetor. Diferentes espécies de flebotomíneos hematófagos, pertencentes ao gênero *Lutzomyia*, são os transmissores das leishmanioses na América e, assim como os reservatórios, os vetores também mudam de acordo com a espécie de *Leishmania* (FUNASA, 1999). Os flebotomíneos são mosquitos de tamanho bastante reduzido, cerca de 2 a 3 mm, com hábitos peridomésticos e intradomiciliares, que fazem seu ciclo larvar na matéria orgânica úmida. Fato que dificulta o combate desses vetores (SANTA ROSA & OLIVEIRA, 1997).

O vetor da leishmaniose visceral no Brasil é o *Lutzomyia longipalpis*, porém, trabalhos recentes mostram o possível envolvimento de outras espécies de *Lutzomyia* na transmissão da leishmaniose visceral em áreas não endêmicas da América do Norte e do Sul (TRAVI et al., 2002).

*Leishmanias* são parasitos digenéticos (heteroxenos) e apresentam duas formas durante seu ciclo biológico: a forma promastigota, encontrada no tubo digestivo anterior do inseto vetor, e a forma amastigota, observada no interior de células do sistema mononuclear fagocitário do hospedeiro vertebrado. Ao se alimentar em um hospedeiro vertebrado infectado, o flebotomíneo ingere formas não flageladas do parasita (amastigotas), encontradas no interior dos macrófagos. No tubo digestivo anterior do inseto vetor, as formas amastigotas passam a ser flageladas e são denominadas promastigotas. As formas promastigotas prendem-se à parede intestinal do flebótomo e se multiplicam. Em poucos dias, o intestino anterior fica repleto de promastigotas. Quando realiza novamente o repasto sangüíneo, o flebotomíneo pode infectar a pele do hospedeiro vertebrado, regurgitando as formas promastigotas. As promastigotas são então fagocitadas pelos macrófagos da pele e perdem o flagelo, multiplicando-se em amastigotas no interior dessas células (REY, 2001; STRAUSS, 2001).

A leishmaniose visceral era considerada uma enfermidade silvestre ou de ambiente rural, e a ocorrência da enfermidade estava associada a esses ambientes e às crianças (SANTA ROSA & OLIVEIRA, 1997). Porém, surtos e epidemias de leishmaniose visceral têm sido observados em grandes centros urbanos do Brasil (FEITOSA et al., 2000; SILVA et al., 2001; NUNES et al., 2001; FRANÇA-SILVA et al., 2003). Até o momento, não há hipóteses ou explicações suficientes para o processo de urbanização dessa doença (COSTA, 2008).

A urbanização da leishmaniose visceral no Brasil iniciou-se em Teresina, Piauí. No ano seguinte, o processo de urbanização apareceu em São Luís (Maranhão) e Montes Claros (Minas Gerais) e depois disso espalhou-se para diversas outras cidades com mais de cem mil habitantes, além de uma infinidade de cidades menores. As epidemias ocorreram na seguinte ordem nestas cidades: Natal (Rio Grande do Norte) (JERONIMO et. al., 1994), Belo Horizonte (SILVA et al., 2001) e Montes Claros (Minas Gerais), Corumbá e Campo Grande (Mato Grosso do Sul), Aracaju (Sergipe), Caxias e Imperatriz (Maranhão), Jequié (Bahia), Araçatuba e Bauru (São Paulo), Várzea Grande (Mato Grosso), Palmas (Tocantins) e agora Fortaleza (Ceará), Brasília (Distrito Federal) e Piracicaba (São Paulo) (Ministério da Saúde, 2007).

O aumento do número de casos da doença em áreas urbanas pode ser explicado pelo intenso processo migratório de populações rurais para a cidade e pelas alterações ambientais dos últimos anos. A formação de favelas, com infra-estruturas mínimas de saneamento básico e com grandes densidades populacionais humanas e caninas favoreceu a reprodução do vetor e fez com que, ao invés de ser mais prevalente em áreas rurais, a leishmaniose visceral se tornasse comum na periferia de algumas grandes cidades do Brasil (SILVA et al., 2001; STRAUSS, 2001).

Estima-se que a ocorrência anual de casos de leishmaniose visceral em seres humanos, em todo o mundo, seja da ordem de 500 mil casos, sendo mais de 90% dos casos no Brasil, Bangladesh, Índia e Sudão (WHO, 2010). Nos últimos dez anos, houve uma média de 3.156 casos de leishmaniose visceral humana por ano, com uma incidência de dois casos/100.000 habitantes (BRASIL, 2006).

No ambiente doméstico, o cão é considerado o principal reservatório epidemiológico, sendo de grande importância na manutenção do ciclo da doença. A importância dos cães advém do fato da leishmaniose visceral canina ser bem mais prevalente que a humana e por estes apresentarem uma maior quantidade de parasitas na pele, o que favorece a infecção dos vetores (TRAVI et al. 2001; VERÇOSA et al. 2008). O trabalho de Queiroz, et al. (2010) mostrou ainda que não apenas tecidos dos cães sintomáticos como também os assintomáticos e oligossintomáticos apresentavam parasitas na pele, confirmados por imuno-histoquímica e PCR.

Outra mudança importante na epidemiologia da leishmaniose visceral é o número de pessoas com mais de quinze anos que contraem a doença. Tradicionalmente, o principal grupo de risco para a doença era o de crianças jovens, frequentemente associados à desnutrição. Com o surgimento do vírus da imunodeficiência humana (HIV), a leishmaniose visceral tem aparecido como uma importante e frequente infecção secundária fatal em pessoas imunodeprimidas (STRAUSS, 2001).

A gravidade dos sinais clínicos no cão depende do tipo de resposta imunológica apresentada pelo hospedeiro, estando, portanto, relacionada a fatores genéticos associados aos hospedeiros. A resposta imune humoral na leishmaniose canina é muito exuberante, entretanto, ela é deletéria e não protetora. Por ser um parasito intracelular

obrigatório, as defesas do hospedeiro dependem de uma resposta imune celular. Naturalmente, tanto a resposta imune humoral como a celular estão envolvidas e a gravidade e variedade dos sinais clínicos da doença dependem do equilíbrio entre essas duas respostas (POCAI et al., 1998; FEITOSA et al., 2000; ROITT, 2003).

Estudos demonstram que a resistência à infecção por este parasito é associado com o desenvolvimento de resposta imune celular do tipo Th1, enquanto a susceptibilidade e a progressão da doença estão relacionadas com a resposta do tipo Th2 (SCOTT et al., 1989). O desenvolvimento do fenótipo de resistência está associado com a presença citocinas como interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), interleucina-2 (IL-2), interleucina-12 (IL-12) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que atuam no combate ao parasita. Altos níveis de imunoglobulinas da subclasse IgG2 também está associada à resistência dessa infecção (OLIVEIRA DA SILVA et al., 2001).

No entanto, a resposta do tipo Th2, favorável ao desenvolvimento da doença, está relacionada a um aumento na produção de citocinas como a interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10) e interleucina-13 (IL-13) (HEINZEL et al., 1989; HEINZEL et al., 1993; SCHARTON & SCOTT, 1993; SYPEK et al. 1993; BELKAID et al., 2001; JONES et al., 2000; JI et al., 2002).

A forma clássica da leishmaniose canina tem sido descrita como inicialmente acompanhada por febre, descamação da pele e eczema, particularmente no espelho nasal e orelha, pêlo opaco, pequenas úlceras rasas, localizadas mais frequentemente nas orelhas, focinho, cauda e articulações. Com grande frequência, observa-se nas fases mais adiantadas da doença, esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatites, úlceras de pele, onicogribose, ceratoconjutivite, coriza, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, edema de patas, vômito e hiperqueratose. Na fase final da infecção, geralmente acontece paralisia das patas posteriores, caquexia, inanição e morte (REY, 2005). São descritas também, uma forma de evolução aguda da doença que leva o animal a óbito em pouco tempo, e uma latente, na qual cães infectados podem não apresentar sinais clínicos da doença por um longo período de tempo (SLAPPENDEL & GREENE, 1990; FEITOSA et al., 2000). Dessa forma, pode-se agrupar os cães infectados em assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos de

acordo com os sinais clínicos que apresentam (MANCIANTI et al., 1996). Os cães assintomáticos, geralmente 20 a 40% de uma população soropositiva, podem viver até sete anos sem apresentar sinais clínicos da infecção (SANTA ROSA & OLIVEIRA, 1997; FEITOSA et al. 2000).

Por ser uma doença de notificação compulsória, o diagnóstico da leishmaniose visceral deve ser o mais preciso possível. Porém, o diagnóstico da leishmaniose visceral canina é complicado devido à variedade de sinais clínicos, ao grande número de animais assintomáticos e à ausência de um teste 100% específico e sensível (GENARO, 1993).

Três tipos de testes são utilizados no diagnóstico do Calazar: testes parasitológicos, sorológicos e moleculares. A forma mais segura de diagnóstico é a observação direta do parasito em esfregaços de linfonodo, medula óssea, aspirado esplênico, biópsias hepáticas e esfregaços sangüíneos corados, porém, a sensibilidade destes testes depende do tipo de material biológico colhido, grau de parasitemia e tempo de leitura da lâmina (GENARO, 1993). A reação em cadeia pela polimerase (PCR), apresenta sensibilidade e especificidade próximas a 100% quando realizada corretamente, porém seu custo é alto, fato que dificulta seu uso em larga escala (ROURA et al., 1999).

As provas sorológicas são muito úteis na detecção da leishmaniose, pois animais infectados desenvolvem altos títulos de IgG anti-*Leishmania*. Entretanto, os testes sorológicos devem ser interpretados com cautela, pois podem gerar resultados falso-positivos ou falso-negativos (SLAPPENDEL & GREENE, 1990; FERRER et al., 1995; SANTA ROSA & OLIVEIRA, 1997).

Resultados falso-positivos em testes sorológicos para *L. chagasi* são observados principalmente em seres humanos infectados por *L. braziliensis* ou *Trypanosoma cruzi* quando os testes são realizados utilizando-se antígenos não purificados do parasito (GUIMARÃES et al., 1986; SUNDAR & RAI, 2002). Em cães, suspeitava-se da ocorrência de resultados falso-positivos para *Leishmania* em animais infectados por *Ehrlichia canis* ou *Babesia canis*, porém o trabalho de Oliveira et al. (2008) mostrou que

essa reatividade cruzada não ocorre, existindo, no entanto, co-infecção para os três agentes.

Reagentes específicos e ferramentas moleculares têm sido utilizadas para a investigação detalhada da leishmaniose canina. Avanços importantes têm sido feitos na elucidação a epidemiologia e patologia da doença, conduzindo ao desenvolvimento de novos métodos diagnósticos e medidas de controle contra a infecção, tais como coleiras para cães impregnadas com inseticida, novas drogas e protocolo de tratamentos e segunda geração de vacinas, com a expectativa não somente de reduzir a doença entre cães, mas também a incidência da leishmaniose visceral humana (ALVAR et al., 2004).

Antígenos recombinantes como o “A2” e o “K39” estão sendo avaliados na tentativa de substituir os de preparações naturais de parasitas em testes sorológicos (CARVALHO et al., 2002).

A expressão de proteínas em *E. coli* apresenta um conjunto considerável de vantagens em relação a outros sistemas de clonagem e expressão gênica. São de fácil manipulação, exigem meios relativamente simples e permitem a expressão da proteína rapidamente. Além disso, os processos de extração e purificação da proteína recombinante são menos complexos, o que é relevante quando se visa à produção da proteína em larga escala. E apesar de não permitir modificações pós-traducionais, as proteínas expressas em *E. coli* têm sido utilizadas com êxito nos testes de diagnóstico para diferentes doenças em medicina veterinária (McBRIDE et al., 1999; HUANG et al., 2006).

A proteína A2 é exclusiva da fase amastigota das *Leishmanias* do complexo *L. donovani* e do complexo *L. mexicana* e tem sido utilizada em testes sorológicos na tentativa de aumentar sua eficácia no diagnóstico para leishmaniose canina como forma de antígeno mais específica para detecção da leishmaniose visceral (CARVALHO et al., 2002; COELHO et al., 2003).

Os genes da família A2 de *L. donovani* são compostos predominantemente, de uma sequência codificadora de 10 aminoácidos, que se repete por 40 a 90 vezes e, apresentam similaridade com o antígeno S do *Plasmodium falciparum*, que é expresso pelo agente etiológico da malária (CHAREST & MATLASHESKI, 1994).

Há no mínimo sete genes que pertencem à família descrita como A2 e estes codificam uma família de proteínas, que apresentam anticorpos contra proteínas do gene A2 em pacientes com leishmaniose visceral. Em testes sorológicos utilizando a proteína A2 (GHEDIN et al., 1997) isolada em *L. donovani* por Charest & Matlashewski (1994), 60% e 82% dos soros de seres humanos com LV da Índia e do Sudão respectivamente, foi reconhecida pelo ELISA indireto com essa proteína. Carvalho et al. (2002) utilizou essa mesma proteína, subclonada no Brasil em testes de ELISA indireto, utilizando soros de cães diagnosticados com LV positivos. Os resultados mostraram que o teste utilizando a proteína A2 foi mais específico no diagnóstico da LVC do que os testes utilizando antígeno parcialmente purificado.

O trabalho de Zhang & Matlashewski (1997), demonstraram a importância da proteína A2 como um fator de virulência do parasita, pois essas proteínas determinaram a sobrevivência da amastigota em camundongos. Mais recentemente, proteínas A2 foram encontradas ligadas ao retículo endoplasmático da *Leishmania* e, ainda verificou-se que a produção desta pode ser uma resposta ao estresse, no caso, um aumento de temperatura (McCALL and MATLASHEWSKI, 2010).

No laboratório de Imunoparasitologia da FCAV-Unesp Jaboticabal, foram isolados e clonados, alguns genes de uma amostra de *L. chagasi*. A amostra de *L. chagasi* utilizada foi isolada em Jaboticabal-SP por Machado & Tinucci-Costa (2004) de um cão. Essa amostra foi caracterizada como pertencente ao complexo *Donovani* por métodos moleculares (CORTES et al., 2004) e como *L. chagasi* por testes realizados pela Dra. Vanete Thomaz Soccol, do laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Patologia Básica, setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Atualmente não existe um teste que ofereça especificidade e sensibilidade de 100%, ou mesmo que diferencie efetivamente animais sintomáticos dos assintomáticos, assim como não há diagnóstico que diferencie animais naturalmente infectados de animais vacinados. Na tentativa de se obter um teste diagnóstico que auxilie na resolução dessas questões, objetivamos expressar a proteína recombinante a partir do gene A2 de *Leishmania chagasi* e utilizá-la em um ensaio imunoenzimático.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Expressar e purificar uma proteína da família A2 de *L. chagasi*, partir de um clone já produzido.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Produzir uma proteína recombinante a partir do gene A2 obtido em *L. chagasi*.
- Avaliar a antigenicidade e imunogenicidade desse antígeno por meio do Dot-ELISA, RIFI e Western-blotting.
- A proteína recombinante A2 será utilizada no ELISA-teste e sua eficiência de diagnóstico será comparada com antígeno total parcialmente purificado de *L. chagasi*.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Amostras**

#### **4.1.1. Soros de cães controles (Grupo A)**

Foram utilizados como controles negativos soros de 36 cães da cidade de Jaboticabal, área não-endêmica para a leishmaniose visceral, todos os soros negativos para leishmaniose, por métodos sorológicos (RIFI e ELISA).

#### **4.1.2. Animais naturalmente infectados (Grupo B)**

Foram utilizadas 27 amostras de soros de cães, sendo que dessas, 11 eram amostras de soro canino (sintomáticos e assintomáticos) da cidade de Belo Horizonte (MG), positivas para *Leishmania chagasi* pelo teste sorológico de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e pelo ELISA indireto, gentilmente cedidas pelo Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz de Belo Horizonte (MG). As outras 16 amostras de soros são oriundas de cães atendidos no Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel - FCAV-UNESP/Jaboticabal, com LVC sintomáticos, soropositivos para *Leishmania* sp pela RIFI e pelo ELISA indireto.

#### **4.1.3. Cães vacinados (Grupo C)**

Gentilmente, a Fort Dodge cedeu 30 amostras de soro de cães vacinados com a vacina Leishmune®, comercializada no mercado. Estes soros foram utilizados no estudo de reatividade frente à proteína recombinante A2, pelo ELISA-teste.

## **4.2. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)**

### **4.2.1. Preparo do antígeno**

O protocolo utilizado para o preparo de antígeno total de promastigotas de *L. chagasi* para a RIFI foi descrito por Oliveira et al. (2008). Resumidamente, os parasitas promastigotas foram mantidos em meio de cultura RPMI, pH 6,8, à 26°C.

As formas promastigotas passaram por três lavagens com solução salina tamponada (PBS). Após a terceira lavagem, a suspensão de parasitas foi colocada em uma solução de paraformaldeído a 4%, por 30 minutos, para a fixação dos parasitas. Após a fixação, os parasitas foram novamente lavados por três vezes com PBS, e o sedimento contendo parasitas foi ressuspendido nesta mesma solução até a concentração de  $3 \times 10^6$  a  $4 \times 10^6$  parasitos por mL.

Utilizando-se lâminas previamente demarcadas com círculos, depositando em cada círculo 10µL da suspensão de parasitas em PBS. Após secagem à temperatura ambiente, cada lâmina foi devidamente embalada em papel extrafino e, após, em papel alumínio, e estocadas a -20° C, em recipiente hermeticamente fechado, até o momento de uso.

### **4.2.2. Descrição da reação**

As lâminas preparadas foram retiradas do freezer e descongeladas à temperatura ambiente. Em cada círculo contendo o antígeno, adicionou-se 10µL de cada soro teste diluído na concentração de 1: 40. As lâminas foram então incubadas,

em câmara úmida a 37° C, por 30 minutos e, a seguir, submetidas a três lavagens em PBS por imersão, durante cinco minutos cada. Após secagem à temperatura ambiente, os círculos das lâminas foram recobertos com 10µL do anticorpo anti-IgG de cão conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (Sigma cat n° F 7884), diluído a 1: 32, em solução de PBS, contendo azul de Evans 1mg%. As lâminas foram novamente incubadas e lavadas conforme descrito acima. Após a secagem das lâminas, estas foram montadas com lamínula, utilizando-se glicerina tamponada a uma relação de 9:1 de glicerina/tampão carbonato-bicarbonato 0,5M pH 9,6 e, posteriormente, observadas em microscópio equipado para fluorescência (Olympus, BX-FLA).

As amostras séricas positivas na diluição de 1: 40 foram novamente testadas. Em cada círculo contendo o antígeno, foram dispensados 10 µL das diluições sucessivas dos soros testes positivos. A titulação dos soros teste positivos foi realizada a partir da diluição de 1: 40, base 2, até a negatificação do mesmo. Após a leitura das lâminas, foram consideradas positivas as reações com fluorescência em todo o contorno da forma promastigota do parasito, a partir da diluição 1: 40.

### **4.3. Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA teste)**

O teste de ELISA indireto para *L. chagasi* foi realizado de acordo com técnica descrita por Machado et al. (1997) para *B. bovis*, com pequenas modificações descritas por Oliveira et al. (2008).

#### **4.3.1. Preparação do antígeno total solúvel de *Leishmania chagasi***

Os parasitas em meio de cultura foram centrifugados a 3.000 rpm (Sorwall), por dez minutos, e o sobrenadante, descartado. Posteriormente, foram feitas duas lavagens dos parasitas com PBS. Após as lavagens, os parasitas na concentração de  $2 \times 10^6$ /mL, foram ressuspensos em tampão de homogeneização e armazenados a -70° C.

A suspensão de parasitas armazenada foi então submetida a sete ciclos de congelamento à  $-70^{\circ}\text{C}$ , seguidos de descongelamento à  $37^{\circ}\text{C}$ . A suspensão resultante foi centrifugada a 3.000 rpm, durante 3 horas a  $4^{\circ}\text{C}$  e, alíquotas de  $500\mu\text{L}$  do sobrenadante foram congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , até o momento do uso. O conteúdo protéico do antígeno solúvel foi determinado pelo método do ácido bicínico, utilizando-se o “Kit” de reagentes BCA (BCA Reagents Kit-Pierce Chemical Company), de acordo com as recomendações do fabricante.

#### **4.3.2. Descrição da reação**

Foram adicionados  $100\mu\text{L}$  do antígeno solúvel de *L. chagasi*, diluído na concentração de  $10\mu\text{g/mL}$  em tampão carbonato-bicarbonato de sódio  $0,05\text{M}$ , pH 9,6, em cada cavidade das microplacas de fundo plano (Nunclon™ Surface, Nunc, Denmark). Após incubação da placa por 8 a 10 horas em câmara úmida a  $4^{\circ}\text{C}$ , o excesso de antígeno foi removido por três lavagens consecutivas, com tampão PBS  $0,01\text{M}$ , pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-Tween 20). As placas foram bloqueadas com PBS-Tween 20, acrescido de 6% de leite em pó, em câmara úmida, a  $37^{\circ}\text{C}$  por 90 minutos. Após nova lavagem para retirada do bloqueador, foram adicionados, em duplicata,  $100\mu\text{L}$  dos soros testes e dos soros de referência positivos e negativos diluídos 1: 400 em PBS-Tween 20, com 5% de leite em pó desnatado. As microplacas foram então novamente incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 90 minutos e lavadas, como descrito anteriormente;  $100\mu\text{L}$  do conjugado canino acoplado a fosfatase alcalina (Ig de coelho anti IgG de cão, Sigma A-0793), diluído 1:4.000 em PBS-Tween 20, acrescido de 5% de soro de coelho, foram adicionados a cada cavidade da placa, seguindo-se nova incubação e lavagem como as anteriores. O substrato da enzima fosfatase alcalina (paranitrofenilfosfato diluído a  $1\text{mg/mL}$  em tampão dietanolamina pH 9,8; Sigma N-9389) foi adicionado, incubando-se a reação por 30 minutos à temperatura ambiente. Decorrido esse período, a leitura da reação foi realizada em um leitor de microplacas de ELISA (Microplate Reader MRX TC Plus, Dynex Technology), a um comprimento de onda de 405 nm.

#### **4.4. Obtenção do gene A2 isolado em *L. chagasi***

Uma amostra de *L. chagasi* foi isolada por Machado & Tinucci-Costa (2004), de um cão que pertencia a um canil da cidade de Colina-SP, mas que foi adquirido com um ano de idade por um criador da região de Araçatuba-SP. Este animal foi atendido no Hospital Veterinário “Governador Natel” em Jaboticabal (SP), com sinais clínicos de LVC, positivo em testes sorológicos (RIFI e ELISA), moleculares e em cultura. Promastigotas de *L. chagasi* foram utilizadas por Oliveira et al. (2010) para isolar o gene A2. Uma sequência idêntica do gene A2 de 504 nucleotídeos foi obtida de uma mini biblioteca genômica de *L. chagasi*. O gene A2 isolado foi então inserido e clonado no vetor pGEM-T Easy Vector System I (Promega, Madison, USA, Cat. # A1360) e mantido em *Escherichia coli* DH10B.

#### **4.5. Produção do antígeno recombinante A2**

##### **4.5.1. Minipreparação de DNA Plasmidial (Método da lise alcalina)**

Para a extração do DNA plasmidial foi utilizado o Método da Lise Alcalina (SAMBROOK et al., 2001) para os dois vetores. Os tubos contendo as bactérias em meio líquido foram incubados por 12 horas a 37°C, sob agitação de 250 rpm. Os precipitados foram coletados por centrifugação e a eles foram adicionados 100 µL de solução Glicose-EDTA-Tris HCL (50 mM de glicose; 10 mM de EDTA 0,5M pH 8,0; 25 mM de Tris-HCL 1M pH 8,0 e água destilada q.s.p. 100 mL). Após homogeneização, foi adicionado 200 µL da solução de lise (1mL de NaOH 1N, 500µL de SDS 10%, água milli-Q autoclavada q.s.p. 5 mL), a mistura foi por inversão, e as amostras foram deixadas em gelo por 5 minutos. Foi adicionado 150 µL de acetato de potássio 3M, as amostras foram misturadas, deixadas no gelo novamente por 5 minutos e centrifugadas a 14.000 rpm (Sorvall Legend Mach 1.6R), por 10 minutos, à 4°C. O sobrenadante (400 µL) foi transferido para um novo microtubo e 1 mL de etanol absoluto foi adicionado, misturado e colocado no *freezer* -80°C por 15 minutos. As amostras foram

centrifugadas e o sobrenadante foi desprezado. Foi adicionado 1 mL de etanol 70%, e as amostras foram submetidas à agitação até o descolamento do precipitado. Foi feita centrifugação por 5 minutos à temperatura ambiente, desprezou-se o sobrenadante e os tubos foram secos em banho-seco à 45°C por aproximadamente 40 minutos. Foi adicionado 200µL de RNase (200µg/mL), e as amostras foram deixadas em banho-maria a 37°C por 2 horas. Após o banho, adicionou-se 50 µL de fenol:clorofórmio (v/v). A mistura foi homogeneizada em agitador por 1 minuto e centrifugada conforme descrito anteriormente. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo com 10 µL de Acetato de sódio 3M pH 5,2 e 200 µL de etanol absoluto. Após 15 minutos mantido à temperatura de -80°C, a mistura foi novamente centrifugada e, dessa vez, o sobrenadante foi desprezado. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70%, seco em banho-seco à 45°C por aproximadamente 30 minutos e diluído em água ultrapura.

#### **4.5.2. Amplificação do DNA de A2 de *L. chagasi* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR)**

A sequência do gene A2 (504 pares de base) inserido e clonado no vetor pGEM-T Easy foi amplificado através da técnica de PCR utilizando o par de oligonucleotídeos A2b-1R/A2c-1F com o objetivo de subclonar o gene da proteína A2, novamente, no vetor pGEM-T Easy. Abaixo, estão representadas as sequências polinucleotídicas dos oligonucleotídeos.

- A2b-1R (5' – AGAATTCTTAAGACACCGGAGAAACGTC – 3')
- A2c-1F (5' – ACATATGGCTGAGCCGCACAAGGC – 3')

Esses oligonucleotídeos possuem sítios de restrição (bases sublinhadas) para as endonucleases *EcoRI* e *NdeI*, que está presente no sítio de clonagem múltipla do vetor pET 28a.

Foram realizados diferentes protocolos da reação de amplificação, nos quais variou-se a temperatura de anelamento de 50°C a 70°C. A reação de amplificação

utilizada para um volume total de 25  $\mu$ L foi de: 1 $\mu$ L da amostra de DNA plasmidial, 2,5  $\mu$ L de tampão da PCR (PCR buffer 10X – 200mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), 200 mM de cada deoxinucleotídeo (dTTP, dATP, dGTP, dCTP, Eppendorf), 1,5 mM de Cloreto de Magnésio, 1,25  $\mu$ L de cada oligonucleotídeo diluído a 10 pmol/mL (Invitrogen), 1U de Taq DNA Polimerase Recombinante (Invitrogen) e água q.s.p. A reação foi conduzida em termociclador (MJ Research - PTC 200) e consistiu de um ciclo de 94°C por 2 minutos, 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 51°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 7 minutos. O produto amplificado foi submetido à eletroforese horizontal em gel de agarose (Invitrogen) a 1,0%, corado com brometo de etídio (0,5 $\mu$ L/mL) em tampão de corrida TEB (89mM Ácido bórico, 89 mM Tris-acetato, 2,5mM EDTA, pH final de 8,0). A eletroforese foi realizada a 100V/ 50mA, durante 60 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados, foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (100bp ladder, Invitrogen). O resultado foi visibilizado e analisado através de um transiluminador de luz ultravioleta (2020E) acoplado a um programa computacional analisador de imagens (Eagle Eye II - Stratagene).

#### **4.5.3. Purificação do fragmento gênico amplificado por PCR**

Os produtos da PCR visibilizados no gel de agarose, conforme descrito anteriormente, foram removidos e o DNA purificado, utilizando o kit Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas Cat # K0513), de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, após a determinação do peso do fragmento de gel, foram adicionados três volumes da solução de iodeto de sódio, seguido de incubação a 55°C até a completa dissolução da agarose. Posteriormente, adicionou-se a resina e após incubação à temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada a 13.000 rpm, durante 1 minuto (Eppendorf 5415R) e o DNA lavado com etanol 70%. O precipitado foi dissolvido em 10  $\mu$ L de água e após nova centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e armazenado a -20°C.



#### **4.5.4. Quantificação do fragmento purificado**

Após a purificação, a concentração de DNA foi obtida usando o espectrofotômetro super sensível Nanodrop ND1000 (Thermo Scientific, USA).

#### **4.5.5. Vetor de clonagem pGEM-T Easy**

O vetor utilizado para a confecção das bibliotecas foi o vetor de clonagem em *E. coli* pGEM-T Easy Vector System I (Promega), cujas características e estruturas principais encontram-se expostas na Figura 1. Esse vetor é linearizado no sítio *Eco* RV e duas timinas são adicionadas na terminação 3' das duas extremidades. Tal procedimento aumenta a eficiência de ligação a produtos de PCR, principalmente quando se utiliza certas polimerases termoestáveis, como a Taq DNA Polimerase Recombinante, que adiciona adenina na terminação 3' em parte significativa dos produtos de PCR.

O vetor de clonagem pGEM-T Easy possui a marca de seleção *AMP* (ampicilina) e a expressão do DNA está sob controle do promotor induzível T7.

### C. pGEM®-T Easy Vector Map and Sequence Reference Points

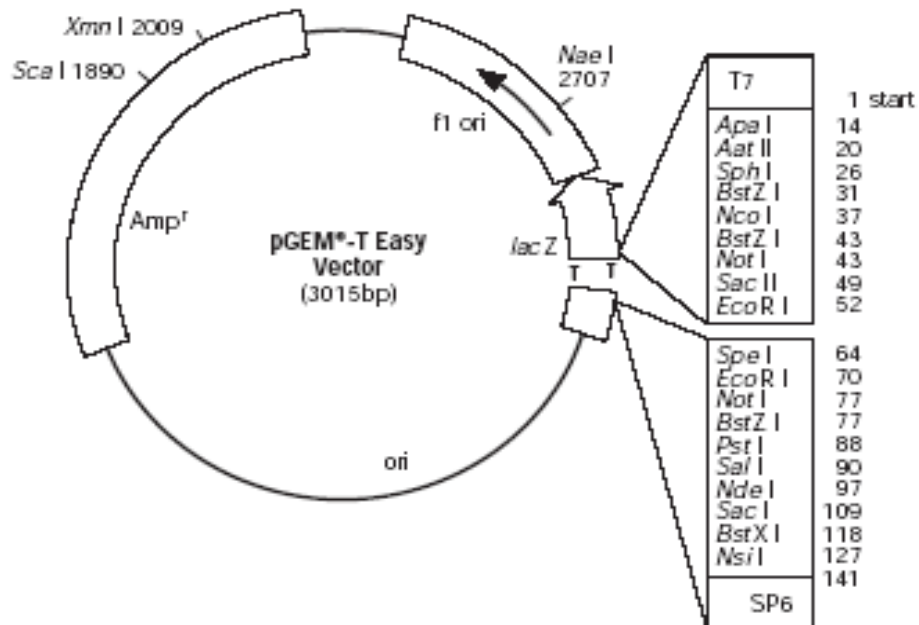


Figura 1. Mapa físico do vetor de clonagem em *E. coli* pGEM-T Easy (Promega)

#### 4.5.6. Reação de ligação com o vetor de clonagem pGEM-T Easy

A clonagem dos fragmentos com o vetor de clonagem pGEM-T Easy Vector Systems e as reações foram executadas conforme indicação do kit. A quantificação das amostras de DNA extraídas dos géis de agarose com o kit Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas Cat # K0513) foi realizada no NanoDrop. As concentrações de DNA nas amostras foram de 60 ng/μL na D.O. 260/280. As concentrações de DNA e vetor a serem utilizadas na reação de ligação foram determinadas com o objetivo de se obter, ao final, uma relação inserto: vetor de 3:1 com base na fórmula descrita abaixo:

$$\frac{\text{ng do vetor} \times \text{kb do inserto}}{\text{kb do vetor}} \times \text{Relação Inserto : vetor} = \text{ng do inserto}$$

A reação de ligação do DNA de interesse com o vetor, de volume final 10  $\mu$ L, consistiu de 3  $\mu$ L de inserto (60 ng DNA amostra), 5  $\mu$ L de tampão da enzima, 1  $\mu$ L do vetor pGEM-T Easy, 1  $\mu$ L da enzima T4 Ligase e água deionizada q.s.p. As soluções foram misturadas e incubadas a 4°C durante a noite para obtenção do número máximo de transformantes.

#### **4.5.7. Transformação das células competentes de *Escherichia coli* One Shot Match 1™ T1<sup>R</sup>**

Os produtos das ligações descritas anteriormente foram utilizados para transformar células competentes *E. coli* One Shot Match 1™ T1<sup>R</sup> Chemically Competent Cells (Invitrogen Cat # C8620-03) ( $10^9 - 10^{10}$  cfu/ng de DNA). O mesmo procedimento foi realizado para os diferentes vetores. Em gelo, 10  $\mu$ L, ou seja, o volume total da ligação do pGEM, descrita anteriormente, foi misturada a 50  $\mu$ L de células competentes One Shot Match 1™ T1<sup>R</sup> ( $10^9 - 10^{10}$  cfu/ng de DNA). A mistura foi mantida em gelo por 30 minutos e, em seguida, foi efetuado o choque térmico das células em banho de água, a 42°C, por 2 minutos. Foram adicionados, então, 250  $\mu$ L de meio Luria Bertani (LB) (1 g de Triptona; 0,5 g de Extrato de Levedura; 1,0 g de NaCl; água destilada q.s.p. 100 mL) às células, as quais foram incubadas por uma hora a 37°C, com agitação de 100 rpm. A solução de células transformadas foi plaqueada em meio LB sólido (1 g de Triptona; 0,5 g de Extrato de Levedura; 1,0 g de NaCl; 1,2 g de Agar; água destilada q.s.p. 100 mL) com 100  $\mu$ g/mL de ampicilina para o vetor pGEM. As placas para o vetor pGEM foram preparadas com 0,026% X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside) e 0,82 mM IPTG, para a diferenciação dos clones recombinantes, que ficam brancos, diferente dos clones sem inserto, que ficam azuis. Após incubação a 37°C por até 24 horas foi realizada a análise de clones transformantes.

#### **4.5.8. Análise e seleção dos clones recombinantes**

As colônias de bactérias contendo o inserto foram transferidas para tubos cônicos para centrífuga de 15 mL, contendo 5 mL de meio líquido LB e 100 µg/mL de ampicilina. Após crescimento a 37<sup>o</sup> C, sob agitação de 250 rpm, por 12 horas, as amostras foram submetidas à extração de DNA plasmidial, conforme descrito no item 3.5.1. O DNA extraído foi analisado através da digestão com a enzima EcoRI, a fim de comprovar a presença ou não do inserto gênico de interesse no vetor de clonagem. Foram utilizados 2 µg de DNA plasmidial de cada clone, 4 U da enzima EcoRI (Fermentas), 2 µL do tampão da enzima e água milli-Q estéril q.s.p. 20 µL. As reações de digestão foram realizadas em banho-maria a 37<sup>o</sup>C por 4 horas. Os produtos das reações de digestão enzimática foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1,0%, e os clones confirmadamente positivos foram novamente crescidos em meio líquido LB contendo 100 µg/mL de ampicilina. Após 12 horas de incubação, foi adicionado glicerol para uma concentração final de 16%, e as células conservadas a -80<sup>o</sup>C. A banda referente ao fragmento de interesse foi purificado utilizando o kit “Silica Bead DNA Gel Extraction Kit” (Fermentas Cat # K0513) e submetido a seqüenciamento no Laboratório de Biologia Molecular do departamento de Tecnologia (FCAV- UNESP). O sequenciamento foi realizado pelo método automatizado, baseado no método da terminação da cadeia por dideoxinucleotídeo (SANGER et al., 1977). Os pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram o “A2b e A2c” para o fragmento purificado da A2 obtido pela PCR e o “A2c e M13” para o DNA plasmidial pGEM T-Easy contendo o fragmento da A2.

O programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) foi utilizado para analisar as sequências de nucleotídeos (BLASTN), objetivando-se procurar e comparar genes similares em banco de dados internacionais (GenBank) com a seqüência obtida.

#### **4.5.9. Digestão e purificação do pGEM-A2 e do vetor de expressão pET 28a**

Um dos clones do pGEM confirmadamente positivo obtido no item anterior (4.9.6.1), contendo o fragmento A2 (pGEM\_A2) com sítios de restrição para as enzimas

*EcoRI* e *NdeI*, foi novamente crescido em meio líquido LB contendo 100 µg/mL de ampicilina. Seu DNA plasmidial foi digerido com a endonuclease *EcoRI* e purificado com o kit Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas Cat # K0513). O produto obtido dessa purificação foi novamente clivado, dessa vez, com as enzimas *EcoRI* e *NdeI* e, então, utilizado nas reações de ligação com o vetor de expressão previamente digerido (*EcoRI* e *NdeI*) e purificado. Foram utilizados 2 µg de DNA plasmidial do clone, 4 U de cada enzima, *EcoRI* e *NdeI* (Fermentas), 2 µL do tampão da enzima e água milli-Q estéril q.s.p. 20 µL. As reações de digestão foram realizadas em banho-maria a 37°C, inicialmente por 12 horas apenas para a enzima *NdeI* e posteriormente, acrescentou-se a enzima *EcoRI*, por mais 4 horas. Os produtos das reações de digestão enzimática foram separados através de eletroforese em gel de agarose 1,0%. A banda de interesse foi então recortada do gel e purificada. Da mesma forma, 3µg de DNA plasmidial do vetor pET 28a, foram submetidos à digestão com as enzimas *EcoRI* e *NdeI*. Após as digestões, amostras dos fragmentos e vetores foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, conforme descrito anteriormente. Os géis foram analisados através de luz UV, e a banda correspondente ao vetor digerido foi removido e o DNA purificado.

Após purificação, fragmento A2 e vetor pET 28a, ambos clivados com as enzimas *EcoRI* e *NdeI*, foram quantificados pelo NanoDrop.

#### **4.5.10. Subclonagem do gene A2 no vetor de expressão pET 28a**

O vetor de expressão de *E. coli* pET 28a (Novagen) possui a marca de seleção KAN e a expressão do DNA está sob o controle do promotor induzível T7, o qual permite a produção da proteína recombinante em altos níveis em meio contendo IPTG (Figura 5). Adicionalmente, este vetor carrega uma cauda poli-histidina na extremidade carboxi terminal (C-terminal) e na extremidade amino terminal (N-terminal), o que permite a produção de proteínas recombinantes fusionadas a seis resíduos de histidina (6XHis), tornando mais fácil a purificação da proteína de fusão recombinante através de técnicas de cromatografia de afinidade com resinas de sepharose combinadas ao níquel.

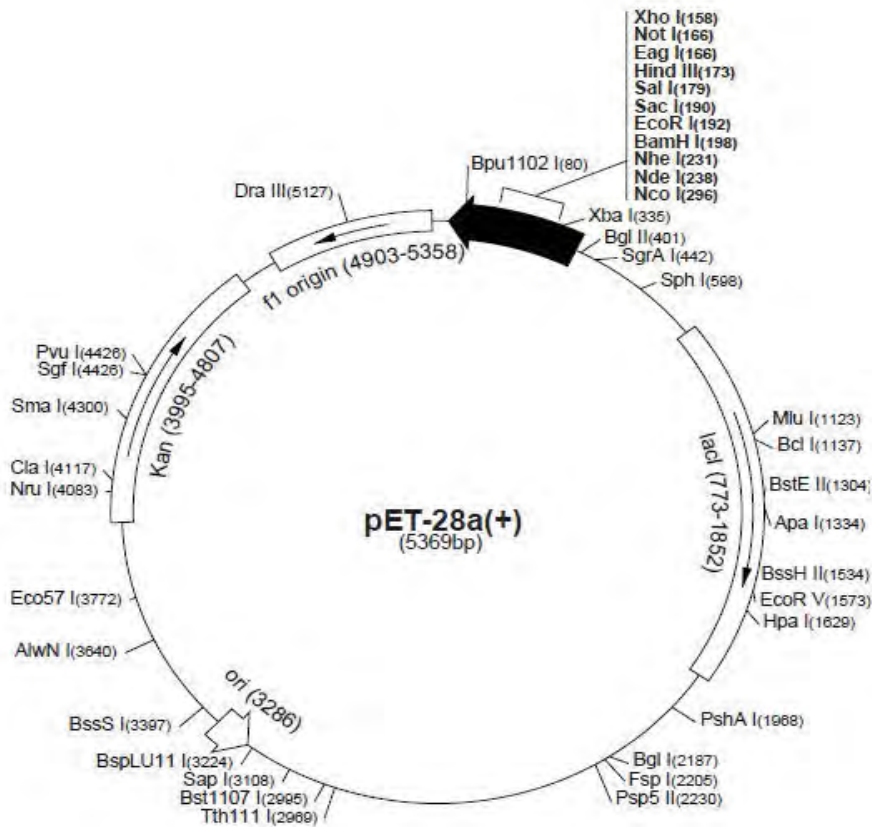


Figura 2. Mapa do vetor de expressão pET-28a (Novagen).

A reação de ligação do fragmento A2 com o vetor pET 28a, de volume final 10  $\mu\text{L}$ , consistiu de 2  $\mu\text{L}$  de inserto (150,0  $\text{ng}/\mu\text{L}$  DNA amostra), 1  $\mu\text{L}$  de tampão da enzima, 3  $\mu\text{L}$  do vetor pET28a (50,0  $\text{ng}/\mu\text{L}$  DNA amostra), 1  $\mu\text{L}$  da enzima T4 Ligase (Promega) e água deionizada q.s.p. As soluções foram misturadas e incubadas a 4°C durante a noite. Em seguida, os produtos resultantes das reações de ligação foram utilizados para transformar células competentes de *E. coli* One Shot Match 1<sup>TM</sup> T1<sup>R</sup>, conforme descrito no item 4.9.6, para manutenção. Porém, dessa vez, as placas de meio LB, continham 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de canamicina e, não foram adicionadas de X-gal/IPTG. A relação vetor:fragmento utilizada foi de 1:2. No entanto, para expressão da proteína, o DNA plasmidial foi extraído dessas células de clonagem e manutenção, pelo método da Lise

Alcalina e novamente transformadas, dessa vez em células próprias de expressão, conforme descrito abaixo.

#### **4.5.11. Transformação das diferentes células competentes de *Escherichia coli*: BL21 (DE3), ER 2566 e Rosetta**

Os produtos das ligações descritas anteriormente foram utilizados para transformar três diferentes células de expressão competentes de *E. coli*, são elas: BL21 (DE3), ER 2566 e Rosetta. Em gelo, 10 µL, ou seja, o volume total da ligação do pET 28a\_A2, descrita anteriormente, foi misturada a 50 µL de cada célula competente (BL21 (DE3), ER 2566 e Rosetta). A mistura foi mantida em gelo por 30 minutos e, em seguida, foi efetuado o choque térmico das células em banho de água, a 42º C, por 2 minutos. Foram adicionados, então, 250 µL de meio Luria Bertani (LB) (1 g de Triptona; 0,5 g de Extrato de Levedura; 1,0 g de NaCl; água destilada q.s.p. 100 mL) às células, as quais foram incubadas por uma hora a 37º C, com agitação de 100 rpm. A solução de células transformadas foi plaqueada em meio LB sólido (1 g de Triptona; 0,5 g de Extrato de Levedura; 1,0 g de NaCl; 1,2 g de Agar; água destilada q.s.p. 100 mL) com 50 µg/mL de canamicina para o vetor pET 28a. Após incubação a 37º C por até 24 horas foi realizada a análise de clones transformantes.

#### **4.5.12. Análise e seleção dos clones recombinantes**

As colônias resultantes do plaqueamento foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio LB adicionado de 50 µg/mL de canamicina, e crescidas a 37º C, sob agitação de 250 rpm, por 12 horas.

Em seguida, as amostras celulares foram submetidas a uma miniextração de DNA plasmidial, conforme procedimento descrito no item 3.5.1. Os DNAs extraídos foram analisados por PCR utilizando o par de primers citado abaixo, afim de comprovar a presença ou não do inserto gênico de interesse no vetor de expressão.

- A2b reverse (5' – AGAATTCTTAAGACACCGGAGAAACGTC – 3')
- T7 promoter (5' – TAATACGACTCACTATAGGG – 3')

O protocolo utilizado foi conforme descrito no item 3.5.2, porém, com temperatura de anelamento de 53°C. Os clones confirmadamente positivos foram novamente crescidos em meio LB contendo 50 µg/mL de canamicina, conservados a -80°C, tornando as soluções 16% em glicerol. Alguns desses clones positivos extraídos pelo método da lise alcalina, assim como o fragmento A2 purificado obtido pela PCR utilizando os pares de primers citados acima, ainda foram submetidos ao sequenciamento. A banda referente ao fragmento de interesse foi purificado utilizando o kit “Silica Bead DNA Gel Extraction Kit” (Fermentas Cat # K0513) e sequenciado. O sequenciamento foi realizado pelo método automatizado, baseado no método da terminação da cadeia por dideoxinucleotídeo (SANGER et al., 1977). Os pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram o “A2b e A2c” para o fragmento purificado da A2 obtido pela PCR e o “A2b e T7 promoter” para o DNA plasmidial pET-28a contendo o fragmento da A2.

O programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) foi utilizado para analisar as sequências de nucleotídeos (BLASTN), objetivando-se procurar e comparar genes similares em banco de dados internacionais (GenBank) com a seqüência obtida.

#### **4.5.13. Produção de His6\_A2 em pequena escala**

As construções plasmidiais pET 28a\_A2 apresentando fase de leitura correto foram escolhidas para transformar três diferentes células competentes de *E. coli*: BL21(DE3), Rosetta e ER2566. Após a transformação, as bactérias foram plaqueadas em meio LB contendo 50 µg/mL de canamicina (e, 34 µg/mL de cloranfenicol apenas para a Rosetta) e incubadas por aproximadamente 12 horas a 37°C. As colônias isoladas foram analisadas para a produção da proteína recombinante. Para tal, aproximadamente 5 colônias de cada amostra diferente de *E. coli* foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo o antibiótico canamicina (e, cloranfenicol apenas para a



Rosetta). A mistura foi incubada a 37°C sob agitação de 250 rpm, durante 12 horas. Um mililitro deste inóculo foi adicionado a 50 mL de meio líquido LB contendo os antibióticos indicados, e novamente incubados nas mesmas condições. No momento em que a densidade óptica atingiu leitura de 0,6-0,8 a um comprimento de onda de 600nm, 500 µL de cada cultura foi colhido como controle da indução e ao volume restante foi adicionado IPTG nas concentrações 0,2, 0,5 e 1,0 mM. As culturas foram incubadas por 3, 6 e 16 horas a 37°C. Amostras do extrato bruto de bactérias foram colhidas após a incubação para posteriormente, serem analisadas pela eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). O gel foi corado com *Comassie Brilliant Blue R-250*.

#### **4.5.14. Produção de His6\_A2 em grande escala**

As construções plasmidiais pET 28a\_A2 que produziram a proteína recombinante em pequena escala foram utilizadas para a produção da proteína em larga escala. Após a transformação, as bactérias foram plaqueadas em meio LB contendo 50µg/mL de canamicina (e, 34µg/mL de cloranfenicol apenas para Rosetta) e incubadas por aproximadamente 12 horas a 37°C. Após a incubação, a colônia selecionada de cada amostra diferente de *E. coli* foi inoculada em 50 mL de meio LB contendo os antibióticos canamicina (e, cloranfenicol apenas para Rosetta). A mistura foi incubada a 37°C sob agitação de 250 rpm, durante 12 horas. Dez mililitros deste inóculo foram adicionados a 500 mL de meio líquido LB contendo os antibióticos indicados, e novamente incubados nas mesmas condições. No momento em que a densidade óptica atingiu leitura de 0,6-0,8 a um comprimento de onda de 600nm, 500 µL de cada cultura foi colhido como controle da indução e ao volume restante foi adicionado IPTG na concentração de 0,5 mM. As culturas foram incubadas por 3 horas a 37°C. Amostras do extrato bruto de bactérias foram colhidas após a incubação para posteriormente, serem analisadas pela eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). O volume restante de cada cultura foi centrifugado a 2.739xg (Sorvall Legend Mach 1.6R), a 4°C durante 10 minutos e o pellet de células foi ressuscitado em Tampão (20 Mm Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 7,4).

A lise celular foi realizada em sonicador de células (Branson Sonifier 250), com potência de 100%, com 3 pulsos de 20 segundos a cada 15 segundos por quatro vezes. O lisado celular foi centrifugado a 24.652xg durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi purificado por cromatografia de afinidade para obtenção da proteína recombinante.

#### **4.5.15. Purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade**

O sobrenadante obtido após lise celular foi aplicado a uma coluna de cromatografia de afinidade para purificação da proteína recombinante His Grav Trap (GE Healthcare). A purificação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. Após a purificação, as alíquotas contendo a proteína recombinante foram armazenadas a -20° C para posterior utilização nos ensaios de ELISA e Western-blotting.

#### **4.6. Imunização de camundongos**

A imunogenicidade da proteína His6\_A2, foi verificada imunizando-se camundongos BALB/c, com aproximadamente seis semanas de idade, com 10 µg de proteína (MACHADO et al., 1994). Os camundongos foram divididos em quatro grupos de três animais cada. O grupo I correspondeu aos animais imunizados com a proteína expressa pela BL 21 (DE3) após três horas de indução; o grupo II correspondeu aos animais imunizados com a proteína expressa pela ER 2566 após três horas de indução; o grupo III correspondeu aos animais imunizados com a proteína expressa pela BL 21 (DE3) após 12 horas de indução; e, o grupo IV correspondeu aos animais imunizados com a proteína expressa pela Rosetta após três horas de indução. As proteínas foram emulsionadas em adjuvante completo de Freund (Sigma) e inoculadas por via intramuscular no quadríceps. Duas outras imunizações, no 14<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> dia após a inoculação, foram realizadas utilizando-se adjuvante incompleto de Freund (Sigma). Os camundongos controle não receberam nenhuma inoculação. Amostras de sangue foram coletadas, por punção intracardíaca, no 10<sup>o</sup> dia após a última imunização e os soros

obtidos foram armazenados a -20° C até serem avaliados pelo Dot-ELISA e Western-blotting.

#### **4.7. Análise da proteína His6\_A2 em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

As amostras da proteína recombinante His6\_A2 foram analisadas pela eletroforese em gel de poliacrilamida, sob condições desnaturantes, de acordo com técnica preconizada por Laemmli (1970). Para tal análise, amostras foram obtidas das culturas de *E. coli* transformadas com as construções plasmidiais pET 28a\_A2 antes e após a indução. Baseado no volume das amostras foi adicionado tampão da amostra 5x concentrado (250mM Tris-HCl pH 6,8, 40% glicerol, 8% SDS, 20% β-mercaptoetanol e 0,008% de azul de bromofenol). As amostras foram homogeneizadas, incubadas por 5 minutos a 100°C e aplicadas no gel. A quantificação das amostras foi realizada utilizando o kit de reagentes BCA (BCA Reagents Kit – Pierce Chemical Company).

O gel de separação foi preparado na concentração de 12% de poliacrilamida em tampão (1,875 M Tris, pH 8,8 e 1% SDS) e de 5% de poliacrilamida para o gel de empacotamento em tampão (1,875 M Tris, pH 6,8 e 0,5% SDS). A eletroforese foi realizada em tampão de corrida Tris-Glicina (50 mM Tris, pH 8,6, 1,92 M glicina e 1% SDS), a 100V por até 3 horas e 30 minutos à 0°C, no sistema Mini-Protean II (Bio-Rad).

Após a eletroforese, os géis foram transferidos para uma cuba contendo solução de Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,05% de Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% de metanol e 10% de ácido acético) e deixados sob baixa agitação por até 16 horas. A descoloração dos géis foi realizada com solução descolorante (30% de metanol e 7% de ácido acético) sob baixa agitação por aproximadamente 5 minutos. Os géis foram conservados em água destilada.

O peso molecular da proteína His6\_A2 foi estimado com base na sequência de aminoácidos obtida da amostra Jaboticabal, levando-se em consideração as clivagens com as enzimas de restrição.

#### **4.8. Reatividade da proteína His6-A2 pelo Western-blotting**

Amostras do extrato bruto de bactérias após a indução, assim como a proteína A2 purificada, foram analisados pelo Western-blotting (TOWBIN et al., 1979). As incubações foram realizadas utilizando anticorpo monoclonal Anti-PoliHistidina (Sigma, Cat # H1029) e anticorpo policlonal anti-*L. chagasi*, de cão com diagnóstico parasitológico positivo para *L. chagasi*.

As proteínas separadas no gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), descrito no item 4.12, foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (Sigma), previamente incubada em tampão de transferência gelado (0,58% Tris Base pH 8,3, 20% metanol e 0,29% glicina). Para tanto, a membrana foi colocada no sistema de eletrotransferência “Mini Trans-Blot” (Bio-Rad) contendo o mesmo tampão e a transferência foi realizada a 100V durante 60 minutos. A transferência foi visibilizada na membrana de nitrocelulose pela coloração com solução de “Ponceau-S” (0,1% Ponceau-S e 10% ácido acético) por 3 minutos e descorada em água destilada.

A membrana de nitrocelulose foi incubada em TBS-Tween (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20) acrescido de 5% de leite em pó desnatado por 12 horas, à 4°C, sob baixa agitação, para saturação de sítios de ligação inespecíficos. A membrana foi então incubada com soro contendo anticorpo monoclonal anti-His diluído 1: 3.000 em TBS-Tween e 5% leite em pó ou incubada com soro contendo anticorpos anti-*L. chagasi* diluído 1: 50, durante 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação lenta. Em seguida, foi submetida a três lavagens consecutivas de 10 minutos com a mesma solução, sob agitação lenta.

Para a detecção do complexo antígeno-anticorpo, a membrana foi incubada em conjugado anti- camundongo acoplado à fosfatase alcalina (IgG de cabra anti-IgG de camundongo, Sigma A-3562) diluído 1: 30.000 em TBS-Tween ou conjugado anti-canino acoplado a fosfatase alcalina (Ig de coelho anti IgG de cão, Sigma A-0793), diluído 1: 4.000 em TBS-Tween. A membrana foi submetida a três lavagens, conforme descrito anteriormente, e a revelação se deu pela adição do substrato da enzima BCIP-NBT, utilizando-se o kit “Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate” (Bio-Rad, Cat # 170-6432), de acordo com as instruções do fabricante.

#### **4.9. Análise da imunogenicidade de His6-A2 por Dot-ELISA e Western-blotting**

A proteína recombinante His6-A2 foi utilizada como antígeno na técnica de Dot-ELISA, afim de verificar a sua capacidade de reagir com anticorpos específicos presentes no soro dos camundongos BALB/c imunizados, assim como no soro de alguns cães infectados. A técnica foi realizada conforme descrito por Machado et al. (1994), com pequenas modificações. Resumidamente, pequenos discos de nitrocelulose foram cortados (0,45  $\mu\text{m}$ ), e, cada disco disposto em uma cavidade de uma placa de cultura, de fundo chato. Foram depositados sobre cada um dos 48 discos, 2  $\mu\text{g}$  da proteína His6-A2. Os discos foram secos à temperatura ambiente e, em seguida, bloqueados por 12 horas a 4°C com 300  $\mu\text{L}$  de tampão TBS (Tris 0,1M, NaCl 0,1M e 0,5% de Tween 20; TBS-Tween 20), acrescido de 5% de leite em pó desnatado. Os soros testes foram diluídos 1:50 em TBS-Tween 20, contendo 5% de leite em pó desnatado e incubados durante 120 minutos em temperatura ambiente e sob agitação constante. Em seguida, os discos foram submetidos a duas lavagens com TBS-Tween 20 acrescidos de 5% de leite em pó desnatado e uma lavagem com TBS-Tween 20 (intervalo de 5 minutos entre cada lavagem). À cada disco com soro de camundongos foi adicionado o conjugado anti-camundongo acoplado à fosfatase alcalina (IgG de caprino anti IgG de camundongo, Sigma A-3562) diluído 1: 30.000 em TBS-Tween 20, acrescido de 5% de leite em pó desnatado. Quanto aos discos com soros caninos, o conjugado utilizado foi o anti-cão acoplado à fosfatase alcalina (Ig de coelho anti-IgG de cão, Sigma A-0793), diluído 1:4.000 em PBS-Tween 20, acrescido de 5% de leite em pó desnatado. Após uma hora de incubação com os devidos conjugados, seguiram-se as lavagens, tal como na etapa anterior. A reação foi revelada pela adição do substrato da enzima 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato e cloreto azul nitroetanólico, utilizando-se o *kit Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate* (Bio-Rad), de acordo com as especificações do fabricante.

O Western-blotting utilizado para analisar o soro dos camundongos foi o mesmo descrito no item 4.11.

#### **4.10. ELISA indireto com o antígeno recombinante A2**

O teste de ELISA indireto utilizando a proteína recombinante A2 foi realizado conforme técnica anteriormente descrita para o ensaio utilizando-se o antígeno solúvel total de *L. chagasi* (item 3.3.2.).

##### **4.10.1. Preparo do antígeno recombinante**

A proteína His6\_A2 foi produzida conforme descrito anteriormente e quantificada pelo método do ácido bicinônico, utilizando-se o *kit* de reagentes BCA, de acordo com as recomendações do fabricante.

##### **4.10.2. Dose de reatividade ótima de antígeno, soro e conjugado**

As diluições ótimas do antígeno e dos soros-controle positivos e negativos foram determinadas por titulação em bloco, utilizando-se o antígeno His6\_A2 nas concentrações de 2,5; 5; 10; 20; 40 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato de sódio (0,05 M pH 9,6), e os soros de referência positivos e negativos nas diluições de 1:50; 1:100; 1:200; 1:400 em tampão PBS 0,01M pH 7,4 contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-Tween 20), e tampão PBS 0,01M pH 7,4 contendo 0,05% de Tween-80 (PBS-Tween 80) em acrescido de 2%, 3% e 5% de leite em pó desnatado, em cada. O conjugado canino acoplado à fosfatase alcalina (IgG de coelho anti IgG de cão, Sigma-A0793) foi diluído 1:4.000 em tampão PBS-Tween 20/80, contendo 2%, 3% e 5% de leite em pó desnatado.

Foram utilizados, como soros de referência positivos e negativos, soros de cães conforme descrito no item 4.1.

#### **4.10.3. Tratamento dos dados**

O ponto de corte do teste de ELISA correspondeu a duas vezes e meia o valor médio das densidades ópticas dos soros de referência negativos, conforme descrito por Oliveira et al. (2008).

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)**

**5.1.1. RIFI dos animais soropositivos, soronegativos para *Leishmania* sp e dos soros dos animais vacinados**

Os animais testados (n=27) dos animais naturalmente infectados (grupo B) foram positivos para *Leishmania* sp pela RIFI com antígeno total de promastigotas de *L. chagasi*. O título de anticorpos desses animais variou de 1: 40 a 1: 40.960.

Dentre os 30 soros de cães vacinados com a vacina Leishmune® (grupo C), apenas dois cães apresentaram reação positiva na diluição de 1:40. Os demais soros apresentaram uma reação de fundo difusa, não contornando todo o parasito, considerados negativos.

## **5.2. ELISA indireto com antígeno solúvel total**

### **5.2.1. ELISA dos animais com diagnóstico sorológico positivo para *Leishmania* sp**

Níveis de anticorpos anti-*Leishmania* sp de valor diagnóstico ( $NE_{\geq 3}$ ) foram detectados na totalidade dos soros analisados, obtendo-se índice de positividade de 100% (Grupo B, n=27). Os níveis de ELISA variaram de três a nove (OLIVEIRA et al. 2008).

A correlação entre RIFI e ELISA foi de 100%, demonstrando haver uma boa concordância entre os resultados obtidos entre os dois testes, quando analisados os resultados de co-positividade e co-negatividade.

### **5.2.2. ELISA dos animais vacinados**

Dentre 30 amostras de soros de cães vacinados com a vacina Leishmune®, apenas cinco apresentaram reação positiva, próxima ao ponto de corte. Desses cinco, dois também foram positivos pela RIFI na titulação de 1: 40 (OLIVEIRA et al. 2008).

### **5.2.3. ELISA dos animais soronegativos**



Todos os soros de áreas-não endêmicas, ou seja, os controles negativos, foram negativos também no teste de ELISA (OLIVEIRA et al. 2008).

### 5.3. Produção do antígeno recombinante A2

#### 5.3.1. Amplificação do gene A2 de *L. chagasi* pela PCR

A amplificação do DNA do gene A2 no vetor pGEM-T Easy, a partir do par de oligonucleotídeos A2b e A2c, mostrou o produto de 300 pares de bases, conforme visualizado na figura 3 abaixo.

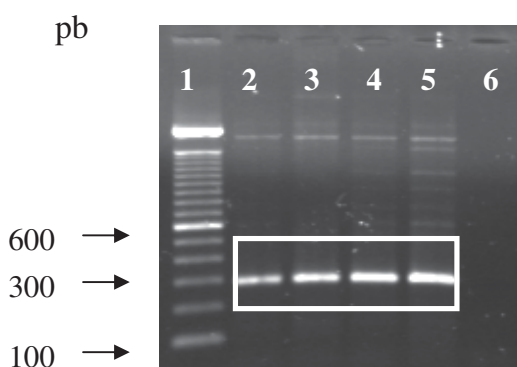


Figura 3. Fragmentos obtidos pela PCR, utilizando-se o par de oligonucleotídeos A2b e A2c. Linha 1: padrão 100pb (Invitrogen®). Linhas de 2 a 5: Reação dos primers A2b e A2c com o clone recombinante no vetor pGEM-T Easy (a região marcada corresponde à região extraída do gel para clonagem). Linha 6: Controle negativo.

#### 5.3.2. Reação de ligação com o vetor de clonagem pGEM-T Easy

Após o crescimento das colônias no meio sólido, os clones recombinantes foram selecionados. As colônias brancas indicavam clones recombinantes, enquanto colônias azuis representavam clones negativos. As colônias positivas, após prévia análise por enzimas de restrição utilizando a *EcoRI* e a *NdeI* (Fig.4), foram submetidas ao sequenciamento.

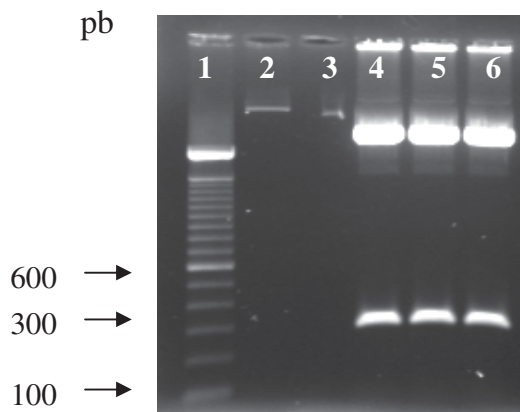


Figura 4. Fragmentos obtidos pela clivagem do vetor pGEM após reação de ligação com o fragmento A2 obtido da PCR com os primers A2b e A2c, utilizando-se as endonucleases *EcoRI* e *NdeI*. Linha 1: padrão 100pb (Invitrogen®). Linhas 2 e 3: Controles negativos. Linhas de 4 a 6: DNA plasmidial extraído de diferentes colônias de bactérias para clivagem utilizando as enzimas de restrição para simples conferência de que o fragmento encontrava-se no vetor.

### 5.3.3. Sequenciamento e análise dos clones recombinantes

Os clones obtidos (pGEM\_A2) apresentaram homologia com o gene A2 descrito por Charest & Matlashewski (1994) e os alelos descritos por Garin et al. (2005), conforme análise pelo programa computacional BLASTn (sequência de nucleotídeos) (Anexo 1).

### 5.3.4. Reação de ligação com o vetor de clonagem e expressão pET-28a (Novagen)

Um dos clones positivos (pGEM\_A2), obtidos conforme descrito no item 5.3.2, submetido a uma digestão, inicialmente, com a enzima *EcoRI*, gerou um fragmento de aproximadamente 300 pb, o qual foi purificado e, novamente clivado, dessa vez, com ambas as enzimas, *EcoRI* e *NdeI*. O resultado dessa segunda digestão foi utilizado

para ligar o fragmento ao vetor pET-28a, também este previamente digerido com as enzimas *EcoRI* e *NdeI*. Após transformação, colônias que cresceram no meio sólido LB contendo canamicina, foram selecionadas e a PCR amplificou o gene presente nos clones. Na figura 5, é possível verificar colônias de células One Shot Match positivas, as quais apresentaram amplificação de fragmentos de DNA dos clones submetidos a um PCR, utilizando os pares de primers A2b e T7 *promoter* que serviram também para a seleção dos clones que apresentaram fase de leitura correta para a expressão da proteína (pET-28a\_A2), assim como colônias negativas (Linhas 7, 8, 9 e 10), em que não houve amplificação de DNA, ou seja, o fragmento A2 não estava inserido dentro do vetor de expressão pET-28a. Na figura 6, verifica-se colônias positivas e negativas das diferentes células de expressão (BL21, ER 2566 e Rosetta), após PCR utilizando o mesmo par de primers citado acima. Os clones obtidos (pET28a\_A2) apresentaram semelhanças com o gene A2 descrito por Charest & Matlashewski (1994) e os alelos descritos por Garin et al. (2005), conforme análise pelo programa computacional BLASTn (sequência de nucleotídeos) (Anexo 2).

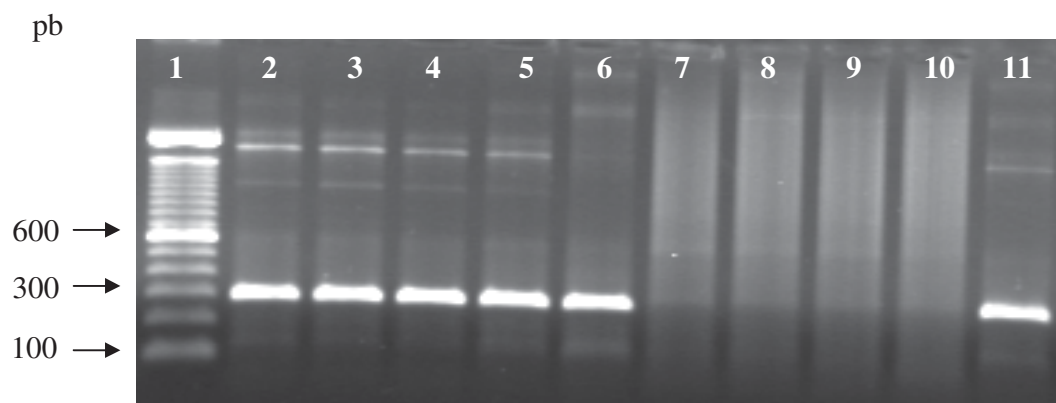


Figura 5. Fragmentos obtidos pela PCR, utilizando-se o par de oligonucleotídeos A2b e T7 promoter. Linha 1: padrão 100pb (Invitrogen®). Linha 2: Colônia 01 da One Shot Match (pET28a\_A2). Linha 3: Colônia 02 da One Shot Match (pET28a\_A2). Linha 4: Colônia 03 da One Shot Match (pET28a\_A2). Linha 5: Colônia 04 da One Shot Match (pET28a\_A2). Linha 6: Colônia 05 da One Shot Match (pET28a\_A2). Linha 7: Colônia 06 da One Shot Match (pET28a\_A2). Linha 8: Colônia 07 da One Shot Match (pET28a\_A2). Linha 9: Colônia 08 da One Shot Match (pET28a\_A2). Linha 10: Colônia 09 da One Shot Match (pET28a\_A2). Linha 11: Colônia 10 da One Shot Match (pET28a\_A2).

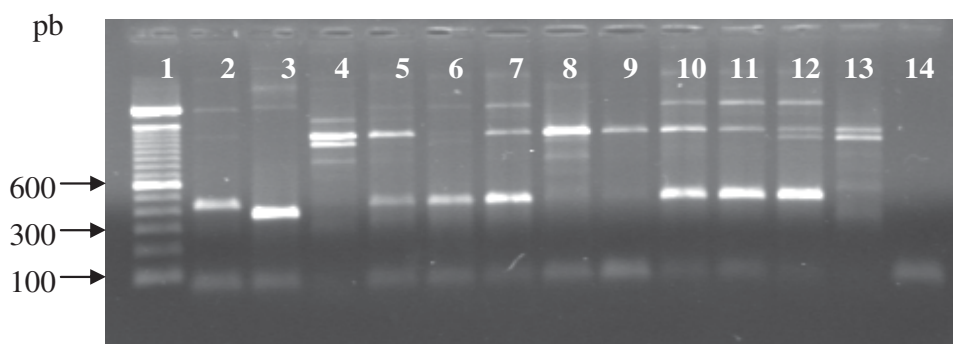


Figura 6. Fragmentos obtidos pela PCR, utilizando-se o par de oligonucleotídeos A2b e T7 promoter. Linha 1: padrão 100pb (Invitrogen®). Linha 2: Colônia 03 da One Shot Match (pET28a\_A2). Linha 3: Colônia 05 da One Shot Match (pGEM\_A2). Linha 4: Colônia 02 da BL21 (pET28a\_A2). Linha 5: Colônia 03 da BL21 (pET28a\_A2). Linha 6: Colônia 04 da BL21 (pET28a\_A2). Linha 7: Colônia 05 da BL21 (pET28a\_A2). Linha 8: Colônia 02 da ER 2566 (pET28a\_A2). Linha 9: Colônia 03 da ER 2566 (pET28a\_A2). Linha 10: Colônia 04 da ER 2566 (pET28a\_A2). Linha 11: Colônia 05 da ER 2566 (pET28a\_A2). Linha 12: Colônia 02 da Rosetta (pET28a\_A2). Linha 13: Colônia 03 da Rosetta (pET28a\_A2). Linha 14: Controle negativo.

### 5.3.5. Análise da produção de His6\_A2 em *E. coli*

Por um teste em pequena escala foi possível verificar a produção da proteína recombinante His6\_A2. A confirmação da produção da proteína His\_A2 pode ser vista em gel SDS-PAGE e Western-blotting (Figuras 7 e 8), usando anticorpo monoclonal Anti-PoliHistidina. A partir da confirmação da expressão da proteína, esta passou a ser produzida em larga escala.

Os resultados da análise por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), demonstraram a presença de uma banda polipeptídica de peso molecular aparente de 11 kDa, juntamente com várias outras frações protéicas da própria *E. coli*. Essa banda de 11 KDa é também observada nas frações coletadas após a indução da expressão e na fração composta apenas pela proteína, após a purificação por cromatografia (Figura 9). Ao utilizar o vetor de expressão pET-28a, devemos lembrar de acrescentar o peso das histidinas, uma vez que as proteínas recombinantes finais estão fusionadas à ela. O procedimento utilizado foi suficiente para a obtenção da proteína recombinante His6\_A2 e permitiu a obtenção de quantidades de proteína de 3mg/mL.

kDa

**A**

**B**

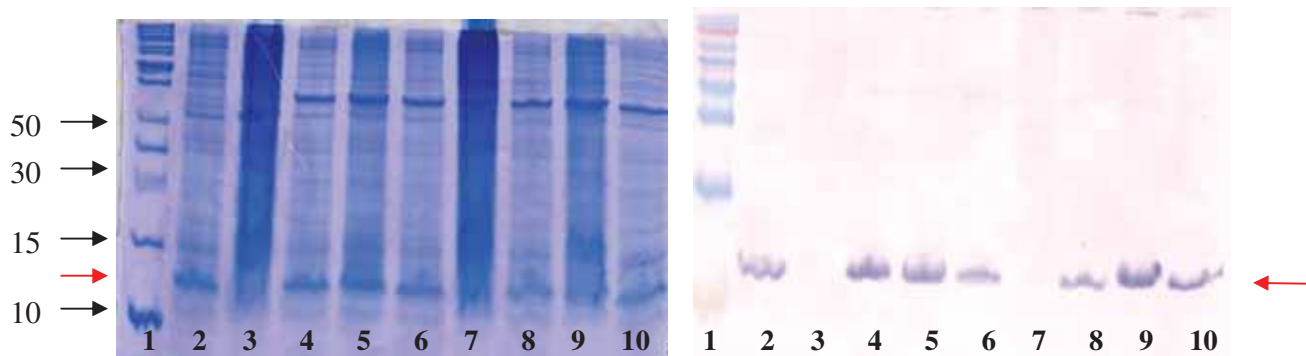


Figura 7. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (A) e Western-blotting (B) da proteína His6\_A2. As amostras correspondem, respectivamente: **Linha 1**, Marcador de peso molecular de proteínas (Fermentas). **Linha 2**: extrato de *E. coli* ER 2566 transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 3 horas de adição de IPTG (1,5 mM). **Linha 3**: extrato de *E. coli* ER 2566 transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 3 horas sem adição de IPTG. **Linha 4**: extrato de *E. coli* Rosetta transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 3 horas de adição de IPTG (1,0 mM). **Linha 5**: extrato de *E. coli* Rosetta transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 3 horas de adição de IPTG (0,5 mM). **Linha 6**: extrato de *E. coli* Rosetta transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 3 horas de adição de IPTG (1,5 mM). **Linha 7**: extrato de *E. coli* Rosetta transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 3 horas sem adição de IPTG. **Linha 8**: extrato de *E. coli* BL21 (DE3) transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 3 horas de adição de IPTG (1,0 mM). **Linha 9**: extrato de *E. coli* BL21 (DE3) transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 3 horas de adição de IPTG (0,5 mM). **Linha 10**: extrato de *E. coli* BL21 (DE3) transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 3 horas de adição de IPTG (1,5 mM). O gel SDS foi corado com *Comassie Brilliant Blue R-250* e a membrana de western-blotting foi incubada com anticorpo monoclonal anti-PoliHistidina.

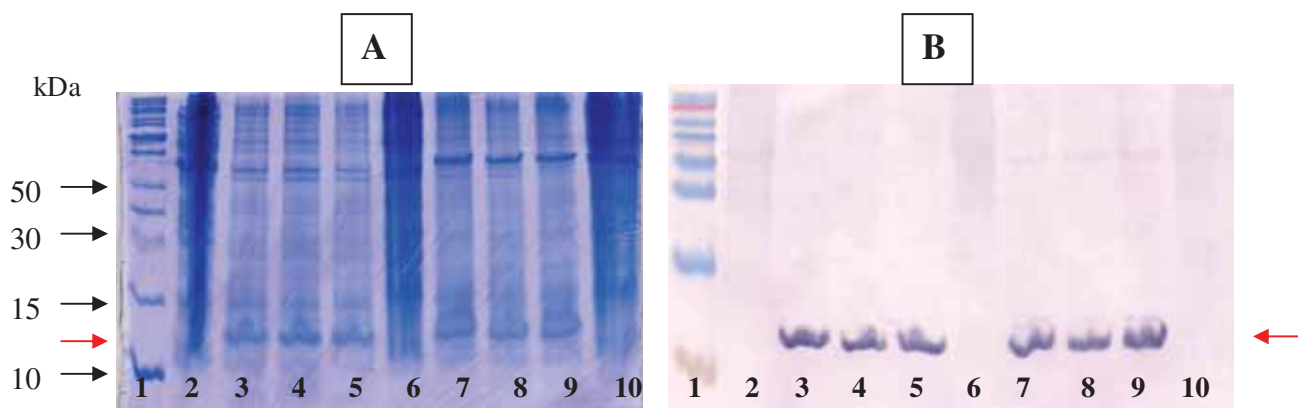


Figura 8. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (A) e Western-blotting (B) da proteína His6\_A2. As amostras correspondem, respectivamente: **Linha 1**, Marcador de peso molecular de proteínas (Fermentas). **Linha 2**: extrato de *E. coli* BL21 (DE3) transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 3 horas sem adição de IPTG. **Linha 3**: extrato de *E. coli* ER 2566 transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 6 horas de adição de IPTG (1,0 mM). **Linha 4**: extrato de *E. coli* ER 2566 transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 6 horas de adição de IPTG (0,5 mM). **Linha 5**: extrato de *E. coli* ER 2566 transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 6 horas de adição de IPTG (1,5 mM). **Linha 6**: extrato de *E. coli* ER 2566 transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 6 horas sem adição de IPTG. **Linha 7**: extrato de *E. coli* Rosetta transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 6 horas de adição de IPTG (1,0 mM). **Linha 8**: extrato de *E. coli* Rosetta transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 6 horas de adição de IPTG (0,5 mM). **Linha 9**: extrato de *E. coli* Rosetta transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 6 horas de adição de IPTG (1,5 mM). **Linha 10**: extrato de *E. coli* Rosetta transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 6 horas sem adição de IPTG. O gel SDS foi corado com *Comassie Brilliant Blue R-250* e a membrana de western-blotting foi incubada com anticorpo monoclonal anti-PoliHistidina.

### 5.3.6. Análise da proteína recombinante His6\_A2 por Western-blotting

Após o processo de purificação, descrito no item 4.5.15., a proteína recombinante His6\_A2 foi quantificada e analisada através de Western-blotting, utilizando anticorpo monoclonal Anti-PoliHistidina e anticorpo policlonal anti-*L. chagasi*, de cão com diagnóstico parasitológico positivo para *L. chagasi*.

Na Figura 9, está representado o resultado da análise da proteína His6\_A2 após a purificação da mesma. Observou-se que o anticorpo monoclonal para detecção de histidina permitiu a evidenciação de uma banda de aproximadamente 11 kDa, referente à proteína de interesse His6\_A2.

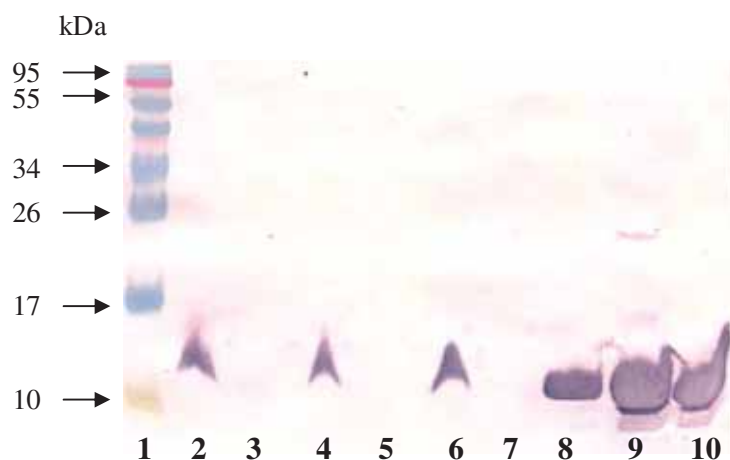


Figura 9. Banda protéica correspondente à proteína recombinante His6-A2 em membrana de nitrocelulose incubada com anticorpo monoclonal Anti-His pelo Western-blotting. As amostras correspondem, respectivamente: **Linha 1:** Marcador de peso molecular de proteínas (Fermentas). **Linha 2:** extrato de *E. coli* BL21 (DE3) transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 3 horas de indução com IPTG (0,5mM). **Linha 3:** extrato de *E. coli* BL21 (DE3) transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 3 horas sem adição de IPTG. **Linha 4:** extrato de *E. coli* ER 2566 transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 6 horas de indução com IPTG (0,5mM). **Linha 5:** extrato de *E. coli* ER 2566 transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 6 horas sem indução de IPTG. **Linha 6:** extrato de *E. coli* Rosetta transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 6 horas de indução com IPTG (0,5mM). **Linha 7:** extrato de *E. coli* Rosetta transformada com a construção plasmidial pET28a\_A2 após 6 horas sem indução de IPTG. **Linha 8:** proteína A2 purificada obtida da célula BL21 (DE3) após 3 horas de indução com IPTG (0,5mM). **Linha 9:** proteína A2 purificada obtida da célula Rosetta após 6 horas de indução com IPTG (0,5mM). **Linha 10:** proteína A2 purificada obtida da célula ER 2566 após 6 horas de indução com IPTG (0,5mM).

#### 5.4. Imunização de camundongos com His6\_A2

Soros de camundongos imunizados com a proteína recombinante His6\_A2, demonstraram reatividade pelas técnicas de Dot-ELISA (Fig. 10) e Western-blotting (Figs. 11 e 12), quando diluídos 1:50, em ambas as técnicas. Os soros dos animais que não foram imunizados, não apresentaram nenhuma reatividade pelas duas técnicas. Na figura 12, o western apresentou várias bandas além da banda referente à proteína A2. Essas outras bandas são devido à reatividade natural contra proteínas de *E. coli*.



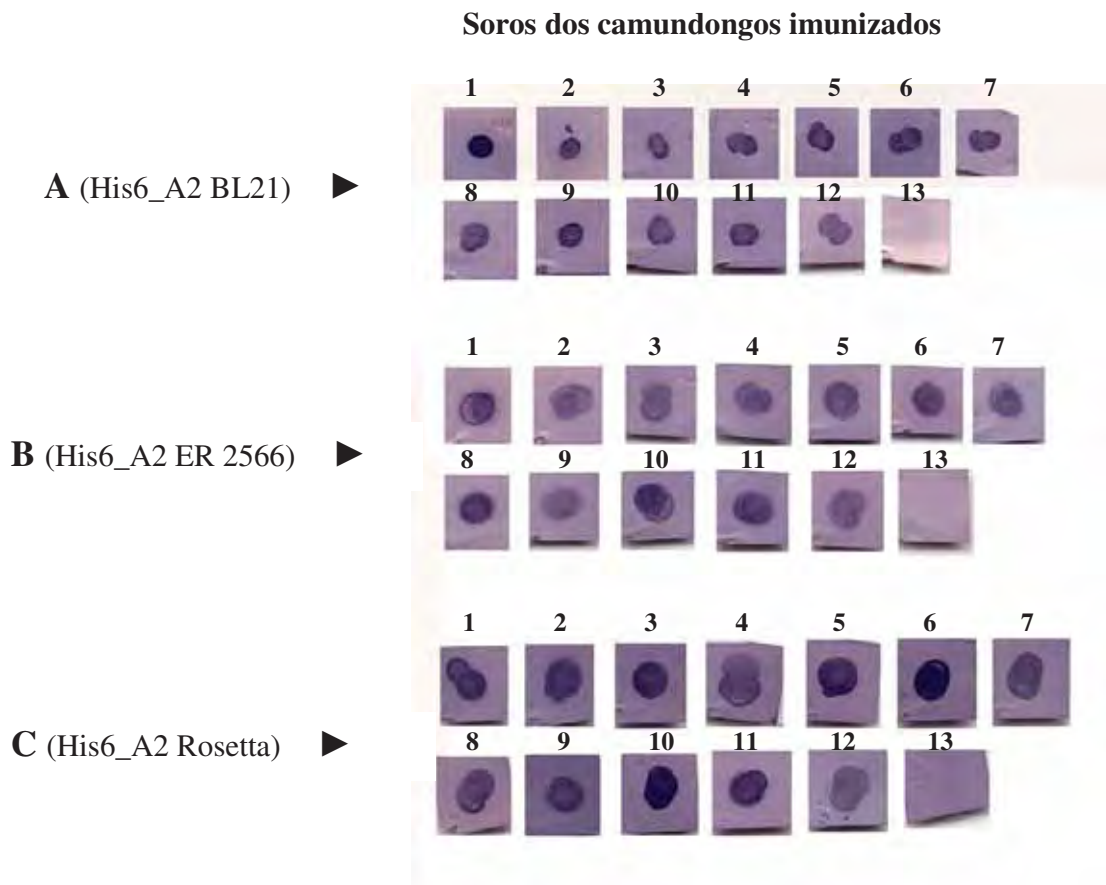


Figura 10. **A:** Reatividade da proteína His6\_A2 purificada expressa pela BL 21 (DE3) no Dot-ELISA com soro de camundongos. **B:** Reatividade da proteína His6\_A2 purificada expressa pela ER 2566 no Dot-ELISA com soro de camundongos. **C:** Reatividade da proteína His6\_A2 purificada expressa pela Rosetta no Dot-ELISA com soro de camundongos. Todos os números **1, 2 e 3:** soros dos camundongos 1, 2 e 3 respectivamente, inoculados com a proteína recombinante obtida da célula BL 21 (DE3), após 3 horas de indução. Todos os números **4, 5 e 6:** soros dos camundongos 4, 5 e 6 respectivamente, inoculados com a proteína recombinante obtida da célula BL 21 (DE3), após 12 horas de indução. Todos os números **7, 8 e 9:** soros dos camundongos 7, 8 e 9 respectivamente, inoculados com a proteína recombinante obtida da célula ER 2566, após 12 horas de indução. Todos os números **10, 11 e 12:** soros dos camundongos 10, 11 e 12 respectivamente, inoculados com a proteína recombinante obtida da célula Rosetta, após 12 horas de indução. Todos os números **13:** soros controles de camundongos não inoculados com a proteína recombinante A2

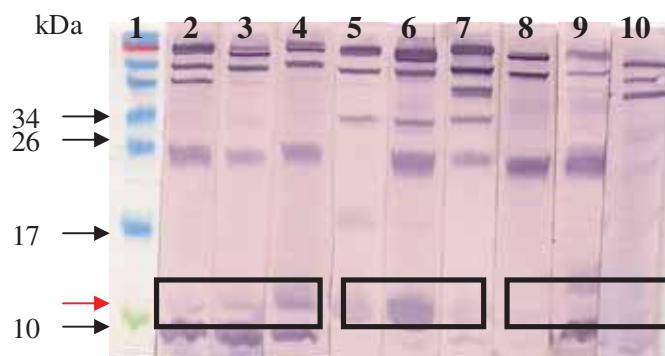


Figura 11. Reatividade da proteína His6\_A2 pelo Western-blotting. **Linha 1:** Marcador de peso molecular de proteínas (Fermentas); **Linhas 2 a 4:** reação dos soros de três camundongos, inoculados com a proteína recombinante obtida da célula BL21 (DE3), após 3 horas de indução, frente à proteína His6\_A2 purificada; **Linha 5 a 7:** reação dos soros de três camundongos, inoculados com a proteína recombinante obtida da célula ER 2566, após 3 horas de indução, frente à proteína His6\_A2 purificada; **Linha 8 a 10:** reação dos soros de três camundongos, inoculados com a proteína recombinante obtida da célula BL21 (DE3), após 12 horas de indução, frente à proteína His6\_A2 purificada.

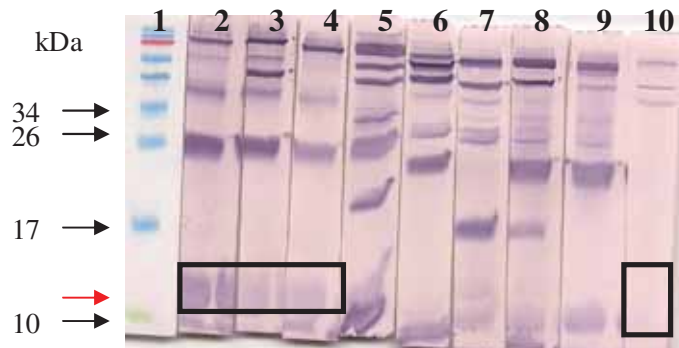


Figura 12. Reatividade da proteína His6\_A2 pelo Western-blotting. **Linha 1:** Marcador de peso molecular de proteínas (Fermentas); **Linhas 2 a 4:** reação dos soros de três camundongos, inoculados com a proteína recombinante obtida da célula Rosetta, após 3 horas de indução, frente à proteína His6\_A2 purificada; **Linha 5 a 6:** reação dos soros de dois camundongos, inoculados com a proteína recombinante obtida da célula BL21 (DE3), após 3 horas de indução, frente à proteína His6\_A2 purificada; **Linha 7:** reação dos soros de um camundongo, inoculado com a proteína recombinante obtida da célula ER 2566, após 3 horas de indução, frente à proteína His6\_A2 purificada; **Linha 8 a 9:** reação dos soros de dois camundongos, inoculados com a proteína recombinante obtida da célula Rosetta, após três horas de indução, frente à proteína His6\_A2 purificada; **Linha 10:** reação do soro de camundongo não inoculado frente à proteína His6\_A2 purificada.

### 5.5. Teste de ELISA indireto com antígeno recombinante His6\_A2

A concentração ótima do antígeno His6\_A2, determinada por titulação em bloco, foi de 20 µg/mL, o bloqueio de leite em pó desnatado foi de 2% e a diluição única de 1:100 para os soros de referência positivos e negativos e o conjugado na diluição de 1:4.000.

O ponto de corte calculado foi 0,355. Das amostras de soros negativos, 65% (n=36) também foram negativos pelo ELISA His-A2 e, das amostras de soros positivas, 52% (n=27) foram positivas pelo ELISA His-A2 e, apenas 33% (n=30) das amostras de soro dos animais vacinados com a Leishmune®, foram positivos pelo ELISA His-A2. As densidades ópticas oriunda da reação antígeno-anticorpo do soro de cada animal foram classificados de 1 a 15 em função dos intervalos de densidade óptica (D.O.), conforme apresentado abaixo, para elaboração do gráfico (Figura 13).

Intervalos de Densidade Óptica	Classificação
0,0-0,2	1
0,21-0,3	2
0,31-0,4	3
0,41-0,5	4
0,51-0,6	5
0,61-0,7	6
0,71-0,8	7
0,81-0,9	8
0,91-1,0	9
1,1-1,2	10
1,21-1,3	11
1,31-1,4	12
1,41-1,5	13
1,51-1,6	14
1,61-1,7	15



## 6. DISCUSSÃO

A produção de antígenos recombinantes por clonagem e expressão de proteínas heterólogas em sistemas procariotos ou eucariotos constitui uma alternativa relevante e efetiva para a preparação de grandes quantidades de antígenos altamente purificados para o uso em testes sorológicos. Essa produção tornou-se uma alternativa também para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Diferentes genes de *Leishmania* estão sendo estudados, não só para um melhor entendimento da biologia desses parasitos, como também para a obtenção de proteínas que possam ser candidatas a vacinas, bem como utilizadas no diagnóstico mais sensível e específico da doença (CARVALHO et al., 2002; COELHO et al., 2003). Proteínas da família A2 de *L. donovani* têm-se mostrado imunogênicas e específicas ao estágio amastigota destes parasitas (CHAREST & MATLASHEWSKI, 1994).

Anticorpos contra a proteína do gene A2 também foram detectados em soros de cães e de humanos infectados com *Leishmania chagasi*. Entretanto, não foram detectados anticorpos contra esta proteína em humanos com a forma cutânea da doença (GHEDIN et al., 1997; CARVALHO et al., 2002). O gene A2 foi identificado em *L. major* como um pseudogene, não sendo expresso nessa espécie, o que sugere o possível envolvimento dos genes A2 no tropismo cutâneo ou visceral das leishmanias (GARIN et al., 2005; McCALL and MATLASHEWSKI, 2010). O trabalho de Carvalho et al. (2002), usando o ELISA-teste com as proteínas recombinantes GST-A2, A2-His ou GST, mostrou que soros de cães negativos tiveram forte reatividade com as proteínas recombinantes GST e GST-A2, e 86% dos soros caninos positivos para LVC, pela RIFI, reagiram com a A2-His. No entanto, nenhum resultado de reatividade dos soros negativos usando o ELISA A2-His foi apresentado. Nossos resultados, entretanto, foram diferentes daqueles mencionados no trabalho citado acima, uma vez que, das amostras de soros negativos, 65% (n=36) também foram negativos pelo ELISA A2-His e das amostras positivas, 52% (n=27) foram positivos pelo ELISA A2-His e, apenas 33% dos soros (n=30) dos animais vacinados com a Leishmune<sup>®</sup> foram positivos pelo ELISA A2-

His. Não obtivemos densidades ópticas (DO) acima de um para os soros de animais vacinados e de áreas não-endêmicas testados, sendo que DOs mais altas encontradas foram próprias dos soros de animais infectados.

Como já mencionado, as proteínas da família A2 são expressas no estágio amastigota do parasita, neste estágio a *Leishmania* está no fagolisossomo do macrófago do hospedeiro vertebrado (CHAREST & MATLASHEWSKI, 1994). Durante a fase aguda da doença, Badaró et al. (1996) sugeriu que o hospedeiro poderia produzir anticorpos específicos, incluindo aqueles anti-A2 e anti-rK39. Com os resultados do presente trabalho, podemos inferir que resultados mais satisfatórios poderão ser alcançados com a proteína A2 para diagnóstico da LVC quando se utilizar um maior número de proteínas desta família e não apenas uma proteína, como também foi sugerido por Ghedin et al. (1997). Além disso, o fato desta proteína isolada não alcançar uma alta sensibilidade diagnóstica poderia estar correlacionado com um estágio específico da doença, sendo uma importante ferramenta para identificá-lo. A alta especificidade do antígeno total solúvel em relação à proteína recombinante é devido ao primeiro possuir um maior espectro de proteínas do parasita das formas promastigotas, tanto de superfície como internas.

Segundo Porrozzi et al. (2007), os testes sorológicos empregando o antígeno recombinante K39 são mais eficientes na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* sp em animais sintomáticos, enquanto os antígenos recombinantes K26 e A2 parecem ser eficientes no diagnóstico sorológico da leishmaniose tanto em cães sintomáticos quanto em cães assintomáticos.

A expressão de proteínas em *E. coli* apresenta um número considerável de vantagens em relação à outros sistemas de clonagem e expressão a partir do gene. São de fácil manipulação, exigem meios relativamente simples e permitem a expressão da proteína rapidamente. Além disso, os processos de extração e purificação da proteína recombinante são menos complexos, o que é relevante quando se visa à produção da proteína em larga escala. E apesar de não permitir modificações pós-traducionais, as proteínas expressas em *E. coli* têm sido utilizadas com êxito nos testes

de diagnóstico para diferentes doenças em medicina veterinária (McBRIDE et al., 1999; HUANG et al., 2006).

É digno de nota que a vacina Leish-Tec<sup>®</sup> utiliza proteína recombinante obtida do gene A2 de *Leishmania donovani* por Charest e Matlashewski (1994), a partir de clone cedido pelos pesquisadores. Pela primeira vez no Brasil, foi isolado (OLIVEIRA et al., 2010) e expresso a proteína de uma amostra de *Leishmania chagasi* que causa LV no Novo Mundo, isolado em Jaboticabal-SP por pesquisadores brasileiros. Este resultado concorda com os resultados de Ghedin et al. (1997), no qual uma análise cariotípica realizada para várias espécies de *Leishmania* mostraram que os genes A2 são regiões conservadas em *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi*, *L. amazonensis* e *L. mexicana*. O locus A2 é constituído de sete genes, os quais diferem em relação ao comprimento das sequências que codificam a unidade peptídica repetitiva (CHAREST et al., 1996, ZHANG et al., 1996). Fato que dificulta o isolamento desses genes por PCR simples.

Sabe-se que as proteínas A2 variam de 45 a 100 kDa em tamanho (ZHANG et al., 1996). Entretanto, o gene isolado por Oliveira et al. (2010) tem 495 pares de base de comprimento. Após uma análise dessa sequência, foi verificada a presença de um “stop códon”. Além disso, a sequência de aminoácidos mostrou ter uma predição a peptídeo sinal, o qual foi excluído da nossa construção afim de se evitar problemas de solubilidade na expressão. No entanto, acreditamos ter obtido resultados importantes de antigenicidade e imunogenicidade, mesmo com um fragmento de proteína de 11 KDa.

Devemos dar continuidade na investigação dessa proteína afim de caracterizá-la melhor. Estimulando-nos ainda para isto, os resultados de imunogenicidade dos camundongos com esta proteína recombinante.

## 7. CONCLUSÕES

- Foi expressa uma proteína recombinante de 11 KDa, com similaridade à família A2, isolada de uma amostra brasileira de *Leishmania chagasi*.
- A proteína His6\_A2 demonstrou ser antigênica e imunogênica, após imunização em camundongos e pela detecção de anticorpos anti-A2 pelas técnicas de Western-blotting e Dot-ELISA.
- O ELISA com o antígeno recombinante His6\_A2 detectou anticorpos anti-A2 em 52% dos cães infectados com *L. chagasi*. Dos soros de animais vacinados, 67% assim como 65% dos animais de áreas-não endêmicas, foram negativos pelo ELISA\_A2.



## 8. REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**, Londres, v. 215, p. 403-410, 1990.

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine Leishmaniasis. **Adv Parasitol**, v.57, p.1-88, 2004.

BADARÒ, R.; D. BENSON, M.C. EULÀLIO, M. FREIRE, S. CUNHA, E.M. NETTO, D. PEDRAL-SAMPAIO, C. MADUREIRA, J.M. BURNS, R.L. HOUGHTON, J.R. DAVID, S.G. REED. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.** 173:758-761, 1996.

BELKAID, Y.; HOFFMANN, K.F.; MENDEZ, S.; KAMHAWI, S.; UDEY, M.C.; WYNN, T.A.; SACKS, D.L. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. **J. Exp. Med.** 194(10):1497-506, Nov 19; 2001.

BORJA-CABRERA, G.P.; CORREIA PONTES, N.N.; Da SILVA, V.O.; PARAGUAI de SOUZA, E.; SANTOS, W.R.; GOMES, E.M. et al. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic área of Brazil (São Gonçalo do Amarante-RN). **Vaccine**, 20, p.3277-3284, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, 120p, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Tópicos de saúde: leishmaniose visceral.** [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=22141](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=22141) (acessado em 01 de março de 2011).

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). **Boletim epidemiológico.** Ano 11, 1999. Edição especial Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/svs/pub/pdfs>>. Acesso em 06 fev. 2004.

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

CASTRO, A.G. **Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral. (Calazar) – Normas Técnicas.** Brasília: Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), 1996. 86p.

CHARREST, H.; MATLASHEWSKI, G. Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, n.5, p. 2975-2984, 1994.

CHARREST, H.; ZHANG, W,W.; MATLASHEWSKI, G. The developmental expression of *Leishmania donovani* A2 amastigote-specific genes is post-transcriptionally mediated and involves elements located in the 3' – untranslated region. **J. Biol. Chem.** 271:17081-17090, 1996.

COELHO, E.A.F.; TAVARES, C.A.P.; CARVALHO, F.A.A.; CHAVES, K.F.; TEIXEIRA, K.N.; RODRIGUES, R.C.; CHAREST, H.; MATLASHEWSKI, G.; GAZZINELLI, R.T.; FERNANDES, A.P. Immune responses induced by the *Leishmania* (*Leishmania*)

*donovani* A2 antigen, but not by the lack antigen, are protective against experimental *Leishmania* (*Leishmania amazonensis*) infection. **Infect. Immun.**, v.71, n.7, p.3988-3994, 2003.

CORTES, S.; ROLÃO, N.; RAMADA, J.; CAMPINO, L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, p.12-17, 2004.

COSTA, C.H.N. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, RJ, 24 (12):2959-2963, dez, 2008.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba- São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, São Paulo, 5, n.28, 2000.

FERRER, L.; AISA, M.J.; ROURA, X.; PORTÚS, M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Record**, London, 136, p.514-516, 1995.

FRANÇA-SILVA, J.C.; DA COSTA, R.; SIQUEIRA, A.; MACHADO-COELHO, G.; DA COSTA, C.; MAYRINK, W.; VIEIRA, E.; COSTA, J.; GENARO, O & NASCIMENTO, E. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 111, p.161-173, 2003.

GARIN, Y.J.; MENECEUR, P.; PRATLONG, F.; DEDET, J.P.; DEROUIN, F.; LORENZO, F. A2 gene of Old World cutaneous *Leishmania* is a single highly conserved functional gene. **BMC infectious diseases**, 5:18, p.1-17, 2005.

GENARO, O. **Leishmaniose visceral canina experimental**. 1993. 202p. Tese (Doutorado em Parasitologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GHEDIN, E.; ZHANG, W.; CHAREST, H.; SUNDAR, S.; KENNEY, R.; MATLASHEWSKI, G. Antibody response against a *Leishmania donovani* amastigote-stage-specific protein in patients with visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 4, n. 5, p. 530-535, 1997.

GUIMARÃES, M.C.; CELESTE, B.J.; FRANCO, E.L. Evaluation of Dot enzyme-linked immunosorbent assay for mucocutaneous leishmaniasis and comparison with microplate enzyme immunoassay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 364-367, 1986.

HEINZEL, F.P. Infections in patients with humoral immunodeficiency. **Hosp. Pract.** (Off Ed). Sep 15;24(9):99-103, 106-111 passim, 1989.

HEINZEL, F.P.; RERKO, R.M.; HATAM, F.; LOCKSLEY, R.M. IL-2 is necessary for the progression of leishmaniasis in susceptible murine hosts. **J. Immunol.** 150(9):3924-31, May 1; 1993.

HEINZEL, F.P.; SCHOENHAUT, D.S.; RERKO, R.M.; ROSSER, L.E.; GATELY, M.K. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. **J. Exp. Med.** 177(5):1505-9, May 1; 1993.

HUANG, X.; XUAN, X.; YOKOYAMA, N.; KATAYAMA, Y.; ANZAI, T.; IGARASHI, I. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant antigen for the serodiagnosis of equine *Babesia* infections. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.140, n.1-2,p. 158-161, 2006.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins using assembly of head bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p.680-685, 1970.

JERONIMO, S.M.; OLIVEIRA, R.M.; MCKAY, S.; COSTA, R.M.; SWEET, J.; NASCIMENTO, E.T. et al. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natl, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 88:386-8, 1994.

JI, J.; SUN, J.; QI, H.; SOONG, L. Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. **A. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 66, p. 338 - 345, 2002.

JI, J.; SUN, J.; QI, H.; SOONG, L. Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. **A. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 66, p. 338 - 345, 2002.

JONES, D.E.; BUXBAUM, L.U.; SCOTT, P. IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. **J. Immunol.**, v. 165, p. 364 - 372, 2000.

MACHADO, R. Z; VALADÃO, C. A. A; MELO, W. R; ALESSI, A. C. Isolation of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* merozoites by ammonium chlorid lysis of infected erythrocytes. **Brazilian Journal Medical Biology Research**, Ribeirão Preto, v. 27, p.2591-2598, 1994.

MACHADO, R.Z.; MONTASSIER, H.J.; PINTO, A.A.; LEMOS, E.G.; MACHADO, M.R.; VALADÃO, I.F.; BARCI, L.G.; MALHEIROS, E.B. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 71, p.17-26, 1997.

MANCIANTI, F.; PEDONESE, F.; POLI, A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as

compared with indirect immunofluorescence assay. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam 65,p.1-9,1996.

McCALL, L.I.; MATLASHEWSKI, G. Localization and induction of the A2 virulence factor in *Leishmania*: evidence that A2 is a stress response protein. **Molecular Microbiology**, v.77, n.2, p. 518-530, 2010.

McBRIDE, J.W.; YU, X.J.; WALKER, D.H. Molecular cloning of the gene for a conserved major immunoreactive 28-kilodalton of *Ehrlichia canis*: a potential serodiagnostic antigen. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington , v. 6, n.3, p.392-399. 1999.

NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 11<sup>a</sup>. ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2005. p. 41-83.

NUNES, V.L. et al. Occurrence of canine visceral leishmaniasis in an agricultural settlement in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Fortaleza, v.34, n.3, p.299-300, 2001.

OLIVEIRA, T. M. F. S.; FURUTA, P. I.; CARVALHO, D.; MACHADO, R. Z. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp, *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro,v.17, n.1, p.7-11, 2008.

OLIVEIRA, T. M. F. S., **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro,v.17, n.1, p.7-11, 2010.

OLIVEIRA DA SILVA, V.; BORJA-CABRERA, G.P.; PONTES, N.N.C.; SOUZA, E.P.; LUZ, K.G.; PALATNIK, M.; SOUZA, C.B.P. A phase III trial of efficacy of the FML-

vaccine against canine kalazar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto, RN). **Vaccine**, 19: 1082-92, 2001.

PALATNIK DE SOUSA, C.B. et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 7, p.53-59, 2001.

POCAI, E. A.; FROZZA, L.; HEADLEY, S.A.; GRAÇA, D.L. Leishmaniose visceral (calazar). Cinco casos em Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n.3, p.501-505, 1998.

PORROZZI, R.; SANTOS DA COSTA, M.V.; TEVA, A.; FALQUETO, A.; FERREIRA, A.L.; DOS SANTOS, C.D.; FERNANDES, A.P.; GAZZINELLI, R.T.; CAMPOS-NETO, A.; GRIMALDI, G.Jr. Comparative evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays based on crude leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 14, n. 5, p. 544-548, 2007.

QUEIROZ, N.M.G.P.; ASSIS, J.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; MACHADO, R.Z.; NUNES, C.M.; STARKE-BUZETTI, W.A. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pelas técnicas de imunohistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Rev. Bras. Parasitol. Vet**, v.19, n.1, p.34-40, jan-mar 2010.

REY, L. **Parasitologia**. 3ª ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p.214-240.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 6ª ed, Barueri: Manole, 2003. p.259-276.

ROURA, X.; SANCHEZ, A.; FERRER, L. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. **Veterinary Record**, London, v. 144, p. 262-264, 1999.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A LABORATORY MANUAL**, 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 2001.

SANGER, F; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington, v.74, p.5463-5467, 1977.

SANTA ROSA, A. C. I.; OLIVEIRA, S. C. I.; Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v.2, n.11, 1997.

SCHARTON, T.M.; SCOTT, P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. **J Exp Med**. 178(2):567-77, Aug 1; 1993.

SCOTT, P. The role of TH1 and TH2 cells in experimental cutaneous leishmaniasis. **Exp Parasitol**. v.68, p.369-372, 1989.

SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.F.; PACHECO, R.S.; FIUZA, V.O.P.; BRAZIL, R.P. Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.96(3), p.285-291, 2001.

SLAPPENDEL, R.J.; GREENE, C. E. Leishmaniasis. In: Greene, C.E. **Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1990, p.450-458.



STRAUSS, A.I.D.; BANETH, G. Canine Visceral Leishmaniasis (last update: 26-Sep-2001) In: **RECENT Advances in Canine Infectious Diseases**, Carmichael L. (Ed.). Disponível em: [http://www.ivis.org/advances/Infect\\_Dis\\_Carmichael/baneth/](http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/baneth/). Acesso em: 02/05/2004.

SUNDAR, R.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v.9, n.5, p.951-958, 2002.

SYPEK, J.P.; CHUNG, C.L.; MAYOR, S.E.; SUBRAMANYAM, J.M.; GOLDMAN, S.J.; SIEBURTH, D.S.; WOLF, S.F.; SCHAUB, R.G. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. **J Exp Med.** 177(6):1797-802, Jun 1; 1993.

TOWBIN, H.; STAEBLIN, T.; GORDON, J. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrilamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington, v.76, p.4350-4354, 1979.

TRAVI, B.L.; TABARES, C.J.; CADENA H.; FERRO C.; OSORIO, Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, n.3, p. 119-124, 2001.

TRAVI, B.L.; FERRO, C.; CADENA, H.; MONTOYA-IERMA, J.; ADLER, G.H. Canine visceral leishmaniasis: dog infectivity to sand flies from non-endemic areas. **Research in Veterinary Science**, Londres, p. 83-86, 72, 2002.

VERÇOSA, B.L.A.; LEMOS, C.M.; MENDONÇA, I.L.; SILVA, S.M.M.S.; DE CARVALHO, S.M.; GOTO, H.; COSTA, F.A.L. Transmission potential, skin inflammatory

response and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BMC Veterinary Research**, v. 4, n. 45, 2008.

WERKHAUSER, M. Vacina anti-leishmaniose em foco (prevenção). **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 49, p. 21, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis control. **Communicable Disease Surveillance and Response (CSR)**. 1999. Disponível em: <<http://www.who.int/emc/diseases/leish/leisgeo1.html>>. Acesso em 06 fev. 2004.

ZHANG, W.W.; CHAREST, H.; GHEDIN, E.; MATLASHEWSKI, G. Identification and overexpression of the A2 amastigote-specific protein in *Leishmania donovani*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 78:79-90, 1996.

ZHANG, W.W.; MATLASHEWSKI, G. Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, 94, 1997.

## Anexo 1:

1. Análise pelo BLASTn obtida com o clone pGEM\_A2 :

### Seqüências que produziram alinhamentos significativos:

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
<a href="#">GQ290460.3</a>	<i>Leishmania chagasi</i> A2 protein (A2) gene, A2-V allele, complete cds	<a href="#">412</a>	896	55%	1e-111	94%
<a href="#">AY255807.1</a>	<i>Leishmania infantum</i> stage-specific S antigen-like protein (A2) gene, A2-type II allele, complete cds	<a href="#">202</a>	501	41%	3e-48	91%
<a href="#">S69693.1</a>	<i>Leishmania donovani infantum</i> stage-specific S antigen homolog (A2) mRNA, complete CDs	<a href="#">248</a>	1258	37%	3e-62	88%

## Anexo 2:

2. Análise pelo BLASTn obtida com o fragmento A2 do clone pET28a\_A2 :

### Seqüências que produziram alinhamentos significativos:

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
<a href="#">GQ290460.3</a>	<i>Leishmania chagasi</i> A2 protein (A2) gene, A2-V allele, complete cds	<a href="#">379</a>	740	95%	3e-102	98%
<a href="#">S69693.1</a>	<i>Leishmania donovani infantum</i> stage-specific S antigen homolog (A2) mRNA, complete cds	<a href="#">237</a>	2964	95%	2e-59	92%
<a href="#">AY255808.1</a>	<i>Leishmania infantum</i> stage-specific S antigen-like protein (A2) gene, A2-type III allele, complete cds	<a href="#">222</a>	660	95%	6e-55	91%