



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2017 017125 6

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 48031918000124

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Quirino de Andrade, 215

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 01049-010

País: Brasil

Telefone: 11 56270217

Fax: 11 56270103

Email: auin@unesp.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): KIT E MÉTODO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL

Resumo: É descrita a patente de invenção pertencente ao campo dos testes para identificação e controle da LV em animais e humanos, que compreende a utilização do par de oligonucleotídeos Lv175 (Forward GTTCGTCACCGTTGTCTTC, Reverse GTC GTG CTT CCT GCT ATT C), desenhado a partir da sequência nucleotídica do gene Lc36, agora denominado TGMACK, na padronização de diagnóstico molecular de LV, utilizando formas promastigotas dos tripanosomatídeos *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. mexicana* e epimastigotas de *T. cruzi* e *T. brucei*. Para a espécie *T. cruzi*, incluímos no nosso estudo cepas pertencentes aos grupos TcI, TcII, TcIII e TcV (RIMOLDI et al, 2012; ZINGALES et al, 2009).

Figura a publicar: 1A

Dados do Procurador

Procurador:

Nome ou Razão Social: Sérgio Victor Mastrorocco

Numero OAB: 296946SP

Numero API: 1705

CPF/CNPJ: 02990560823

Endereço: Rua Voluntários da Pátria, 2525, 7º andar - Santana

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 02401-000

Telefone: (11) 2639-7200

Fax: (11) 2973-5032

Email: sergio@mastrorocco.com.br

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 10

Nome: MARCIA APARECIDA SILVA GRAMINHA

CPF: 17998438827

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Dr Aldo Lupo, 55

Cidade: Araraquara

Estado: SP

CEP: 14802-520

País: BRASIL

Telefone: (11) 562 70217

Fax: (11) 562 70103

Email: auin@unesp.br

Inventor 2 de 10

Nome: AMANDA EVELYN DA SILVA

CPF: 07831319417

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Professor Edson Galvão, 390, Ap 07

Cidade: Araraquara

Estado: SP

CEP: 14800-721

País: BRASIL

Telefone: (11) 562 70217

Fax: (11) 562 70103

Email: auin@unesp.br

Inventor 3 de 10

Nome: MAYARA LÚCIA DEL CISTIA

CPF: 33731027828

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins

Endereço: Rua Floriano Peixoto, 128 - Centro

Cidade: Fartura

Estado: SP

CEP: 18870-000

País: BRASIL

Telefone: (11) 562 70217

Fax: (11) 562 70103

Email: auin@unesp.br

Inventor 4 de 10

Nome: KELY BRAGA IMAMURA

CPF: 36205908859

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Treze de Maio, 860 - Ap. 204 - Bloco 03

Cidade: Araraquara

Estado: SP

CEP: 14810-088

País: BRASIL

Telefone: (11) 562 70217

Fax: (11) 562 70103

Email: auin@unesp.br

Inventor 5 de 10

Nome: PAULO INÁCIO DA COSTA

CPF: 02655172817

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Av. Dr. Antônio Tavares Pereira Lima, 1556

Cidade: Araraquara

Estado: SP

CEP: 14810-218

País: BRASIL

Telefone: (11) 562 70217

Fax: (11) 562 70103

Email: auin@unesp.br

Inventor 6 de 10

Nome: ROSÂNGELA ZACARIAS MACHADO

CPF: 12504343604

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua João Brunini, 20 - Jardim Santa Rita

Cidade: Jaboticabal

Estado: SP

CEP: 14887-062

País: BRASIL

Telefone: (11) 562 70217

Fax: (11) 562 70103

Email: auin@unesp.br

Inventor 7 de 10

Nome: GISELE FABRINO MACHADO

CPF: 07188452857

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Graça Aranha 768, Ap. 43 - Alto da Saudade

Cidade: Araçatuba

Estado: SP

CEP: 16920-260

País: BRASIL

Telefone: (11) 562 70217

Fax: (11) 562 70103

Email: auin@unesp.br

Inventor 8 de 10

Nome: WANDERSON HENRIQUE CRUZ OLIVEIRA

CPF: 13319600702

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Gavião Peixoto, 749, Bloco 14 - Apto 204, Jardim Morumbi

Cidade: Araraquara

Estado: SP

CEP: 14801-029

País: BRASIL

Telefone: (11) 562 70217

Fax: (11) 562 70103

Email: auin@unesp.br

Inventor 9 de 10

Nome: MARA CRISTINA PINTO

CPF: 11940588847

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: : Rua Bonfim Paulista, 30 AP. 204 - Jardim Califórnia

Cidade: Araraquara

Estado: SP

CEP: 14801-017

País: BRASIL

Telefone: (11) 562 70217

Fax: (11) 562 70103

Email: auin@unesp.br

Inventor 10 de 10

Nome: FLAVIO HENRIQUE DA SILVA

CPF: 51613069634

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Abraão João, 55, Casa 33

Cidade: São Carlos

Estado: SP

CEP: 13565-905

País: BRASIL

Telefone: (11) 562 70217

Fax: (11) 562 70103

Email: auin@unesp.br

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	GRU E COMPROVANTE DE PAGTO.pdf
Procuração	procuracao FUNDUNESP para o INPI.pdf
Declaração Negativa de Acesso	termo auin Amanda.pdf
Declaração Negativa de Acesso	termo auin gisele.pdf
Declaração Negativa de Acesso	termo auin Kely.pdf
Declaração Negativa de Acesso	termo auin Mara.pdf
Declaração Negativa de Acesso	termo auin Marcia.pdf
Declaração Negativa de Acesso	Termo AUIN Mayara.pdf
Declaração Negativa de Acesso	termo auin Paulo Inacio.pdf
Declaração Negativa de Acesso	termo patente Flavio timbrado UFSCar.pdf
Declaração Negativa de Acesso	termo patente Rosangela.pdf
Declaração Negativa de Acesso	termo patente Wanderson.pdf
Relatório Descritivo	relatorio descritivo.pdf
Reivindicação	reivindicacoes.pdf
Resumo	resumo.pdf
Desenho	16CI057_kit e metodo molecular para deteccao de leishmaniose visceral_desenhos.pdf

Sequências Biológicas

- ☒ Declaro que a informação contida na 'Listagem de Sequências' apresentada em formato eletrônico está limitada ao conteúdo da matéria revelada pelas sequências de aminoácidos e/ou de nucleotídeos divulgadas no pedido de patente, conforme depositado

Tipos de Sequências Biológicas	Nome
Listagem de Sequências Biológicas em formato TXT	Sequência TGMACK .txt

Acesso ao Patrimônio Genético

- ☒ Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- ☒ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

001-9		RECIBO DO SACADO	
Local de Pagamento		Prestação	
Pagável em qualquer Banco		Contra-apresentação	
Cedente		Agência/Código Cedente	
INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial		2234-9/333.028-1	
Data do Documento	Nº documento	Espécie do	Assinatura
25/05/2016	1604064956	RC	N
Uso Banco	Carteira	Espécie	Quantidade
18/027		RS	
Número: NN Complementar:		Petição Vinculada RPI Valor	
Natureza: 10 - Patente de		RS 70,00	
Cod Serviço			
200 - Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT			
OAB: 23503/SP Procurador: Leopoldo Campos Zucchi			
Governo Federal - Guia de Recolhimento da União. GRU - Cobrança			
Sacado		Autenticação mecânica - Controle Cedente	
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO			
Rua Quirino de Andrade, 215, São Paulo, BR/SP, 01049-010			
Sacador/Avalista			
Corte na linha pontilhada			

001-9		00199.53637 10000.022169 04064.956214 1 00000000007000	
Local de Pagamento		Prestação	
Pagável em qualquer Banco		Contra-apresentação	
Cedente		Agência/Código Cedente	
INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial		2234-9/333.028-1	
Data do Documento	Nº documento	Espécie do	Assinatura
25/05/2016	1604064956	RC	N
Uso Banco	Carteira	Espécie	Quantidade
18/027		RS	
Instruções:		(-) Desconto/Abatimento	
1. Valores expressos em reais.		(-) Outras deduções	
2. Pagamento em cheque, anotar no verso o 'Nosso Número'.		(+/-) Mais/Menos	
3. Pagamento via SIAFI(OB-FAT/URA): identificar na 'ob' o 'Nosso Número'.		(+/-) Outros Acréscimos	
4. Vencimento contra apresentação.		(-) Valor Cobrado	
OAB: 23503/SP Procurador: Leopoldo Campos Zucchi		RS 70,00	
Governo Federal - Guia de Recolhimento da União. GRU - Cobrança			
Sacado		Autenticação mecânica - Ficha de Compensação	
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO			
Rua Quirino de Andrade, 215, São Paulo, BR/SP, 01049-010			
Sacador/Avalista			
Corte na linha pontilhada			

- GRU ÚNICA: a GRU apresentada ao INPI, como comprovante da retribuição, deve ser única. Não utilize cópias desta GRU para outro pagamento.- PAGAMENTO: o pagamento da GRU deve ser providenciado no PRAZO ADMINISTRATIVO, regulamentado em lei ou Ato Normativo próprio.

FUNDACAO PARA O DESENVOLVIMENTO DA UNESP Agência: 0239 Conta Corrente: 43-002320-8**DETALHE DO COMPROMISSO**

Convênio:	0033-0239-004900019792	Conta de Débito:	0239-000130027340
Tipo do Documento:	CNPJ	CPF/CNPJ do Fornecedor:	
Nome do Fornecedor:	000009853INPI - INST. NACIONAL		
No. compromisso banco:	1022832000100002	No. compromisso cliente:	406495/DS1 1011
Tipo de Pagamento:	BLQ Outros		
Código de Barras:	00199536371000002216904064956214100000000007000		
Valor Nominal:	70,00		
Desc./Abat.:	0,00	Juros:	0,00
Data de Vencimento:	13/06/2016		
Data de Pagamento:	13/06/2016		
Situação:	Efetivado	No. Protocolo:	PGTFORNB13062016900112783
No. Lista de Débito:			
Autenticação:			

Valor a Pagar: 70,00**Tipo de Serviço:** Pagamento Fornecedor**Complemento do Tipo de Serviço:****Emitir Aviso:** Não emitir**Central de Atendimento** 4004-2125 (Regiões Metropolitanas)
Santander Empresarial 0800 726 2125 (Demais Localidades)**SAC 0800 762 7777**
Ouvidoria 0800 726 0322[retornar](#)[imprimir](#)

PROCURAÇÃO

Por este instrumento, a **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"**, autarquia estadual de regime especial, criada pela Lei nº 952 de 30/01/1976, com sede na Rua Quirino de Andrade, 215, Centro, CEP 01049-010, São Paulo/SP, inscrita no CNPJ do MF sob o nº 48.031.918/0001-24, doravante designada simplesmente **UNESP**, neste ato, representada por seu Magnífico Reitor, de acordo com o Art. 34, I de seu Estatuto, Prof. Dr. **SANDRO ROBERTO VALENTINI**, brasileiro, professor universitário, portador do RG nº 10.289.419-X SSP/SP, inscrito no CPF/MF sob o nº 083.891.058-02, ou quem legalmente o substitua, nomeia e constitui seus procuradores, **1) LEOPOLDO CAMPOS ZUANETI**, brasileiro, advogado, devidamente inscrito na Ordem dos Advogados do Brasil Seção de São Paulo sob o número 235.031; **2) SÉRGIO VICTOR MASTROROCCHO**, brasileiro, advogado, devidamente inscrito na Ordem dos Advogados do Brasil Seção de São Paulo sob o número 296.946, e **3) VITOR GARCIA KOPP**, brasileiro, engenheiro, portador do RG nº 36.688.444-X SSP/SP, inscrito no CPF/MF sob o nº 375.214.338-07, outorgando-lhes poderes para representá-la perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, para o fim de requerer e processar direitos de propriedade intelectual, tais como patentes de invenção, de modelos de utilidade, desenhos industriais, registros de marcas de produto, de serviço, coletivas ou de certificação, de indicações geográficas, cultivares, direitos de autor, de programas de computador e mantê-los em vigor com amplos e ilimitados poderes para assinar petições, autorizações para cópia, termos de cessão de direitos, acordos de gestão e compartilhamento de propriedade intelectual, documentos diversos relacionados ao processo administrativo de proteção de direitos de propriedade industrial, incluindo, mas não se limitando aos documentos já utilizados pelo INPI, bem como àqueles que vierem a ser adotados e utilizados para instrução processual de patentes, modelos de utilidades, marcas, desenhos industriais e programas de computador, pagar taxas, retribuições, impostos, fazer prova de uso das invenções patenteadas ou das marcas registradas, efetuar pagamentos e receber restituições, dando as respectivas quitações, apresentar oposições, recursos, réplicas, desistir, renunciar, anotar, averbar contratos de licença e transferências de tecnologia, elaborar notificações extrajudiciais, requerer prorrogação dos prazos de proteção, fazer declarações, opor, protestar, impugnar, recorrer, pedir reconsideração, manifestar-se sobre oposições e recursos, obter vista de processos, cumprir exigências, apresentar defesas escritas ou orais, desistir, replicar, transigir, receber, juntar e retirar documentos, requerer caducidade e contestar pedido de caducidade, requerer e contestar nulidade administrativa e licença compulsória, preencher qualquer tipo de formalidade, requerer anotação e averbação de cessão, alterações de nome e de sede, proceder à publicação de editais de chamamento para instruir, elaborar, firmar e acompanhar contratos de transferência de tecnologia e/ou licenciamento com exclusividade ou não, e praticar para o fim mencionado todos os atos necessários perante as autoridades administrativas competentes no Brasil em benefício da Outorgante.

Este instrumento é válido até 30 de junho de 2018.

São Paulo, 27 de junho de 2017.

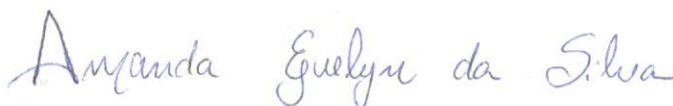

SANDRO ROBERTO VALENTINI

DECLARAÇÃO NEGATIVA DE ACESSO A RECURSOS DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

Título: KIT E MÉTODO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL
Titular: Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho"
Inventor: Amanda Evelyn da Silva

Eu, inventor abaixo assinado, declaro que o objeto do presente pedido de patente não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do patrimônio genético brasileiro; o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000 ou não se aplica.

Araraquara, 07 de agosto de 2017.



Amanda Evelyn da Silva

DECLARAÇÃO NEGATIVA DE ACESSO A RECURSOS DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

Título: KIT E MÉTODO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL
Titular: Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho"
Inventor: Gisele Fabrino Machado

Eu, inventor abaixo assinado, declaro que o objeto do presente pedido de patente não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do patrimônio genético brasileiro; o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000 ou não se aplica.

Araraquara, 07 de agosto de 2017.


Gisele Fabrino Machado

DECLARAÇÃO NEGATIVA DE ACESSO A RECURSOS DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

Título: KIT E MÉTODO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL
Titular: Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho"
Inventor: Kely Braga Imamura

Eu, inventor abaixo assinado, declaro que o objeto do presente pedido de patente não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do patrimônio genético brasileiro; o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000 ou não se aplica.

Araraquara, 07 de agosto de 2017.

Kely Braga Imamura
Kely Braga Imamura

DECLARAÇÃO NEGATIVA DE ACESSO A RECURSOS DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

Título: KIT E MÉTODO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL
Titular: Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho"
Inventor: Mara Cristina Pinto

Eu, inventor abaixo assinado, declaro que o objeto do presente pedido de patente não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do patrimônio genético brasileiro; o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000 ou não se aplica.

Araraquara, 07 de agosto de 2017.



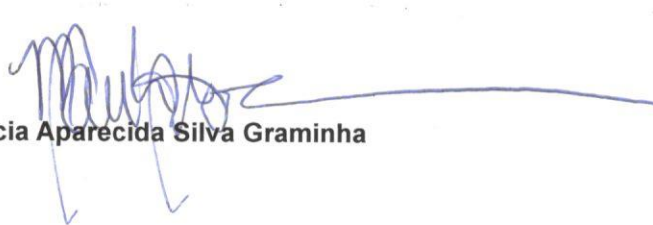
Mara Cristina Pinto

DECLARAÇÃO NEGATIVA DE ACESSO A RECURSOS DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

Título: KIT E MÉTODO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL
Titular: Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho"
Inventor: Marcia Aparecida Silva Graminha

Eu, inventor abaixo assinado, declaro que o objeto do presente pedido de patente não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do patrimônio genético brasileiro; o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000 ou não se aplica.

Araraquara, 07 de agosto de 2017.



Marcia Aparecida Silva Graminha

DECLARAÇÃO NEGATIVA DE ACESSO A RECURSOS DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

Título: KIT E MÉTODO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL
Titular: Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho"
Inventor: Mayara Lúcia Del Cistia

Eu, inventor abaixo assinado, declaro que o objeto do presente pedido de patente não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do patrimônio genético brasileiro; o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000 ou não se aplica.

Araraquara, 07 de agosto de 2017.

Mayara Lúcia Del Cistia
Mayara Lúcia Del Cistia

DECLARAÇÃO NEGATIVA DE ACESSO A RECURSOS DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**Título:**KIT E MÉTODO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIOSE VIS-
CERAL**Titular:**

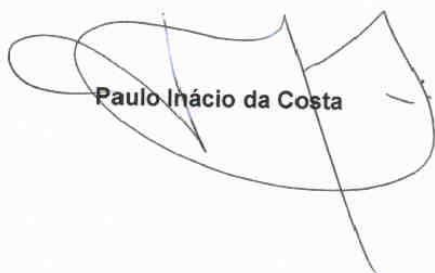
Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho"

Inventor:

Marcia Aparecida Silva Graminha

Eu, inventor abaixo assinado, declaro que o objeto do presente pedido de patente não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do patrimônio genético brasileiro; o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000 ou não se aplica.

Araraquara, 07 de agosto de 2017.



Paulo Inácio da Costa



DECLARAÇÃO NEGATIVA DE ACESSO A RECURSOS DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

Título: KIT E MÉTODO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL
Titular: Universidade Federal de São Carlos - UFSCar
Inventor: Flavio Henrique da Silva

Eu, inventor abaixo assinado, declaro que o objeto do presente pedido de patente não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do patrimônio genético brasileiro; o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000 ou não se aplica.

Araraquara, 04 de agosto de 2017.



Flavio Henrique da Silva

DECLARAÇÃO NEGATIVA DE ACESSO A RECURSOS DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

Título: KIT E MÉTODO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL
Titular: Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho"
Inventor: Rosangela Zacarias Machado

Eu, inventor abaixo assinado, declaro que o objeto do presente pedido de patente não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do patrimônio genético brasileiro; o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000 ou não se aplica.

Jaboticabal, 07 de agosto de 2017.


Rosangela Zacarias Machado

DECLARAÇÃO NEGATIVA DE ACESSO A RECURSOS DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

Título: KIT E MÉTODO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL
Titular: Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho"
Inventor: Wanderson Henrique Cruz Oliveira

Eu, inventor abaixo assinado, declaro que o objeto do presente pedido de patente não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do patrimônio genético brasileiro; o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000 ou não se aplica.

Araraquara, 07 de agosto de 2017.



Wanderson Henrique Cruz Oliveira

**“KIT E MÉTODO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE
LEISHMANIOSE VISCERAL”**

CAMPO DE APLICAÇÃO

[001] Trata o presente relatório descritivo da patente de invenção de um kit inédito baseado em método molecular para detecção de leishmaniose visceral utilizada especialmente para identificação e controle da leishmaniose visceral em animais, não excluindo sua potencial aplicação para diagnóstico em humanos, de concepção inovadora e dotado de importantes melhoramentos tecnológicos e funcionais, segundo os mais modernos conceitos de farmacologia e de acordo com as normas e especificações exigidas, revestindo-se de características próprias e dotadas com requisitos fundamentais de novidade e atividade inventiva, fazendo resultar uma série de reais e extraordinárias vantagens técnicas, práticas e econômicas.

ANTECEDENTES DA PRESENTE INVENÇÃO

[002] Como é do conhecimento dos técnicos no assunto, leishmanioses são doenças causadas pelo protozoário parasito que pertence ao gênero *Leishmania*, este por sua vez é transmitido através do repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneo infectadas com o parasito. Essa parasitose atinge 98 países, onde há 350 milhões de pessoas em risco de contraí-la e 12 milhões de casos de infecção (WHO, 2016). Existem aproximadamente 51 espécies de *Leishmania*, sendo que 20 são patogênicas para o homem, e que diferem nas manifestações clínicas provocadas no hospedeiro. Consistindo em três classificações, Leishmaniose Cutânea, Mucocutânea ou Visceral (AKHOUNDI et al., 2016).

[003] A leishmaniose visceral (LV) é a forma clínica mais severa que apresenta maior número de óbitos e possui incidência de 0,2 a 0,4 milhões de casos em todo o mundo. A *Leishmania infantum* é o

agente causador da LV nas Américas, na China e na bacia do Mediterrâneo, tendo o cão como reservatório de importância epidemiológica (MORENO; ALVAR, 2002). Os casos humanos, na maioria das vezes procedem de infecções em cães domésticos, sendo estes os mais próximos ao homem (FRANCA-SILVA et al., 2003; KRAUSPENHAR et al., 2007); portanto, a presença de cães infectados em uma região significa que haverá risco de infecção de humanos por *L. infantum*, tratando-se de um indicativo importante de risco e para o controle epidemiológico, como mencionado anteriormente. Além da presença do vetor e do reservatório, há outros fatores importantes para a progressão da doença, como a imunidade do hospedeiro e a virulência do parasito (ALVAR et al., 2004; KRAUSPENHAR et al., 2007).

[004] Alguns cães apresentam sintomas clínicos, como lesões oculares e na pele, alterações no esqueleto ósseo e emagrecimento. Porém, há os casos não sintomáticos, que por sua vez são os que apresentam maiores dificuldades para identificação da doença. (BANETH; AROCH, 2008). Para o diagnóstico laboratorial de cães assintomáticos ou que apresentam poucos sintomas (oligossintomáticos) são requeridos testes de alta sensibilidade e especificidade. De modo a proporcionar mais sensibilidade aos testes, novas ferramentas baseadas em métodos moleculares estão sendo desenvolvidas (GOMES et al., 2008).

[005] Embora ainda mantenha algumas características rurais, a LV se apresenta em processo de urbanização com significativa expansão geográfica. A grande população de cães que ficam nas ruas dos grandes centros pode abrigar cães assintomáticos que tem grande importância na saúde pública, pois também são fonte de infecção para os flebotomíneos e assim apresentam papel ativo na cadeia de

transmissão da doença (LINDOSO e GOTO, 2006).

[006] O diagnóstico de rotina e de certeza baseia-se em métodos diretos os quais detectam o estágio intracelular do parasito por microscopia em tecido de biópsia ou punção aspirativa do baço, fígado, medula óssea ou linfonodos; sendo demonstrações no sangue periférico e em cultura, métodos também de rotina. No entanto, estes procedimentos invasivos requerem microscopista experiente e não fornecem diagnóstico positivo em todos os casos, pois a distribuição dos parasitos nos tecidos afetados não é homogênea (TRONCARELLI et al, 2009).

[007] Em vista disso, nosso grupo de pesquisa vem estudando proteínas de funções desconhecidas de *L. infantum* para aplicação no diagnóstico sorológico e molecular de LV, a fim de aumentar a especificidade do diagnóstico. O gene Lc36, agora denominado TGMACK (Linj.36.4190), de 2219 pb, localizado no cromossomo 36 de *L. infantum*, codifica para uma proteína hipotética de 739 aminoácidos. Muitas dessas sequências conservadas dentro desse grupo de parasitos são gênero ou, até mesmo, espécie específica e têm sido utilizadas para diagnóstico molecular tanto quantitativo quanto qualitativo (MIRÓ et al., 2008). Dentre as técnicas existentes, a mais específica é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que consiste na amplificação in vitro de regiões específicas do DNA (GOMES et al., 2008; MAIA; CAMPINO, 2008).

[008] O diagnóstico pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), se baseia na detecção de DNA do parasito no hospedeiro, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para diferentes parasitoses e eletroforese em gel de agarose para visualização dos produtos amplificados (REITHINGER e DUJARDIN, 2007). Esta tem sido considerada uma das técnicas mais sensíveis e de considerável valor

para um diagnóstico definitivo (ASSIS et al., 2010), podendo ser empregada como método confirmatório no caso de animais assintomáticos, recém infectados (ainda sem soroconversão) ou com baixa parasitemia (ALVES e BEVILACQUA, 2004). A PCR em tempo real baseia-se no uso das mesmas regiões gênicas espécie-específicas e amostras, e utiliza corantes ou sondas fluorescentes durante a amplificação para quantificação do parasito. Pode ser aplicada tanto na investigação epidemiológica, quanto no diagnóstico molecular (VANGUILDER et al, 2008; PAIVA-CAVALCANTI, REGIS-DA-SILVA e GOMES, 2010). Essa técnica além de apresentar maior especificidade, possui a capacidade de quantificar a carga parasitária presente na amostra. Sendo atualmente, o principal alvo de estudo para melhoramento do diagnóstico em cães assintomáticos infectados com *L. infantum* (GOMES et al., 2008; MAIA; CAMPINO, 2008).

[009] Sendo assim, objetiva-se neste estudo avaliar a potencial aplicação do gene TGMACK para utilização em diagnóstico molecular e investigação epidemiológica de leishmaniose visceral humana e canina, por meio das técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real.

[010] O controle epidemiológico das leishmanioses depende da correta identificação de cães infectados. No entanto o diagnóstico clínico da LVC é difícil de ser realizado devido a pouca especificidade dos sintomas (apatia, perda de apetite, emagrecimento rápido, feridas na pele, perda de pêlos, crescimento anormal das unhas, hepatoesplenomegalia, problemas oculares, diarreia, vômito e sangramento intestinal), que pode ser confundido com outras doenças, tais como brucelose, babesiose, toxoplasmose, dirofilariose canina, entre outras; além de ser perceptível apenas nos casos avançados ou em situações epidêmicas (TRONCARELLI et al., 2009;

PATTABHI et al, 2010).

[011] Técnicas baseadas em análise de DNA estão sendo cada vez mais utilizadas no diagnóstico e caracterização de espécies de *Leishmania*, devido ao aumento do número de sequências do parasito nos bancos de dados. Essas técnicas apresentam alto nível de acurácia, no entanto ainda têm sido utilizadas de forma modesta no Brasil (SALOTRA et al, 2001; ROLÃO et al, 2004; HIRSCHMANN et al, 2015).

[012] A detecção de *Leishmania* spp. tem sido feita pela amplificação de regiões específicas do DNA do cinetoplasto (kDNA) e genes que codificam para regiões como RNA ribossomal 18S, DNA polimerase alfa, G6PDH (glicose-6-fosfato desidrogenase), GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e hexoquinase (FERNANDES et al., 1993; PRINA et al., 2007; GALLETTI et al., 2011).

[013] No diagnóstico de rotina, a detecção de DNA de *Leishmania* spp. pelas técnicas de PCR pode ser realizada em diferentes amostras clínicas com elevadas sensibilidade e especificidade (FRANCINO et al., 2006; GALLETTI et al., 2011).

[014] Amostras de sangue periférico para diagnóstico por técnicas de PCR têm sido estudadas mostrando-se eficientes, como descrito previamente por SPANAKOS e colaboradores que em 2002 propuseram o uso da sequência conservada ssu-RNA de *Leishmania infantum* para detecção por PCR em amostras de sangue de pacientes com a LV, obtendo uma detecção de 10 parasitos para cada mililitro de sangue, quantidade considera satisfatória para a tecnologia. Em 2008, o mesmo grupo, usando sequências específicas para os genes 18S e 5S ribossomal (conservados em espécies de *Leishmania*) , mostraram a eficiência do diagnóstico de LV causada por *L. infantum* por técnicas de PCR; principalmente em amostras de sangue periférico

(SPANAKOS et al, 2002; SPANAKOS et al, 2008). Estudos com reações multiplex envolvendo a detecção simultânea de bactérias (*Bacillus anthracis* e *Yersinia pestis*) e um dos agentes etiológicos da LV, *L. donovani*, foram bem sucedidos em ensaios de PCR e em ensaios de PCR em tempo real, usando os oligonucleotídeos separadamente e SYBR Green como agente intercalante de DNA. A sensibilidade dos ensaios com amostras de sangue de 11 pacientes positivos para LV foi de 100% (SELVAPANDIYAN et al, 2005).

[015] O diagnóstico sorológico da LVC pelos testes atualmente disponíveis apresenta problemas em relação à detecção de cães assintomático, com baixa parasitemia ou que já foram imunizados, apresentando resultados variáveis; o que compromete o controle da doença em cães e, conseqüentemente, favorece a transmissão desta parasitose ao homem. Como mostra estudo desenvolvido por INIESTA e colaboradores em 2002, que comparou diferentes técnicas para detecção de leishmaniose críptica em áreas endêmicas para *Leishmania infantum*; técnicas imunológicas (ELISA, RIFI, Western blotting, Reação de hipersensibilidade pós-tratamento e ensaio de proliferação de linfócito in vitro) não diferenciam de forma clara cães não infectados de cães infectados assintomáticos, enquanto que a cultura do parasito e técnicas de PCR são mais confiáveis para o diagnóstico definitivo (INIESTA et al, 2002) e são capazes de detectar cães tanto sintomáticos quanto assintomáticos (SOARES et al, 2005). Sendo assim, torna-se necessária a busca de novas ferramentas que possam ser utilizados como alternativas no diagnóstico desses animais. E também a técnica apresentada pode ser utilizada para diagnosticar humanos com leishmaniose visceral.

[016] Sendo os flebotomíneos o principal elo para a transmissão da leishmaniose visceral entre animais e seres humanos e, sabendo-se

que nas Américas já existem aproximadamente 500 espécies descritas, a identificação das espécies envolvidas é relevante do ponto de vista epidemiológico e, conseqüentemente, controle. Na América do Sul, a espécie de flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* foi considerada por muito tempo a única transmissora da leishmaniose visceral. Entretanto, outras espécies como *Lutzomyia evansi* (MONTROYA-LERMA et al., 2003) e *Lutzomyia cruzi* (SANTOS et al., 1998) já foram incriminadas na transmissão dessa parasitose.

[017] Um dos critérios para incriminação de uma espécie de flebotomíneo como vetor da leishmaniose é o encontro do parasito no inseto. Esse processo pode ser direto, pela dissecação do insetos e observação em microscópio para a busca do parasito, ou indireto por meios moleculares. Os métodos moleculares são vantajosos em relação à observação direta basicamente por dois motivos: a) podem haver outros parasitos flagelados no intestino dos insetos, que não as *Leishmanias* spp, que são morfologicamente indistinguíveis; b) em condições de campo, o grande número de exemplares capturados inviabiliza a dissecação individual (KÁRITA et al., 2014). Inúmeros estudos têm utilizado os marcadores moleculares para avaliar taxas de infecção natural em *L. longipalpis* em campo (PAIVA et al., 2006; SOARES et al., 2010; CUNHA et al., 2014).

[018] Em estudo com diferentes marcadores moleculares utilizados na identificação de *L. infantum* em flebotomíneos, o marcador para kDNA foi melhor em relação aos genes que codificam o mini-exon ou RNA ribossomal (KÁRITA et al., 2014). Observa-se assim, que a identificação de novos marcadores de *L. infantum* será útil tanto para os hospedeiros vertebrados, quanto para os invertebrados.

ESTADO DA TÉCNICA

[019] O documento de patente WO2016005517 depositado em

09/07/2014 ensina um método de detecção de sequências do DNA para a identificação de leishmaniose. Tal processo utiliza a análise de sinais eletroquímicos.

[020] O documento de patente CN103409502 depositado em 21/05/2013 descreve um kit de identificação patogênica composto por diversas sondas utilizadas para cada uma das patogenias.

[021] O documento de patente CN101921862 depositado em 01/09/2010 ensina um kit de identificação de leishmaniose em insetos através da utilização de identificadores genéticos.

[022] O documento de patente BR 10 2012 026282 7 depositado em 15/10/2012 ensina um kit molecular destinado ao diagnóstico diferencial do gênero *Leishmania* spp., sendo descrito meios pelos quais o referido kit torna uma potente ferramenta para o diagnóstico laboratorial e epidemiológico. A liofilização prévia dos reagentes da PCR multiplex é uma etapa que permite a conservação da mistura dos mesmos por longos períodos de tempo acelerando o processo de diagnóstico, minimizando custos e facilitando a rotina laboratorial. Esta liofilização pode ser aplicada ao diagnóstico de quaisquer parasitoses apenas pela substituição dos oligonucleotídeos específicos. Os resultados do referido kit molecular liofilizado demonstraram a amplificação de regiões únicas do DNA dos parasitos que causam as diferentes manifestações clínicas das leishmanioses, produzindo bandas de fácil distinção na eletroforese em gel de agarose.

[023] Analisando os objetos dos documentos acima citados e conhecidos do estado da técnica, como poderá ser observado, tratam-se de tecnologias diversas da presente patente, de modo que nenhum apresenta integralmente as características construtivas do kit e método molecular para detecção de LV, objeto da presente patente.

[024] É, pois, um dos objetivos da presente patente prover uma tecnologia que fornece um método molecular para diagnosticar precocemente a LV e que compreende: a) o uso de um par de oligonucleotídeos iniciadores que amplificam especificamente uma região do gene TGMACK de *L. infantum* (syn. *L. chagasi*). b) a partir do uso de DNAs genômicos provenientes de amostras biológicas infectadas por *L. infantum*. C) avaliações qualitativas e quantitativas de amostras biológicas infectadas provenientes de cães e de humano de forma espécie-específica. D) o uso das técnicas de PCR convencional e em tempo real.

[025] A amplificação do gene TGMACK poderá ser empregada na indústria biotecnológica como componentes de kits diagnósticos para detecção do DNA genômico de *L. infantum*, causadora da LV humana e canina, através das técnicas de PCRs convencional ou Tempo Real. Sua aplicação poder ser realizada tanto para diagnosticar cães com suspeitas clínicas de leishmaniose, quanto para triagem epidemiológica (para identificação de reservatórios, vetores e hospedeiros infectados) fato este de extrema importância no âmbito de saúde pública. Além disso, também pode ser utilizada no diagnóstico da LV em humanos.

[026] Com relação ao vetor, será relevante para estudos epidemiológicos: a avaliação das taxas de infecção em seu principal vetor, *Lutzomyia longipalpis*.

[027] É de extrema necessidade que kits diagnósticos mais confiáveis para leishmanioses sejam disponibilizados no mercado, uma vez que os testes atualmente utilizados para detecção de soros positivos apresentam limitações quanto à sensibilidade e especificidade, o que compromete o controle da doença e favorece sua transmissão. Dessa forma, é possível afirmar que o mercado está pronto para receber e

absorver tal tecnologia.

[028] Atualmente existem dois kits diagnósticos disponíveis para leishmaniose visceral canina: EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina-Biomanguinhos (EIE-LVC) e IFI-Leishmaniose-Canina-Biomanguinhos (IFI-LVC), sendo este último considerado padrão-ouro pelo Ministério da Saúde, Portaria nº 1943 (Doenças de Notificação obrigatória em todo território Nacional). O teste de ELISA é sensível, e permite a detecção de baixos títulos de anticorpos, mas é pouco preciso na detecção de casos subclínicos ou assintomáticos. Outros testes utilizados são o RIFI, RFC, e o teste rápido imunocromatográfico, porém estas técnicas possuem baixa especificidade e muitas delas não são espécie-específicas, podendo gerar resultado falso-positivo.

[029] Segundo o Ministério da Saúde, o diagnóstico molecular pode ser feito utilizando DNA extraído de fragmento de pele, mucosa, sangue periférico, medula óssea ou órgãos do sistema fagocítico-mononuclear. Portanto, a ideia motora do referido trabalho é utilizar DNA extraído do sangue periférico e outros tecidos de cães infectados com *L. infantum*, ou com suspeita de infecção, assim como utilização na triagem epidemiológica, sendo esta com impacto na saúde pública. Além disso, o seu emprego no diagnóstico molecular em LV humana e insetos vetores. Essa técnica proposta difere das outras existentes por possuir alta especificidade para a espécie causadora da LV, sendo um grande potencial para diagnóstico laboratorial da doença, eliminando os resultados falso-positivos que acarretam em mortes de animais sadios.

[030] Esta patente relata a utilização do par de oligonucleotídeos Lv175 (Foward GTTCGTCACCGTTGTCTTC, Reverse GTC GTG CTT CCT GCT ATT C), desenhado a partir da sequência nucleotídica do gene Lc36, agora denominado TGMACK, na padronização de

diagnóstico molecular de LV. Nos ensaios utilizaram-se formas promastigotas dos tripanosomatídeos *L. infantum*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania mexicana* e epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*. Para a espécie *T. cruzi*, incluímos no nosso estudo cepas pertencentes aos grupos TcI, TcII, TcIII e TcV (RIMOLDI et al, 2012; ZINGALES et al, 2009).

[031] Realizou-se também a infecção de macrófagos murinos peritoniais com formas promastigotas de *L. infantum* para avaliação da eficiência do teste em amastigotas intracelulares na presença de gDNA de mamífero. A infecção foi realizada como descrito por DOS SANTOS (2013), com algumas modificações: após o tempo de incubação para adesão dos macrófagos, o meio RPMI foi descartado e foi realizada a infecção dos macrófagos com formas promastigotas de *L. infantum* em fase logarítmica. A infecção foi feita na proporção de 10 promastigotas para cada macrófago. Após esse período, o meio foi retirado das garrafas, as células lavadas e ressuspensas em PBS 1X por raspagem com auxílio de *scraper* estéril.

[032] O DNA genômico (gDNA) das diferentes espécies foi extraído com o Pure Link® Kit DNA extraction (Life Technologies) conforme especificações do fabricante. A integridade do gDNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

[033] Realizaram-se ensaios de PCR com o par de oligonucleotídeos supracitado (Lv175), utilizando-se a enzima Taq DNA polimerase (Thermo Scientific®) em aparelho termociclador Amplitherm Thermal Cyclers (Ideal Lab) e a ciclagem foi padronizada para os oligonucleotídeos em questão respeitando a temperatura de anelamento entre 45-60°C. As amplificações foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose 3% (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[034] Para complementar a presente descrição, de modo a obter uma melhor compreensão das características da presente patente, e de acordo com uma preferencial realização prática da mesma, acompanha a descrição, em anexo, um conjunto de figuras, onde de maneira exemplificada embora não limitativa, se representa o seguinte:

[035] As figuras 1A e 1B confirmam a integridade das amostras por eletroforese em gel de agarose 1%; As Figuras 1A e 1B são produtos de extração de DNA genômico de tripanossomatídeos, macrófagos murinos.

[036] Na Figura 1A tem-se que: 1. gDNA de *T. brucei*; 2. gDNA de *T. cruzi* (TcI/RON1); 3. gDNA de *T. cruzi* (TcII/Y); 4. gDNA de *T. cruzi* (TcIII/QMM6); 5. gDNA de *T. cruzi* (TcV/QMM7); 6. gDNA de *L. amazonensis*; 7. gDNA de *L. mexicana*; 8. gDNA de *L. infantum*.

[037] Na Figura 1B tem-se que: 1. gDNA de macrófagos murinos; 2. gDNA de macrófagos murinos infectados com *L. infantum*; 3. gDNA de *L. infantum*. PM: marcador de peso molecular de DNA. GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, ready-to-use (Fermentas).

[038] Os gDNAs foram quantificados e a reação de polimerização foi realizada com a enzima Taq DNA polimerase, utilizando-se 100 ng de amostra e os parâmetros de ciclagem padronizados. As figuras 2A, 2B, 2C e 2D mostram que o par de oligonucleotídeos iniciadores Lv175 avaliado para teste diagnóstico molecular é específico para *L. infantum* e pode ser utilizado para diagnóstico molecular de LV.

[039] As Figuras 2A, 2B, 2C e 2D representam o teste de especificidade do par oligonucleotídeos RT36 frente a diferentes amostras.

[040] A Figura 2A representa a amplificação do par de

oligonucleotídeos Lv175, específico para *L. infantum*;

[041] A Figura 2B representa a amplificação do par de oligonucleotídeos GADPH, específico para mamíferos.

[042] A Figura 2C representa a amplificação do par de oligonucleotídeos 18S, específico para a família Trypanosomatidae;

[043] A Figura 2D representa PCR Multiplex com os três pares de oligonucleotídeos, 18S, GADPH e Lv175. Ambos com a mesma sequência das amostras designadas no painel, onde 1.gDNA de *T. brucei*; 2. gDNA de *T. cruzi* (TcI/RON1); 3. gDNA de *T. cruzi* (TcII/Y); 4. gDNA de *T. cruzi* (TcIII/QMM6); 5. gDNA de *T. cruzi* (TcV/QMM7); 6. gDNA de *L. amazonensis*; 7. gDNA de *L. mexicana*; 8. gDNA de *L. infantum*; 9. gDNA de macrófagos; gDNA de macrófagos infectados com *L. infantum*; 10. NTC. PM: marcador de peso molecular de DNA. 50 pb Ladder Sinapse Inc., 50 µg.

[044] É importante ressaltar que não houve amplificação mesmo com o gDNA de *L. mexicana* (figura 2A, poço 7), cuja sequência apresentou 90% de identidade com o gene TGMACK (www.genedb.org). O que confirma a especificidade da região escolhida. Como pode ser observado na figura 2D, é possível realizar a PCR Multiplex com os três pares de oligonucleotídeos utilizados nas demais reações, isso prova que há gDNA de diferentes espécies em cada poço do gel de agarose, confirmando a especificidade do par de oligonucleotídeos Lv175 para amplificar o gDNA de *L. infantum*, com amplicon de 175 pb.

[045] Realizou-se um teste para avaliar a sensibilidade deste ensaio de PCR frente a diferentes concentrações de gDNA de *L. infantum*, ou seja, para avaliar qual o número mínimo de parasitos esta reação é capaz de detectar. Foram feitas reações com diluição seriada na razão 10, partindo-se de 100 ng de gDNA. A figura 3 mostra o

resultado obtido.

[046] Pode-se observar que houve amplificação até 0,001 ng (1 pg) de gDNA (figura 3, poço 5). Considerando 0,12 pg a massa do genoma haplóide para *Leishmania* (LEON et al., 1978) que se trata de um organismo diplóide, e que as bandas dos poços 4 e 5 podem ser observadas; o par de oligonucleotídeos TGMACK foi capaz de detectar o gDNA de cerca de 40 promastigotas. A literatura mostra valores de sensibilidade com detecção de 10 até 1 parasito para reações de PCR reveladas com gel de agarose e detecção de até 0,001 parasito, no caso de ensaios por PCR em tempo real, técnica bastante sensível e que faz parte desta inovação (VERGEL et al, 2005; CHAPPUIS et al., 2007; WEIRATHER et al, 2011; CECCARELLI et al, 2014). Em se tratando de diagnóstico molecular por revelação em gel de agarose, a sensibilidade encontrada está dentro dos padrões para utilização em laboratório. Dessa forma, as análises mostraram que o par de oligonucleotídeos TGMACK é adequado para diagnóstico molecular de LV causada por *L. infantum*, com especificidade e alto grau de sensibilidade.

[047] Posteriormente, a aplicabilidade do método molecular para o diagnóstico, monitoramento e estudos epidemiológicos da infecção com *L. infantum*, proposto nesta inovação, pode ser facilmente demonstrada em amostras do sangue periférico ou tecidos de cães infectados, sintomáticos ou assintomáticos.

[048] Não se tem conhecimento de um kit e método molecular para detecção de LV que reúna conjuntamente, todas as características construtivas e funcionais acima relatadas, e que direta ou indiretamente, é ou foi tão efetivo quanto o kit e método objeto da presente patente.

[049] Tendo sido descrita e ilustrada a presente invenção, é para ser

compreendido que a mesma pode sofrer inúmeras modificações e variações em sua forma de realização, desde que tais modificações e variações não se afastem a partir do espírito e escopo da invenção, tal como definido no quadro reivindicatório.

REIVINDICAÇÕES

- 1 – “KIT E MÉTODO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL”** caracterizado pelo fato de utilizar o par de oligonucleotídeos Lv175 (Forward GTTCGTCACCGTTGTCTTC, Reverse GTC GTG CTT CCT GCT ATT C), desenhado a partir da sequência nucleotídica do gene Lc36, agora denominado TGMACK, na padronização de diagnóstico molecular de LV;
- 2 – “KIT E MÉTODO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL”** caracterizado pelo fato de detectar especificamente DNA genômico da espécie *L. infantum*.
- 3 – “KIT E MÉTODO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL”**, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de, para a espécie *T. cruzi*, ser com base nas cepas pertencentes aos grupos TcI, TcII, TcIII e TcV.

RESUMO

**“KIT E MÉTODO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE
LEISHMANIOSE VISCERAL”**

É descrita a patente de invenção pertencente ao campo dos testes para identificação e controle da LV em animais e humanos, que compreende a utilização do par de oligonucleotídeos Lv175 (Foward GTTCGTCACCGTTGTCTTC, Reverse GTC GTG CTT CCT GCT ATT C), desenhado a partir da sequência nucleotídica do gene Lc36, agora denominado TGMACK, na padronização de diagnóstico molecular de LV, utilizando formas promastigotas dos tripanosomatídeos *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. mexicana* e epimastigotas de *T. cruzi* e *T. brucei*. Para a espécie *T. cruzi*, incluímos no nosso estudo cepas pertencentes aos grupos TcI, TcII, TcIII e TcV (RIMOLDI et al, 2012; ZINGALES et al, 2009).

**“KIT E MÉTODO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE
LEISHMANIOSE VISCERAL”**

CAMPO DE APLICAÇÃO

[001] Trata o presente relatório descritivo da patente de invenção de um kit inédito baseado em método molecular para detecção de leishmaniose visceral utilizada especialmente para identificação e controle da leishmaniose visceral em animais, não excluindo sua potencial aplicação para diagnóstico em humanos, de concepção inovadora e dotado de importantes melhoramentos tecnológicos e funcionais, segundo os mais modernos conceitos de farmacologia e de acordo com as normas e especificações exigidas, revestindo-se de características próprias e dotadas com requisitos fundamentais de novidade e atividade inventiva, fazendo resultar uma série de reais e extraordinárias vantagens técnicas, práticas e econômicas.

ANTECEDENTES DA PRESENTE INVENÇÃO

[002] Como é do conhecimento dos técnicos no assunto, leishmanioses são doenças causadas pelo protozoário parasito que pertence ao gênero *Leishmania*, este por sua vez é transmitido através do repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneo infectadas com o parasito. Essa parasitose atinge 98 países, onde há 350 milhões de pessoas em risco de contraí-la e 12 milhões de casos de infecção (WHO, 2016). Existem aproximadamente 51 espécies de *Leishmania*, sendo que 20 são patogênicas para o homem, e que diferem nas manifestações clínicas provocadas no hospedeiro. Consistindo em três classificações, Leishmaniose Cutânea, Mucocutânea ou Visceral (AKHOUNDI et al., 2016).

[003] A leishmaniose visceral (LV) é a forma clínica mais severa que apresenta maior número de óbitos e possui incidência de 0,2 a 0,4 milhões de casos em todo o mundo. A *Leishmania infantum* é o

agente causador da LV nas Américas, na China e na bacia do Mediterrâneo, tendo o cão como reservatório de importância epidemiológica (MORENO; ALVAR, 2002). Os casos humanos, na maioria das vezes procedem de infecções em cães domésticos, sendo estes os mais próximos ao homem (FRANCA-SILVA et al., 2003; KRAUSPENHAR et al., 2007); portanto, a presença de cães infectados em uma região significa que haverá risco de infecção de humanos por *L. infantum*, tratando-se de um indicativo importante de risco e para o controle epidemiológico, como mencionado anteriormente. Além da presença do vetor e do reservatório, há outros fatores importantes para a progressão da doença, como a imunidade do hospedeiro e a virulência do parasito (ALVAR et al., 2004; KRAUSPENHAR et al., 2007).

[004] Alguns cães apresentam sintomas clínicos, como lesões oculares e na pele, alterações no esqueleto ósseo e emagrecimento. Porém, há os casos não sintomáticos, que por sua vez são os que apresentam maiores dificuldades para identificação da doença. (BANETH; AROCH, 2008). Para o diagnóstico laboratorial de cães assintomáticos ou que apresentam poucos sintomas (oligossintomáticos) são requeridos testes de alta sensibilidade e especificidade. De modo a proporcionar mais sensibilidade aos testes, novas ferramentas baseadas em métodos moleculares estão sendo desenvolvidas (GOMES et al., 2008).

[005] Embora ainda mantenha algumas características rurais, a LV se apresenta em processo de urbanização com significativa expansão geográfica. A grande população de cães que ficam nas ruas dos grandes centros pode abrigar cães assintomáticos que tem grande importância na saúde pública, pois também são fonte de infecção para os flebotomíneos e assim apresentam papel ativo na cadeia de

transmissão da doença (LINDOSO e GOTO, 2006).

[006] O diagnóstico de rotina e de certeza baseia-se em métodos diretos os quais detectam o estágio intracelular do parasito por microscopia em tecido de biópsia ou punção aspirativa do baço, fígado, medula óssea ou linfonodos; sendo demonstrações no sangue periférico e em cultura, métodos também de rotina. No entanto, estes procedimentos invasivos requerem microscopista experiente e não fornecem diagnóstico positivo em todos os casos, pois a distribuição dos parasitos nos tecidos afetados não é homogênea (TRONCARELLI et al, 2009).

[007] Em vista disso, nosso grupo de pesquisa vem estudando proteínas de funções desconhecidas de *L. infantum* para aplicação no diagnóstico sorológico e molecular de LV, a fim de aumentar a especificidade do diagnóstico. O gene Lc36, agora denominado TGMACK (Linj.36.4190), de 2219 pb, localizado no cromossomo 36 de *L. infantum*, codifica para uma proteína hipotética de 739 aminoácidos. Muitas dessas sequências conservadas dentro desse grupo de parasitos são gênero ou, até mesmo, espécie específica e têm sido utilizadas para diagnóstico molecular tanto quantitativo quanto qualitativo (MIRÓ et al., 2008). Dentre as técnicas existentes, a mais específica é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que consiste na amplificação in vitro de regiões específicas do DNA (GOMES et al., 2008; MAIA; CAMPINO, 2008).

[008] O diagnóstico pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), se baseia na detecção de DNA do parasito no hospedeiro, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para diferentes parasitoses e eletroforese em gel de agarose para visualização dos produtos amplificados (REITHINGER e DUJARDIN, 2007). Esta tem sido considerada uma das técnicas mais sensíveis e de considerável valor

para um diagnóstico definitivo (ASSIS et al., 2010), podendo ser empregada como método confirmatório no caso de animais assintomáticos, recém infectados (ainda sem soroconversão) ou com baixa parasitemia (ALVES e BEVILACQUA, 2004). A PCR em tempo real baseia-se no uso das mesmas regiões gênicas espécie-específicas e amostras, e utiliza corantes ou sondas fluorescentes durante a amplificação para quantificação do parasito. Pode ser aplicada tanto na investigação epidemiológica, quanto no diagnóstico molecular (VANGUILDER et al, 2008; PAIVA-CAVALCANTI, REGIS-DA-SILVA e GOMES, 2010). Essa técnica além de apresentar maior especificidade, possui a capacidade de quantificar a carga parasitária presente na amostra. Sendo atualmente, o principal alvo de estudo para melhoramento do diagnóstico em cães assintomáticos infectados com *L. infantum* (GOMES et al., 2008; MAIA; CAMPINO, 2008).

[009] Sendo assim, objetiva-se neste estudo avaliar a potencial aplicação do gene TGMACK para utilização em diagnóstico molecular e investigação epidemiológica de leishmaniose visceral humana e canina, por meio das técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real.

[010] O controle epidemiológico das leishmanioses depende da correta identificação de cães infectados. No entanto o diagnóstico clínico da LVC é difícil de ser realizado devido a pouca especificidade dos sintomas (apatia, perda de apetite, emagrecimento rápido, feridas na pele, perda de pêlos, crescimento anormal das unhas, hepatoesplenomegalia, problemas oculares, diarreia, vômito e sangramento intestinal), que pode ser confundido com outras doenças, tais como brucelose, babesiose, toxoplasmose, dirofilariose canina, entre outras; além de ser perceptível apenas nos casos avançados ou em situações epidêmicas (TRONCARELLI et al., 2009;

PATTABHI et al, 2010).

[011] Técnicas baseadas em análise de DNA estão sendo cada vez mais utilizadas no diagnóstico e caracterização de espécies de *Leishmania*, devido ao aumento do número de sequências do parasito nos bancos de dados. Essas técnicas apresentam alto nível de acurácia, no entanto ainda têm sido utilizadas de forma modesta no Brasil (SALOTRA et al, 2001; ROLÃO et al, 2004; HIRSCHMANN et al, 2015).

[012] A detecção de *Leishmania* spp. tem sido feita pela amplificação de regiões específicas do DNA do cinetoplasto (kDNA) e genes que codificam para regiões como RNA ribossomal 18S, DNA polimerase alfa, G6PDH (glicose-6-fosfato desidrogenase), GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e hexoquinase (FERNANDES et al., 1993; PRINA et al., 2007; GALLETTI et al., 2011).

[013] No diagnóstico de rotina, a detecção de DNA de *Leishmania* spp. pelas técnicas de PCR pode ser realizada em diferentes amostras clínicas com elevadas sensibilidade e especificidade (FRANCINO et al., 2006; GALLETTI et al., 2011).

[014] Amostras de sangue periférico para diagnóstico por técnicas de PCR têm sido estudadas mostrando-se eficientes, como descrito previamente por SPANAKOS e colaboradores que em 2002 propuseram o uso da sequência conservada ssu-RNA de *Leishmania infantum* para detecção por PCR em amostras de sangue de pacientes com a LV, obtendo uma detecção de 10 parasitos para cada mililitro de sangue, quantidade considera satisfatória para a tecnologia. Em 2008, o mesmo grupo, usando sequências específicas para os genes 18S e 5S ribossomal (conservados em espécies de *Leishmania*) , mostraram a eficiência do diagnóstico de LV causada por *L. infantum* por técnicas de PCR; principalmente em amostras de sangue periférico

(SPANAKOS et al, 2002; SPANAKOS et al, 2008). Estudos com reações multiplex envolvendo a detecção simultânea de bactérias (*Bacillus anthracis* e *Yersinia pestis*) e um dos agentes etiológicos da LV, *L. donovani*, foram bem sucedidos em ensaios de PCR e em ensaios de PCR em tempo real, usando os oligonucleotídeos separadamente e SYBR Green como agente intercalante de DNA. A sensibilidade dos ensaios com amostras de sangue de 11 pacientes positivos para LV foi de 100% (SELVAPANDIYAN et al, 2005).

[015] O diagnóstico sorológico da LVC pelos testes atualmente disponíveis apresenta problemas em relação à detecção de cães assintomático, com baixa parasitemia ou que já foram imunizados, apresentando resultados variáveis; o que compromete o controle da doença em cães e, conseqüentemente, favorece a transmissão desta parasitose ao homem. Como mostra estudo desenvolvido por INIESTA e colaboradores em 2002, que comparou diferentes técnicas para detecção de leishmaniose críptica em áreas endêmicas para *Leishmania infantum*; técnicas imunológicas (ELISA, RIFI, Western blotting, Reação de hipersensibilidade pós-tratamento e ensaio de proliferação de linfócito in vitro) não diferenciam de forma clara cães não infectados de cães infectados assintomáticos, enquanto que a cultura do parasito e técnicas de PCR são mais confiáveis para o diagnóstico definitivo (INIESTA et al, 2002) e são capazes de detectar cães tanto sintomáticos quanto assintomáticos (SOARES et al, 2005). Sendo assim, torna-se necessária a busca de novas ferramentas que possam ser utilizados como alternativas no diagnóstico desses animais. E também a técnica apresentada pode ser utilizada para diagnosticar humanos com leishmaniose visceral.

[016] Sendo os flebotomíneos o principal elo para a transmissão da leishmaniose visceral entre animais e seres humanos e, sabendo-se

que nas Américas já existem aproximadamente 500 espécies descritas, a identificação das espécies envolvidas é relevante do ponto de vista epidemiológico e, conseqüentemente, controle. Na América do Sul, a espécie de flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* foi considerada por muito tempo a única transmissora da leishmaniose visceral. Entretanto, outras espécies como *Lutzomyia evansi* (MONTROYA-LERMA et al., 2003) e *Lutzomyia cruzi* (SANTOS et al., 1998) já foram incriminadas na transmissão dessa parasitose.

[017] Um dos critérios para incriminação de uma espécie de flebotomíneo como vetor da leishmaniose é o encontro do parasito no inseto. Esse processo pode ser direto, pela dissecação do insetos e observação em microscópio para a busca do parasito, ou indireto por meios moleculares. Os métodos moleculares são vantajosos em relação à observação direta basicamente por dois motivos: a) podem haver outros parasitos flagelados no intestino dos insetos, que não as *Leishmanias* spp, que são morfologicamente indistinguíveis; b) em condições de campo, o grande número de exemplares capturados inviabiliza a dissecação individual (KÁRITA et al., 2014). Inúmeros estudos têm utilizado os marcadores moleculares para avaliar taxas de infecção natural em *L. longipalpis* em campo (PAIVA et al., 2006; SOARES et al., 2010; CUNHA et al., 2014).

[018] Em estudo com diferentes marcadores moleculares utilizados na identificação de *L. infantum* em flebotomíneos, o marcador para kDNA foi melhor em relação aos genes que codificam o mini-exon ou RNA ribossomal (KÁRITA et al., 2014). Observa-se assim, que a identificação de novos marcadores de *L. infantum* será útil tanto para os hospedeiros vertebrados, quanto para os invertebrados.

ESTADO DA TÉCNICA

[019] O documento de patente WO2016005517 depositado em

09/07/2014 ensina um método de detecção de sequências do DNA para a identificação de leishmaniose. Tal processo utiliza a análise de sinais eletroquímicos.

[020] O documento de patente CN103409502 depositado em 21/05/2013 descreve um kit de identificação patogênica composto por diversas sondas utilizadas para cada uma das patogenias.

[021] O documento de patente CN101921862 depositado em 01/09/2010 ensina um kit de identificação de leishmaniose em insetos através da utilização de identificadores genéticos.

[022] O documento de patente BR 10 2012 026282 7 depositado em 15/10/2012 ensina um kit molecular destinado ao diagnóstico diferencial do gênero *Leishmania* spp., sendo descrito meios pelos quais o referido kit torna uma potente ferramenta para o diagnóstico laboratorial e epidemiológico. A liofilização prévia dos reagentes da PCR multiplex é uma etapa que permite a conservação da mistura dos mesmos por longos períodos de tempo acelerando o processo de diagnóstico, minimizando custos e facilitando a rotina laboratorial. Esta liofilização pode ser aplicada ao diagnóstico de quaisquer parasitoses apenas pela substituição dos oligonucleotídeos específicos. Os resultados do referido kit molecular liofilizado demonstraram a amplificação de regiões únicas do DNA dos parasitos que causam as diferentes manifestações clínicas das leishmanioses, produzindo bandas de fácil distinção na eletroforese em gel de agarose.

[023] Analisando os objetos dos documentos acima citados e conhecidos do estado da técnica, como poderá ser observado, tratam-se de tecnologias diversas da presente patente, de modo que nenhum apresenta integralmente as características construtivas do kit e método molecular para detecção de LV, objeto da presente patente.

[024] É, pois, um dos objetivos da presente patente prover uma tecnologia que fornece um método molecular para diagnosticar precocemente a LV e que compreende: a) o uso de um par de oligonucleotídeos iniciadores que amplificam especificamente uma região do gene TGMACK de *L. infantum* (syn. *L. chagasi*). b) a partir do uso de DNAs genômicos provenientes de amostras biológicas infectadas por *L. infantum*. C) avaliações qualitativas e quantitativas de amostras biológicas infectadas provenientes de cães e de humano de forma espécie-específica. D) o uso das técnicas de PCR convencional e em tempo real.

[025] A amplificação do gene TGMACK poderá ser empregada na indústria biotecnológica como componentes de kits diagnósticos para detecção do DNA genômico de *L. infantum*, causadora da LV humana e canina, através das técnicas de PCRs convencional ou Tempo Real. Sua aplicação poder ser realizada tanto para diagnosticar cães com suspeitas clínicas de leishmaniose, quanto para triagem epidemiológica (para identificação de reservatórios, vetores e hospedeiros infectados) fato este de extrema importância no âmbito de saúde pública. Além disso, também pode ser utilizada no diagnóstico da LV em humanos.

[026] Com relação ao vetor, será relevante para estudos epidemiológicos: a avaliação das taxas de infecção em seu principal vetor, *Lutzomyia longipalpis*.

[027] É de extrema necessidade que kits diagnósticos mais confiáveis para leishmanioses sejam disponibilizados no mercado, uma vez que os testes atualmente utilizados para detecção de soros positivos apresentam limitações quanto à sensibilidade e especificidade, o que compromete o controle da doença e favorece sua transmissão. Dessa forma, é possível afirmar que o mercado está pronto para receber e

absorver tal tecnologia.

[028] Atualmente existem dois kits diagnósticos disponíveis para leishmaniose visceral canina: EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina-Biomanguinhos (EIE-LVC) e IFI-Leishmaniose-Canina-Biomanguinhos (IFI-LVC), sendo este último considerado padrão-ouro pelo Ministério da Saúde, Portaria nº 1943 (Doenças de Notificação obrigatória em todo território Nacional). O teste de ELISA é sensível, e permite a detecção de baixos títulos de anticorpos, mas é pouco preciso na detecção de casos subclínicos ou assintomáticos. Outros testes utilizados são o RIFI, RFC, e o teste rápido imunocromatográfico, porém estas técnicas possuem baixa especificidade e muitas delas não são espécie-específicas, podendo gerar resultado falso-positivo.

[029] Segundo o Ministério da Saúde, o diagnóstico molecular pode ser feito utilizando DNA extraído de fragmento de pele, mucosa, sangue periférico, medula óssea ou órgãos do sistema fagocítico-mononuclear. Portanto, a ideia motora do referido trabalho é utilizar DNA extraído do sangue periférico e outros tecidos de cães infectados com *L. infantum*, ou com suspeita de infecção, assim como utilização na triagem epidemiológica, sendo esta com impacto na saúde pública. Além disso, o seu emprego no diagnóstico molecular em LV humana e insetos vetores. Essa técnica proposta difere das outras existentes por possuir alta especificidade para a espécie causadora da LV, sendo um grande potencial para diagnóstico laboratorial da doença, eliminando os resultados falso-positivos que acarretam em mortes de animais sadios.

[030] Esta patente relata a utilização do par de oligonucleotídeos Lv175 (Foward GTTCGTCACCGTTGTCTTC, Reverse GTC GTG CTT CCT GCT ATT C), desenhado a partir da sequência nucleotídica do gene Lc36, agora denominado TGMACK, na padronização de

diagnóstico molecular de LV. Nos ensaios utilizaram-se formas promastigotas dos tripanosomatídeos *L. infantum*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania mexicana* e epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*. Para a espécie *T. cruzi*, incluímos no nosso estudo cepas pertencentes aos grupos TcI, TcII, TcIII e TcV (RIMOLDI et al, 2012; ZINGALES et al, 2009).

[031] Realizou-se também a infecção de macrófagos murinos peritoniais com formas promastigotas de *L. infantum* para avaliação da eficiência do teste em amastigotas intracelulares na presença de gDNA de mamífero. A infecção foi realizada como descrito por DOS SANTOS (2013), com algumas modificações: após o tempo de incubação para adesão dos macrófagos, o meio RPMI foi descartado e foi realizada a infecção dos macrófagos com formas promastigotas de *L. infantum* em fase logarítmica. A infecção foi feita na proporção de 10 promastigotas para cada macrófago. Após esse período, o meio foi retirado das garrafas, as células lavadas e ressuspensas em PBS 1X por raspagem com auxílio de *scraper* estéril.

[032] O DNA genômico (gDNA) das diferentes espécies foi extraído com o Pure Link® Kit DNA extraction (Life Technologies) conforme especificações do fabricante. A integridade do gDNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

[033] Realizaram-se ensaios de PCR com o par de oligonucleotídeos supracitado (Lv175), utilizando-se a enzima Taq DNA polimerase (Thermo Scientific®) em aparelho termociclador Amplitherm Thermal Cyclers (Ideal Lab) e a ciclagem foi padronizada para os oligonucleotídeos em questão respeitando a temperatura de anelamento entre 45-60°C. As amplificações foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose 3% (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[034] Para complementar a presente descrição, de modo a obter uma melhor compreensão das características da presente patente, e de acordo com uma preferencial realização prática da mesma, acompanha a descrição, em anexo, um conjunto de figuras, onde de maneira exemplificada embora não limitativa, se representa o seguinte:

[035] As figuras 1A e 1B confirmam a integridade das amostras por eletroforese em gel de agarose 1%; As Figuras 1A e 1B são produtos de extração de DNA genômico de tripanossomatídeos, macrófagos murinos.

[036] Na Figura 1A tem-se que: 1. gDNA de *T. brucei*; 2. gDNA de *T. cruzi* (TcI/RON1); 3. gDNA de *T. cruzi* (TcII/Y); 4. gDNA de *T. cruzi* (TcIII/QMM6); 5. gDNA de *T. cruzi* (TcV/QMM7); 6. gDNA de *L. amazonensis*; 7. gDNA de *L. mexicana*; 8. gDNA de *L. infantum*.

[037] Na Figura 1B tem-se que: 1. gDNA de macrófagos murinos; 2. gDNA de macrófagos murinos infectados com *L. infantum*; 3. gDNA de *L. infantum*. PM: marcador de peso molecular de DNA. GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, ready-to-use (Fermentas).

[038] Os gDNAs foram quantificados e a reação de polimerização foi realizada com a enzima Taq DNA polimerase, utilizando-se 100 ng de amostra e os parâmetros de ciclagem padronizados. As figuras 2A, 2B, 2C e 2D mostram que o par de oligonucleotídeos iniciadores Lv175 avaliado para teste diagnóstico molecular é específico para *L. infantum* e pode ser utilizado para diagnóstico molecular de LV.

[039] As Figuras 2A, 2B, 2C e 2D representam o teste de especificidade do par oligonucleotídeos RT36 frente a diferentes amostras.

[040] A Figura 2A representa a amplificação do par de

oligonucleotídeos Lv175, específico para *L. infantum*;

[041] A Figura 2B representa a amplificação do par de oligonucleotídeos GADPH, específico para mamíferos.

[042] A Figura 2C representa a amplificação do par de oligonucleotídeos 18S, específico para a família Trypanosomatidae;

[043] A Figura 2D representa PCR Multiplex com os três pares de oligonucleotídeos, 18S, GADPH e Lv175. Ambos com a mesma sequência das amostras designadas no painel, onde 1.gDNA de *T. brucei*; 2. gDNA de *T. cruzi* (TcI/RON1); 3. gDNA de *T. cruzi* (TcII/Y); 4. gDNA de *T. cruzi* (TcIII/QMM6); 5. gDNA de *T. cruzi* (TcV/QMM7); 6. gDNA de *L. amazonensis*; 7. gDNA de *L. mexicana*; 8. gDNA de *L. infantum*; 9. gDNA de macrófagos; gDNA de macrófagos infectados com *L. infantum*; 10. NTC. PM: marcador de peso molecular de DNA. 50 pb Ladder Sinapse Inc., 50 µg.

[044] É importante ressaltar que não houve amplificação mesmo com o gDNA de *L. mexicana* (figura 2A, poço 7), cuja sequência apresentou 90% de identidade com o gene TGMACK (www.genedb.org). O que confirma a especificidade da região escolhida. Como pode ser observado na figura 2D, é possível realizar a PCR Multiplex com os três pares de oligonucleotídeos utilizados nas demais reações, isso prova que há gDNA de diferentes espécies em cada poço do gel de agarose, confirmando a especificidade do par de oligonucleotídeos Lv175 para amplificar o gDNA de *L. infantum*, com amplicon de 175 pb.

[045] Realizou-se um teste para avaliar a sensibilidade deste ensaio de PCR frente a diferentes concentrações de gDNA de *L. infantum*, ou seja, para avaliar qual o número mínimo de parasitos esta reação é capaz de detectar. Foram feitas reações com diluição seriada na razão 10, partindo-se de 100 ng de gDNA. A figura 3 mostra o

resultado obtido.

[046] Pode-se observar que houve amplificação até 0,001 ng (1 pg) de gDNA (figura 3, poço 5). Considerando 0,12 pg a massa do genoma haplóide para *Leishmania* (LEON et al., 1978) que se trata de um organismo diplóide, e que as bandas dos poços 4 e 5 podem ser observadas; o par de oligonucleotídeos TGMACK foi capaz de detectar o gDNA de cerca de 40 promastigotas. A literatura mostra valores de sensibilidade com detecção de 10 até 1 parasito para reações de PCR reveladas com gel de agarose e detecção de até 0,001 parasito, no caso de ensaios por PCR em tempo real, técnica bastante sensível e que faz parte desta inovação (VERGEL et al, 2005; CHAPPUIS et al., 2007; WEIRATHER et al, 2011; CECCARELLI et al, 2014). Em se tratando de diagnóstico molecular por revelação em gel de agarose, a sensibilidade encontrada está dentro dos padrões para utilização em laboratório. Dessa forma, as análises mostraram que o par de oligonucleotídeos TGMACK é adequado para diagnóstico molecular de LV causada por *L. infantum*, com especificidade e alto grau de sensibilidade.

[047] Posteriormente, a aplicabilidade do método molecular para o diagnóstico, monitoramento e estudos epidemiológicos da infecção com *L. infantum*, proposto nesta inovação, pode ser facilmente demonstrada em amostras do sangue periférico ou tecidos de cães infectados, sintomáticos ou assintomáticos.

[048] Não se tem conhecimento de um kit e método molecular para detecção de LV que reúna conjuntamente, todas as características construtivas e funcionais acima relatadas, e que direta ou indiretamente, é ou foi tão efetivo quanto o kit e método objeto da presente patente.

[049] Tendo sido descrita e ilustrada a presente invenção, é para ser

compreendido que a mesma pode sofrer inúmeras modificações e variações em sua forma de realização, desde que tais modificações e variações não se afastem a partir do espírito e escopo da invenção, tal como definido no quadro reivindicatório.

REIVINDICAÇÕES

- 1 – “KIT E MÉTODO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL”** caracterizado pelo fato de utilizar o par de oligonucleotídeos Lv175 (Forward GTTCGTCACCGTTGTCTTC, Reverse GTC GTG CTT CCT GCT ATT C), desenhado a partir da sequência nucleotídica do gene Lc36, agora denominado TGMACK, na padronização de diagnóstico molecular de LV;
- 2 – “KIT E MÉTODO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL”** caracterizado pelo fato de detectar especificamente DNA genômico da espécie *L. infantum*.
- 3 – “KIT E MÉTODO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL”**, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de, para a espécie *T. cruzi*, ser com base nas cepas pertencentes aos grupos TcI, TcII, TcIII e TcV.

RESUMO

**“KIT E MÉTODO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE
LEISHMANIOSE VISCERAL”**

É descrita a patente de invenção pertencente ao campo dos testes para identificação e controle da LV em animais e humanos, que compreende a utilização do par de oligonucleotídeos Lv175 (Foward GTTCGTCACCGTTGTCTTC, Reverse GTC GTG CTT CCT GCT ATT C), desenhado a partir da sequência nucleotídica do gene Lc36, agora denominado TGMACK, na padronização de diagnóstico molecular de LV, utilizando formas promastigotas dos tripanosomatídeos *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. mexicana* e epimastigotas de *T. cruzi* e *T. brucei*. Para a espécie *T. cruzi*, incluímos no nosso estudo cepas pertencentes aos grupos TcI, TcII, TcIII e TcV (RIMOLDI et al, 2012; ZINGALES et al, 2009).

**“KIT E MÉTODO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE
LEISHMANIOSE VISCERAL”**

CAMPO DE APLICAÇÃO

[001] Trata o presente relatório descritivo da patente de invenção de um kit inédito baseado em método molecular para detecção de leishmaniose visceral utilizada especialmente para identificação e controle da leishmaniose visceral em animais, não excluindo sua potencial aplicação para diagnóstico em humanos, de concepção inovadora e dotado de importantes melhoramentos tecnológicos e funcionais, segundo os mais modernos conceitos de farmacologia e de acordo com as normas e especificações exigidas, revestindo-se de características próprias e dotadas com requisitos fundamentais de novidade e atividade inventiva, fazendo resultar uma série de reais e extraordinárias vantagens técnicas, práticas e econômicas.

ANTECEDENTES DA PRESENTE INVENÇÃO

[002] Como é do conhecimento dos técnicos no assunto, leishmanioses são doenças causadas pelo protozoário parasito que pertence ao gênero *Leishmania*, este por sua vez é transmitido através do repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneo infectadas com o parasito. Essa parasitose atinge 98 países, onde há 350 milhões de pessoas em risco de contraí-la e 12 milhões de casos de infecção (WHO, 2016). Existem aproximadamente 51 espécies de *Leishmania*, sendo que 20 são patogênicas para o homem, e que diferem nas manifestações clínicas provocadas no hospedeiro. Consistindo em três classificações, Leishmaniose Cutânea, Mucocutânea ou Visceral (AKHOUNDI et al., 2016).

[003] A leishmaniose visceral (LV) é a forma clínica mais severa que apresenta maior número de óbitos e possui incidência de 0,2 a 0,4 milhões de casos em todo o mundo. A *Leishmania infantum* é o

agente causador da LV nas Américas, na China e na bacia do Mediterrâneo, tendo o cão como reservatório de importância epidemiológica (MORENO; ALVAR, 2002). Os casos humanos, na maioria das vezes procedem de infecções em cães domésticos, sendo estes os mais próximos ao homem (FRANCA-SILVA et al., 2003; KRAUSPENHAR et al., 2007); portanto, a presença de cães infectados em uma região significa que haverá risco de infecção de humanos por *L. infantum*, tratando-se de um indicativo importante de risco e para o controle epidemiológico, como mencionado anteriormente. Além da presença do vetor e do reservatório, há outros fatores importantes para a progressão da doença, como a imunidade do hospedeiro e a virulência do parasito (ALVAR et al., 2004; KRAUSPENHAR et al., 2007).

[004] Alguns cães apresentam sintomas clínicos, como lesões oculares e na pele, alterações no esqueleto ósseo e emagrecimento. Porém, há os casos não sintomáticos, que por sua vez são os que apresentam maiores dificuldades para identificação da doença. (BANETH; AROCH, 2008). Para o diagnóstico laboratorial de cães assintomáticos ou que apresentam poucos sintomas (oligossintomáticos) são requeridos testes de alta sensibilidade e especificidade. De modo a proporcionar mais sensibilidade aos testes, novas ferramentas baseadas em métodos moleculares estão sendo desenvolvidas (GOMES et al., 2008).

[005] Embora ainda mantenha algumas características rurais, a LV se apresenta em processo de urbanização com significativa expansão geográfica. A grande população de cães que ficam nas ruas dos grandes centros pode abrigar cães assintomáticos que tem grande importância na saúde pública, pois também são fonte de infecção para os flebotomíneos e assim apresentam papel ativo na cadeia de

transmissão da doença (LINDOSO e GOTO, 2006).

[006] O diagnóstico de rotina e de certeza baseia-se em métodos diretos os quais detectam o estágio intracelular do parasito por microscopia em tecido de biópsia ou punção aspirativa do baço, fígado, medula óssea ou linfonodos; sendo demonstrações no sangue periférico e em cultura, métodos também de rotina. No entanto, estes procedimentos invasivos requerem microscopista experiente e não fornecem diagnóstico positivo em todos os casos, pois a distribuição dos parasitos nos tecidos afetados não é homogênea (TRONCARELLI et al, 2009).

[007] Em vista disso, nosso grupo de pesquisa vem estudando proteínas de funções desconhecidas de *L. infantum* para aplicação no diagnóstico sorológico e molecular de LV, a fim de aumentar a especificidade do diagnóstico. O gene Lc36, agora denominado TGMACK (Linj.36.4190), de 2219 pb, localizado no cromossomo 36 de *L. infantum*, codifica para uma proteína hipotética de 739 aminoácidos. Muitas dessas sequências conservadas dentro desse grupo de parasitos são gênero ou, até mesmo, espécie específica e têm sido utilizadas para diagnóstico molecular tanto quantitativo quanto qualitativo (MIRÓ et al., 2008). Dentre as técnicas existentes, a mais específica é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que consiste na amplificação in vitro de regiões específicas do DNA (GOMES et al., 2008; MAIA; CAMPINO, 2008).

[008] O diagnóstico pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), se baseia na detecção de DNA do parasito no hospedeiro, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para diferentes parasitoses e eletroforese em gel de agarose para visualização dos produtos amplificados (REITHINGER e DUJARDIN, 2007). Esta tem sido considerada uma das técnicas mais sensíveis e de considerável valor

para um diagnóstico definitivo (ASSIS et al., 2010), podendo ser empregada como método confirmatório no caso de animais assintomáticos, recém infectados (ainda sem soroconversão) ou com baixa parasitemia (ALVES e BEVILACQUA, 2004). A PCR em tempo real baseia-se no uso das mesmas regiões gênicas espécie-específicas e amostras, e utiliza corantes ou sondas fluorescentes durante a amplificação para quantificação do parasito. Pode ser aplicada tanto na investigação epidemiológica, quanto no diagnóstico molecular (VANGUILDER et al, 2008; PAIVA-CAVALCANTI, REGIS-DA-SILVA e GOMES, 2010). Essa técnica além de apresentar maior especificidade, possui a capacidade de quantificar a carga parasitária presente na amostra. Sendo atualmente, o principal alvo de estudo para melhoramento do diagnóstico em cães assintomáticos infectados com *L. infantum* (GOMES et al., 2008; MAIA; CAMPINO, 2008).

[009] Sendo assim, objetiva-se neste estudo avaliar a potencial aplicação do gene TGMACK para utilização em diagnóstico molecular e investigação epidemiológica de leishmaniose visceral humana e canina, por meio das técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real.

[010] O controle epidemiológico das leishmanioses depende da correta identificação de cães infectados. No entanto o diagnóstico clínico da LVC é difícil de ser realizado devido a pouca especificidade dos sintomas (apatia, perda de apetite, emagrecimento rápido, feridas na pele, perda de pêlos, crescimento anormal das unhas, hepatoesplenomegalia, problemas oculares, diarreia, vômito e sangramento intestinal), que pode ser confundido com outras doenças, tais como brucelose, babesiose, toxoplasmose, dirofilariose canina, entre outras; além de ser perceptível apenas nos casos avançados ou em situações epidêmicas (TRONCARELLI et al., 2009;

PATTABHI et al, 2010).

[011] Técnicas baseadas em análise de DNA estão sendo cada vez mais utilizadas no diagnóstico e caracterização de espécies de *Leishmania*, devido ao aumento do número de sequências do parasito nos bancos de dados. Essas técnicas apresentam alto nível de acurácia, no entanto ainda têm sido utilizadas de forma modesta no Brasil (SALOTRA et al, 2001; ROLÃO et al, 2004; HIRSCHMANN et al, 2015).

[012] A detecção de *Leishmania* spp. tem sido feita pela amplificação de regiões específicas do DNA do cinetoplasto (kDNA) e genes que codificam para regiões como RNA ribossomal 18S, DNA polimerase alfa, G6PDH (glicose-6-fosfato desidrogenase), GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e hexoquinase (FERNANDES et al., 1993; PRINA et al., 2007; GALLETTI et al., 2011).

[013] No diagnóstico de rotina, a detecção de DNA de *Leishmania* spp. pelas técnicas de PCR pode ser realizada em diferentes amostras clínicas com elevadas sensibilidade e especificidade (FRANCINO et al., 2006; GALLETTI et al., 2011).

[014] Amostras de sangue periférico para diagnóstico por técnicas de PCR têm sido estudadas mostrando-se eficientes, como descrito previamente por SPANAKOS e colaboradores que em 2002 propuseram o uso da sequência conservada ssu-RNA de *Leishmania infantum* para detecção por PCR em amostras de sangue de pacientes com a LV, obtendo uma detecção de 10 parasitos para cada mililitro de sangue, quantidade considera satisfatória para a tecnologia. Em 2008, o mesmo grupo, usando sequências específicas para os genes 18S e 5S ribossomal (conservados em espécies de *Leishmania*) , mostraram a eficiência do diagnóstico de LV causada por *L. infantum* por técnicas de PCR; principalmente em amostras de sangue periférico

(SPANAKOS et al, 2002; SPANAKOS et al, 2008). Estudos com reações multiplex envolvendo a detecção simultânea de bactérias (*Bacillus anthracis* e *Yersinia pestis*) e um dos agentes etiológicos da LV, *L. donovani*, foram bem sucedidos em ensaios de PCR e em ensaios de PCR em tempo real, usando os oligonucleotídeos separadamente e SYBR Green como agente intercalante de DNA. A sensibilidade dos ensaios com amostras de sangue de 11 pacientes positivos para LV foi de 100% (SELVAPANDIYAN et al, 2005).

[015] O diagnóstico sorológico da LVC pelos testes atualmente disponíveis apresenta problemas em relação à detecção de cães assintomático, com baixa parasitemia ou que já foram imunizados, apresentando resultados variáveis; o que compromete o controle da doença em cães e, conseqüentemente, favorece a transmissão desta parasitose ao homem. Como mostra estudo desenvolvido por INIESTA e colaboradores em 2002, que comparou diferentes técnicas para detecção de leishmaniose críptica em áreas endêmicas para *Leishmania infantum*; técnicas imunológicas (ELISA, RIFI, Western blotting, Reação de hipersensibilidade pós-tratamento e ensaio de proliferação de linfócito in vitro) não diferenciam de forma clara cães não infectados de cães infectados assintomáticos, enquanto que a cultura do parasito e técnicas de PCR são mais confiáveis para o diagnóstico definitivo (INIESTA et al, 2002) e são capazes de detectar cães tanto sintomáticos quanto assintomáticos (SOARES et al, 2005). Sendo assim, torna-se necessária a busca de novas ferramentas que possam ser utilizados como alternativas no diagnóstico desses animais. E também a técnica apresentada pode ser utilizada para diagnosticar humanos com leishmaniose visceral.

[016] Sendo os flebotomíneos o principal elo para a transmissão da leishmaniose visceral entre animais e seres humanos e, sabendo-se

que nas Américas já existem aproximadamente 500 espécies descritas, a identificação das espécies envolvidas é relevante do ponto de vista epidemiológico e, conseqüentemente, controle. Na América do Sul, a espécie de flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* foi considerada por muito tempo a única transmissora da leishmaniose visceral. Entretanto, outras espécies como *Lutzomyia evansi* (MONTROYA-LERMA et al., 2003) e *Lutzomyia cruzi* (SANTOS et al., 1998) já foram incriminadas na transmissão dessa parasitose.

[017] Um dos critérios para incriminação de uma espécie de flebotomíneo como vetor da leishmaniose é o encontro do parasito no inseto. Esse processo pode ser direto, pela dissecação do insetos e observação em microscópio para a busca do parasito, ou indireto por meios moleculares. Os métodos moleculares são vantajosos em relação à observação direta basicamente por dois motivos: a) podem haver outros parasitos flagelados no intestino dos insetos, que não as *Leishmanias* spp, que são morfologicamente indistinguíveis; b) em condições de campo, o grande número de exemplares capturados inviabiliza a dissecação individual (KÁRITA et al., 2014). Inúmeros estudos têm utilizado os marcadores moleculares para avaliar taxas de infecção natural em *L. longipalpis* em campo (PAIVA et al., 2006; SOARES et al., 2010; CUNHA et al., 2014).

[018] Em estudo com diferentes marcadores moleculares utilizados na identificação de *L. infantum* em flebotomíneos, o marcador para kDNA foi melhor em relação aos genes que codificam o mini-exon ou RNA ribossomal (KÁRITA et al., 2014). Observa-se assim, que a identificação de novos marcadores de *L. infantum* será útil tanto para os hospedeiros vertebrados, quanto para os invertebrados.

ESTADO DA TÉCNICA

[019] O documento de patente WO2016005517 depositado em

09/07/2014 ensina um método de detecção de sequências do DNA para a identificação de leishmaniose. Tal processo utiliza a análise de sinais eletroquímicos.

[020] O documento de patente CN103409502 depositado em 21/05/2013 descreve um kit de identificação patogênica composto por diversas sondas utilizadas para cada uma das patogenias.

[021] O documento de patente CN101921862 depositado em 01/09/2010 ensina um kit de identificação de leishmaniose em insetos através da utilização de identificadores genéticos.

[022] O documento de patente BR 10 2012 026282 7 depositado em 15/10/2012 ensina um kit molecular destinado ao diagnóstico diferencial do gênero *Leishmania* spp., sendo descrito meios pelos quais o referido kit torna uma potente ferramenta para o diagnóstico laboratorial e epidemiológico. A liofilização prévia dos reagentes da PCR multiplex é uma etapa que permite a conservação da mistura dos mesmos por longos períodos de tempo acelerando o processo de diagnóstico, minimizando custos e facilitando a rotina laboratorial. Esta liofilização pode ser aplicada ao diagnóstico de quaisquer parasitoses apenas pela substituição dos oligonucleotídeos específicos. Os resultados do referido kit molecular liofilizado demonstraram a amplificação de regiões únicas do DNA dos parasitos que causam as diferentes manifestações clínicas das leishmanioses, produzindo bandas de fácil distinção na eletroforese em gel de agarose.

[023] Analisando os objetos dos documentos acima citados e conhecidos do estado da técnica, como poderá ser observado, tratam-se de tecnologias diversas da presente patente, de modo que nenhum apresenta integralmente as características construtivas do kit e método molecular para detecção de LV, objeto da presente patente.

[024] É, pois, um dos objetivos da presente patente prover uma tecnologia que fornece um método molecular para diagnosticar precocemente a LV e que compreende: a) o uso de um par de oligonucleotídeos iniciadores que amplificam especificamente uma região do gene TGMACK de *L. infantum* (syn. *L. chagasi*). b) a partir do uso de DNAs genômicos provenientes de amostras biológicas infectadas por *L. infantum*. C) avaliações qualitativas e quantitativas de amostras biológicas infectadas provenientes de cães e de humano de forma espécie-específica. D) o uso das técnicas de PCR convencional e em tempo real.

[025] A amplificação do gene TGMACK poderá ser empregada na indústria biotecnológica como componentes de kits diagnósticos para detecção do DNA genômico de *L. infantum*, causadora da LV humana e canina, através das técnicas de PCRs convencional ou Tempo Real. Sua aplicação poder ser realizada tanto para diagnosticar cães com suspeitas clínicas de leishmaniose, quanto para triagem epidemiológica (para identificação de reservatórios, vetores e hospedeiros infectados) fato este de extrema importância no âmbito de saúde pública. Além disso, também pode ser utilizada no diagnóstico da LV em humanos.

[026] Com relação ao vetor, será relevante para estudos epidemiológicos: a avaliação das taxas de infecção em seu principal vetor, *Lutzomyia longipalpis*.

[027] É de extrema necessidade que kits diagnósticos mais confiáveis para leishmanioses sejam disponibilizados no mercado, uma vez que os testes atualmente utilizados para detecção de soros positivos apresentam limitações quanto à sensibilidade e especificidade, o que compromete o controle da doença e favorece sua transmissão. Dessa forma, é possível afirmar que o mercado está pronto para receber e

absorver tal tecnologia.

[028] Atualmente existem dois kits diagnósticos disponíveis para leishmaniose visceral canina: EIE-Leishmaniose-Visceral-Canina-Biomanguinhos (EIE-LVC) e IFI-Leishmaniose-Canina-Biomanguinhos (IFI-LVC), sendo este último considerado padrão-ouro pelo Ministério da Saúde, Portaria nº 1943 (Doenças de Notificação obrigatória em todo território Nacional). O teste de ELISA é sensível, e permite a detecção de baixos títulos de anticorpos, mas é pouco preciso na detecção de casos subclínicos ou assintomáticos. Outros testes utilizados são o RIFI, RFC, e o teste rápido imunocromatográfico, porém estas técnicas possuem baixa especificidade e muitas delas não são espécie-específicas, podendo gerar resultado falso-positivo.

[029] Segundo o Ministério da Saúde, o diagnóstico molecular pode ser feito utilizando DNA extraído de fragmento de pele, mucosa, sangue periférico, medula óssea ou órgãos do sistema fagocítico-mononuclear. Portanto, a ideia motora do referido trabalho é utilizar DNA extraído do sangue periférico e outros tecidos de cães infectados com *L. infantum*, ou com suspeita de infecção, assim como utilização na triagem epidemiológica, sendo esta com impacto na saúde pública. Além disso, o seu emprego no diagnóstico molecular em LV humana e insetos vetores. Essa técnica proposta difere das outras existentes por possuir alta especificidade para a espécie causadora da LV, sendo um grande potencial para diagnóstico laboratorial da doença, eliminando os resultados falso-positivos que acarretam em mortes de animais sadios.

[030] Esta patente relata a utilização do par de oligonucleotídeos Lv175 (Foward GTTCGTCACCGTTGTCTTC, Reverse GTC GTG CTT CCT GCT ATT C), desenhado a partir da sequência nucleotídica do gene Lc36, agora denominado TGMACK, na padronização de

diagnóstico molecular de LV. Nos ensaios utilizaram-se formas promastigotas dos tripanosomatídeos *L. infantum*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania mexicana* e epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*. Para a espécie *T. cruzi*, incluímos no nosso estudo cepas pertencentes aos grupos TcI, TcII, TcIII e TcV (RIMOLDI et al, 2012; ZINGALES et al, 2009).

[031] Realizou-se também a infecção de macrófagos murinos peritoniais com formas promastigotas de *L. infantum* para avaliação da eficiência do teste em amastigotas intracelulares na presença de gDNA de mamífero. A infecção foi realizada como descrito por DOS SANTOS (2013), com algumas modificações: após o tempo de incubação para adesão dos macrófagos, o meio RPMI foi descartado e foi realizada a infecção dos macrófagos com formas promastigotas de *L. infantum* em fase logarítmica. A infecção foi feita na proporção de 10 promastigotas para cada macrófago. Após esse período, o meio foi retirado das garrafas, as células lavadas e ressuspensas em PBS 1X por raspagem com auxílio de *scraper* estéril.

[032] O DNA genômico (gDNA) das diferentes espécies foi extraído com o Pure Link® Kit DNA extraction (Life Technologies) conforme especificações do fabricante. A integridade do gDNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

[033] Realizaram-se ensaios de PCR com o par de oligonucleotídeos supracitado (Lv175), utilizando-se a enzima Taq DNA polimerase (Thermo Scientific®) em aparelho termociclador Amplitherm Thermal Cyclers (Ideal Lab) e a ciclagem foi padronizada para os oligonucleotídeos em questão respeitando a temperatura de anelamento entre 45-60°C. As amplificações foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose 3% (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[034] Para complementar a presente descrição, de modo a obter uma melhor compreensão das características da presente patente, e de acordo com uma preferencial realização prática da mesma, acompanha a descrição, em anexo, um conjunto de figuras, onde de maneira exemplificada embora não limitativa, se representa o seguinte:

[035] As figuras 1A e 1B confirmam a integridade das amostras por eletroforese em gel de agarose 1%; As Figuras 1A e 1B são produtos de extração de DNA genômico de tripanossomatídeos, macrófagos murinos.

[036] Na Figura 1A tem-se que: 1. gDNA de *T. brucei*; 2. gDNA de *T. cruzi* (Tcl/RON1); 3. gDNA de *T. cruzi* (TclII/Y); 4. gDNA de *T. cruzi* (TclIII/QMM6); 5. gDNA de *T. cruzi* (TcV/QMM7); 6. gDNA de *L. amazonensis*; 7. gDNA de *L. mexicana*; 8. gDNA de *L. infantum*.

[037] Na Figura 1B tem-se que: 1. gDNA de macrófagos murinos; 2. gDNA de macrófagos murinos infectados com *L. infantum*; 3. gDNA de *L. infantum*. PM: marcador de peso molecular de DNA. GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, ready-to-use (Fermentas).

[038] Os gDNAs foram quantificados e a reação de polimerização foi realizada com a enzima Taq DNA polimerase, utilizando-se 100 ng de amostra e os parâmetros de ciclagem padronizados. As figuras 2A, 2B, 2C e 2D mostram que o par de oligonucleotídeos iniciadores Lv175 avaliado para teste diagnóstico molecular é específico para *L. infantum* e pode ser utilizado para diagnóstico molecular de LV.

[039] As Figuras 2A, 2B, 2C e 2D representam o teste de especificidade do par oligonucleotídeos RT36 frente a diferentes amostras.

[040] A Figura 2A representa a amplificação do par de

oligonucleotídeos Lv175, específico para *L. infantum*;

[041] A Figura 2B representa a amplificação do par de oligonucleotídeos GADPH, específico para mamíferos.

[042] A Figura 2C representa a amplificação do par de oligonucleotídeos 18S, específico para a família Trypanosomatidae;

[043] A Figura 2D representa PCR Multiplex com os três pares de oligonucleotídeos, 18S, GADPH e Lv175. Ambos com a mesma sequência das amostras designadas no painel, onde 1.gDNA de *T. brucei*; 2. gDNA de *T. cruzi* (TcI/RON1); 3. gDNA de *T. cruzi* (TcII/Y); 4. gDNA de *T. cruzi* (TcIII/QMM6); 5. gDNA de *T. cruzi* (TcV/QMM7); 6. gDNA de *L. amazonensis*; 7. gDNA de *L. mexicana*; 8. gDNA de *L. infantum*; 9. gDNA de macrófagos; gDNA de macrófagos infectados com *L. infantum*; 10. NTC. PM: marcador de peso molecular de DNA. 50 pb Ladder Sinapse Inc., 50 µg.

[044] É importante ressaltar que não houve amplificação mesmo com o gDNA de *L. mexicana* (figura 2A, poço 7), cuja sequência apresentou 90% de identidade com o gene TGMACK (www.genedb.org). O que confirma a especificidade da região escolhida. Como pode ser observado na figura 2D, é possível realizar a PCR Multiplex com os três pares de oligonucleotídeos utilizados nas demais reações, isso prova que há gDNA de diferentes espécies em cada poço do gel de agarose, confirmando a especificidade do par de oligonucleotídeos Lv175 para amplificar o gDNA de *L. infantum*, com amplicon de 175 pb.

[045] Realizou-se um teste para avaliar a sensibilidade deste ensaio de PCR frente a diferentes concentrações de gDNA de *L. infantum*, ou seja, para avaliar qual o número mínimo de parasitos esta reação é capaz de detectar. Foram feitas reações com diluição seriada na razão 10, partindo-se de 100 ng de gDNA. A figura 3 mostra o

resultado obtido.

[046] Pode-se observar que houve amplificação até 0,001 ng (1 pg) de gDNA (figura 3, poço 5). Considerando 0,12 pg a massa do genoma haplóide para *Leishmania* (LEON et al., 1978) que se trata de um organismo diplóide, e que as bandas dos poços 4 e 5 podem ser observadas; o par de oligonucleotídeos TGMACK foi capaz de detectar o gDNA de cerca de 40 promastigotas. A literatura mostra valores de sensibilidade com detecção de 10 até 1 parasito para reações de PCR reveladas com gel de agarose e detecção de até 0,001 parasito, no caso de ensaios por PCR em tempo real, técnica bastante sensível e que faz parte desta inovação (VERGEL et al, 2005; CHAPPUIS et al., 2007; WEIRATHER et al, 2011; CECCARELLI et al, 2014). Em se tratando de diagnóstico molecular por revelação em gel de agarose, a sensibilidade encontrada está dentro dos padrões para utilização em laboratório. Dessa forma, as análises mostraram que o par de oligonucleotídeos TGMACK é adequado para diagnóstico molecular de LV causada por *L. infantum*, com especificidade e alto grau de sensibilidade.

[047] Posteriormente, a aplicabilidade do método molecular para o diagnóstico, monitoramento e estudos epidemiológicos da infecção com *L. infantum*, proposto nesta inovação, pode ser facilmente demonstrada em amostras do sangue periférico ou tecidos de cães infectados, sintomáticos ou assintomáticos.

[048] Não se tem conhecimento de um kit e método molecular para detecção de LV que reúna conjuntamente, todas as características construtivas e funcionais acima relatadas, e que direta ou indiretamente, é ou foi tão efetivo quanto o kit e método objeto da presente patente.

[049] Tendo sido descrita e ilustrada a presente invenção, é para ser

compreendido que a mesma pode sofrer inúmeras modificações e variações em sua forma de realização, desde que tais modificações e variações não se afastem a partir do espírito e escopo da invenção, tal como definido no quadro reivindicatório.

REIVINDICAÇÕES

- 1 – “KIT E MÉTODO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL”** caracterizado pelo fato de utilizar o par de oligonucleotídeos Lv175 (Forward GTTCGTCACCGTTGTCTTC, Reverse GTC GTG CTT CCT GCT ATT C), desenhado a partir da sequência nucleotídica do gene Lc36, agora denominado TGMACK, na padronização de diagnóstico molecular de LV;
- 2 – “KIT E MÉTODO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL”** caracterizado pelo fato de detectar especificamente DNA genômico da espécie *L. infantum*.
- 3 – “KIT E MÉTODO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL”**, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de, para a espécie *T. cruzi*, ser com base nas cepas pertencentes aos grupos TcI, TcII, TcIII e TcV.

RESUMO

**“KIT E MÉTODO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE
LEISHMANIOSE VISCERAL”**

É descrita a patente de invenção pertencente ao campo dos testes para identificação e controle da LV em animais e humanos, que compreende a utilização do par de oligonucleotídeos Lv175 (Foward GTTCGTCACCGTTGTCTTC, Reverse GTC GTG CTT CCT GCT ATT C), desenhado a partir da sequência nucleotídica do gene Lc36, agora denominado TGMACK, na padronização de diagnóstico molecular de LV, utilizando formas promastigotas dos tripanosomatídeos *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. mexicana* e epimastigotas de *T. cruzi* e *T. brucei*. Para a espécie *T. cruzi*, incluímos no nosso estudo cepas pertencentes aos grupos TcI, TcII, TcIII e TcV (RIMOLDI et al, 2012; ZINGALES et al, 2009).

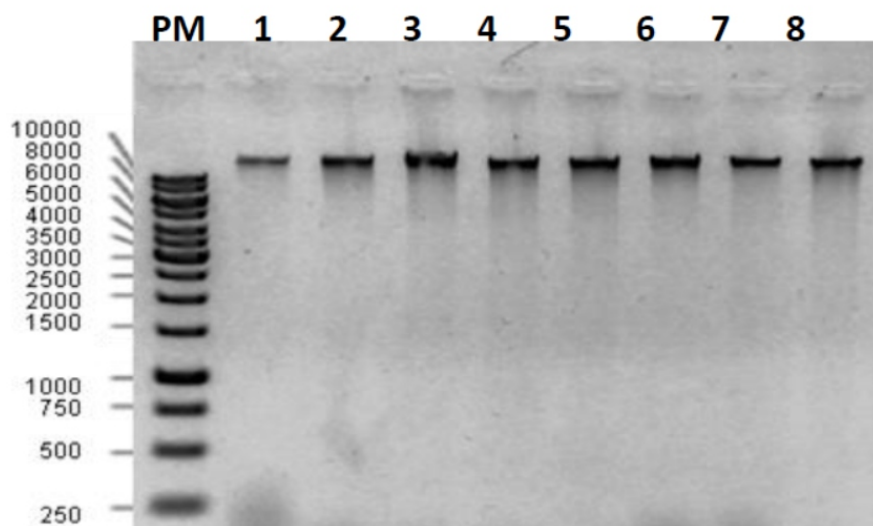


Fig. 1A

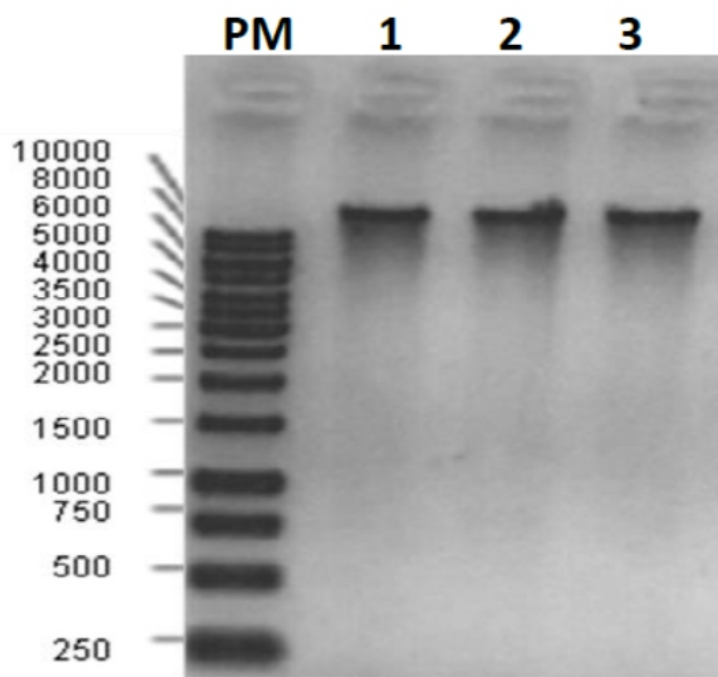


Fig. 1B

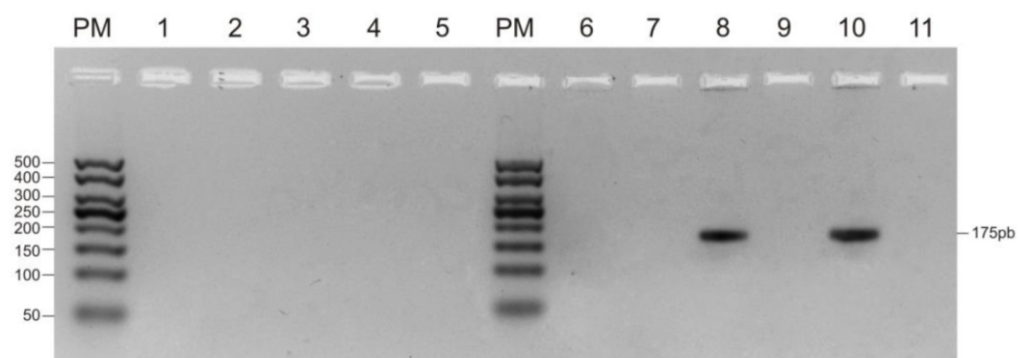


Fig. 2A

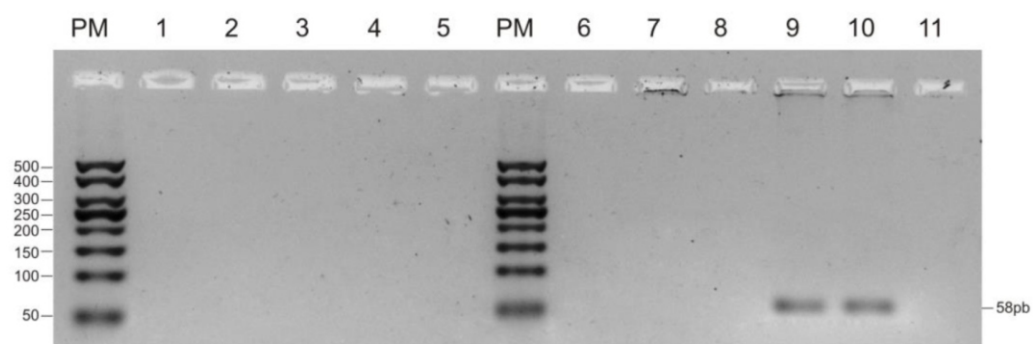


Fig. 2B

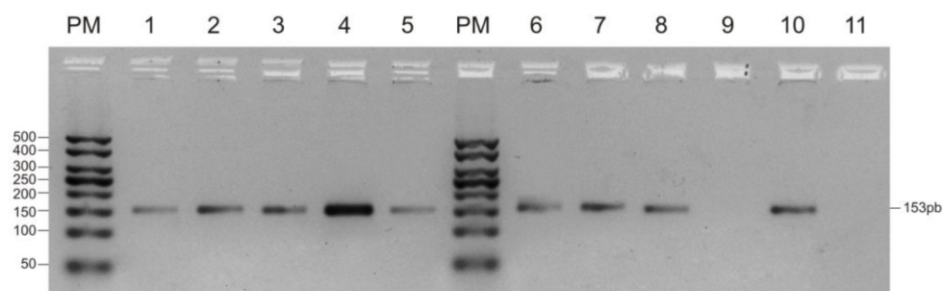


Fig. 2C

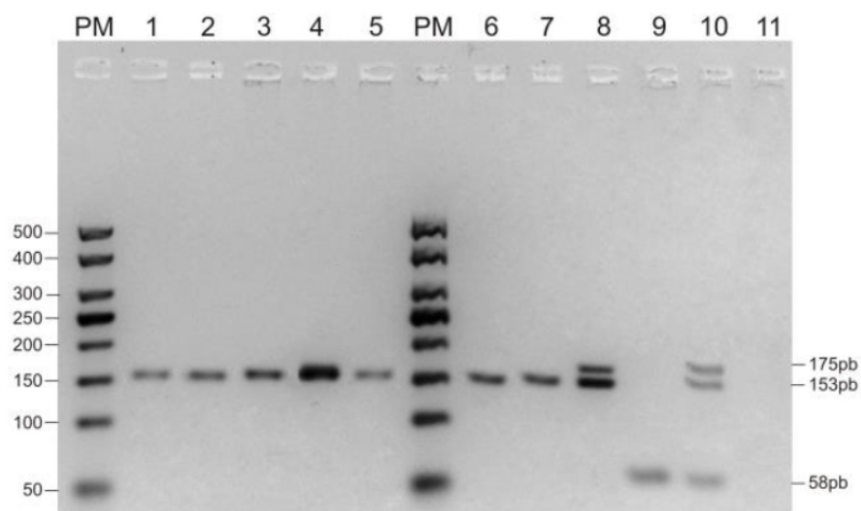


Fig. 2D

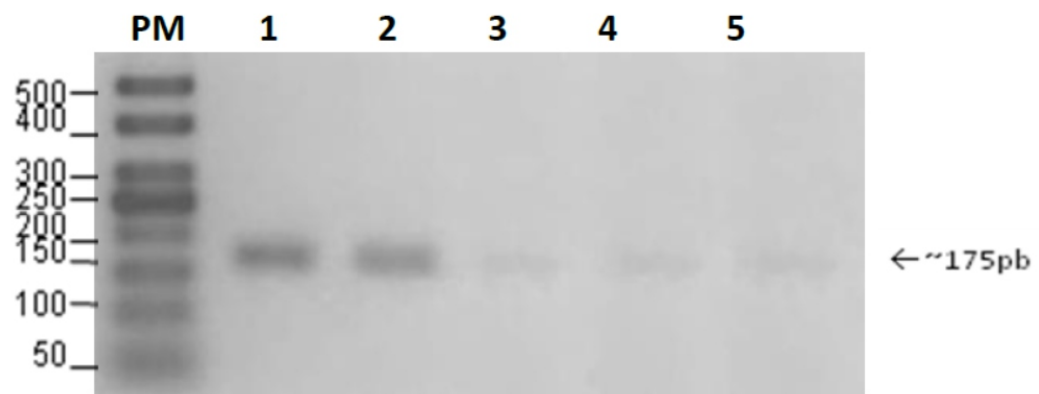


Fig. 3

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Sequência TGMACK .txt
- Data de Geração do Código: 09/08/2017
- Hora de Geração do Código: 20:46:37
- Código de Controle:
 - Campo 1: CA6E85C2D2436CE9
 - Campo 2: 1115A0BF06BC0D0F