

THAIS FERREIRA ISABEL

**Leishmaniose Visceral canina:
Clonagem e expressão das proteínas
Lc24 e Lc36 de *L. chagasi* com
potencial aplicação no diagnóstico e
desenvolvimento de vacina.**

Araraquara

2010

Thais Ferreira Isabel

Leishmaniose Visceral canina: Clonagem e expressão das proteínas Lc24 e Lc36 de *L. chagasi* com potencial aplicação no diagnóstico e desenvolvimento de vacina.

Tese apresentada ao Programa de Biociências e
Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, subárea
Imunologia, da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para obtenção
do Título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa

Co-orientadora: Prof. Dra. Márcia Ap. Silva Graminha

Araraquara

2010

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

- I74L Isabel, Thais Ferreira
Leishmaniose visceral canina: clonagem e expressão das proteínas Lc24 e Lc36 de *L.chagasi* com potencial aplicação no diagnóstico e desenvolvimento de vacina. / Thais Ferreira Isabel. – Araraquara, 2010
107 f.
- Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia
Orientador: Paulo Inácio da Costa
Co-orientador: Márcia Aparecida Silva Graminha
1. *Leishmania infantum* (syn+chagasi). 2. Leishmaniose visceral canina. 3. Proteínas recombinantes. 4. Imunorreatividade. I. Costa, Paulo Inácio, orient. II. Graminha, Márcia Aparecida, co-orient.. III. Título.

CAPES: 40300005

THAIS FERREIRA ISABEL

Tese apresentada ao Programa de Biociências e
Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, subárea
Imunologia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do Título de Doutor.

Ara raquara, 29 de Novembro de 2010

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara.

Prof. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes
Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, São Carlos

Prof. Dr. Marco Tulio Alves da Silva
Universidade de São Paulo – USP, São Carlos

Prof. Dra. Silmara Marques Allegretti
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas

Prof. Dra. Mara Cristina Pinto
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara.

DEDICATÓRIA

Á Deus pela benção da vida.

Aos meus maiores incentivadores:
Meus pais Antonio e Silvia,
Meu irmão Tiago,
Minha avó Margarida,
Meu fiel amigo Nicolau.

Ao Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa e
Prof. Dra. Márcia Graminha.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar sabedoria e força para sempre lutar e nunca desistir.

Ao Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa, pela orientação, incentivo, pelos grandiosos ensinamentos e por confiar em minha capacidade.

A Prof. Dra. Márcia Graminha pela imensa colaboração, ajuda, correções, pela sua enorme paciência e pelos adoráveis e divertidos momentos de descontração.

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva pela imensa colaboração, pela grande oportunidade, incentivo e pelas imprescindíveis ideias.

Ao amigo e professor Wilson Malagó-Junior pelas risadas, paciência, ensinamentos e sua enorme, colaboração, sem o qual este trabalho não se realizaria.

A meus pais, Antonio e Silvia, pela vida, amor, compreensão e por estarem sempre a meu lado, por me apoiarem em todos momentos de minha vida.

A meu irmão Tiago, pela amizade, companheirismo, incentivo, lealdade e amor.

A minha avó Margarida, pelo seu amor, atenção e cuidado.

Ao meu fiel amigo Nicolau, que não está mais presente, mas que para sempre vou amar e nunca me esquecer dos tantos momentos de alegria e lealdade.

Aos meus amados amigos: Caito, Caroline, Helen, Marília, Priscila, Rodrigo, Rosalba, Sander e Tatiane pela amizade verdadeira e incondicional, por todos nossos momentos de alegria, apoio e união.

As minhas queridas amigas e companheiras de bancada Ana Carolina e Thalita pelos divertidos momentos no laboratório e nos congressos, pela ajuda e pela paciência.

A Dra Isabel Martinez pela sua paciência em me ensinar, pelos seus conselhos e carinho.

Ao Fernando pelos sequenciamentos realizados e pelos valorosos ensinamentos.

A Prof Dra Mara Cristina Pinto pelas valiosas dicas na qualificação e na defesa da tese, pela amizade e ensinamentos.

Aos professores doutores Andrea Soares da Costa Fuentes, Silmara Marques Allegretti e Marco Túlio Alves da Silva pela participação na defesa da tese e pelos seus valiosos conselhos, correções e ajuda.

A todos do laboratório de Parasitologia da UNESP, Araraquara-SP, pelo carinho, pelos momentos de descontração e atenção.

A todos do Laboratório de Biologia Molecular da UFSCar, São Carlos-SP, pelo fundamental auxílio e pela divertida companhia no dia a dia.

A Dra Daniela Luz Ambrósio e ao Dr Marco Tulio Alves da Silva pelos ensinamentos, pela paciência e pela bondade em querer me ensinar Biologia Molecular.

A Prof Dra Regina Cicareli, pelo grande apoio técnico.

A Dra. Rita Maria da Silva do Instituto Adolpho Lutz, Rio Claro-SP, pela imensa ajuda e pelo seu carinho e atenção.

Ao serviço de doação de amostras, *Leishmania* Type Culture Collection - LTCC - WDCM 731, Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz pelas cepas de *L. chagasi*.

Ao Laboratório de Parasitologia da UNESP de Jaboticabal-SP pela doação dos pools de soros de cães sem o qual este trabalho não se concretizaria.

A Prof. Dra Iracilda Zeppone Carlos pelos esclarecimentos e por sua grande ajuda.

Ao Prof. João Aristeu pela sua amizade, ensinamentos, conselhos e sua enorme paciência.

Ao Erik pela imensa ajuda nas figuras e por sua boa vontade em me ajudar.

Ao Henrique pela sua amizade, conselhos e suas dicas em inglês.

As secretárias da pós-graduação pelos serviços prestados, pela simpatia e pela eficiência em todas as situações.

A todos aqueles que não citados nominalmente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Multa espendio siunt quae signibus ardua videntur
(A persistência supera o que os fracos consideram impossível)
(Tácito)

RESUMO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é a forma clínica mais severa da doença e pode ser fatal se não tratada. Um diagnóstico específico e acurado é requerido para a identificação de cães infectados a fim de promover um melhor controle epidemiológico e tratamento adequado. O desenvolvimento de um teste diagnóstico mais específico é importante, especialmente no Brasil onde os animais infectados são eutanaziados. Diversos pesquisadores discordam quanto à especificidade dos testes atualmente utilizados. Este trabalho reporta o isolamento, expressão e teste de dois genes específicos de *Leishmania infantum* (*syn* = *chagasi*), como potencial epítipo para desenvolvimento de um novo método diagnóstico e vacina. Os genes denominados Lc 24 e Lc 36 foram amplificados com *primers* específicos, clonados e expressos em *E. coli*. As proteínas recombinantes rLc 24 e rLc 36 foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de GST. Diferentes concentrações das proteínas foram testadas por *Dot Blot* usando um pool de soros de cães infectados com leishmaniose visceral e um pool de soro de cães não infectados. Concentrações das proteínas a 0,1 e 0,01µg/mL foram detectadas no ensaio, mostrando que as proteínas rLc 24 e rLc 36 são imunorreativas e apresentam potencial para serem usadas em novos testes diagnósticos e desenvolvimento de vacina.

Palavras chave: *Leishmania infantum* (*syn*= *chagasi*), cães, proteínas recombinantes, dot blot, imunorreativa.

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is the most severe clinical form of the disease and can be fatal if untreated. A specific and accurate diagnosis is required for the identification of infected dogs to provide better epidemiological control and earlier treatment. The more accurate diagnosis test is important especially in Brazil where infected animals are euthanized. Discordance among investigators regarding the accuracy of the tests currently employed for this purpose. This work reports the isolation, expression and test of two specific genes of *Leishmania infantum* (syn = *chagasi*), as a potential epitope for the development of a new diagnosis method and vaccine. The partial sequence of the genes rLc 24 and rLc36 was amplified with specific primers, cloned, and expressed in *E. coli*. The rLc 24 and rLc36 recombinant proteins were purified by GST affinity chromatography. Different concentrations of proteins were tested by Dot blot using a serum pool from infected dogs with leishmaniasis and a serum pool from dogs not infected. The protein concentrations of 0,1 and 0,01µg/mL were detected in the dot blot tests, showing that the protein rLc36 is immunoreactive and has potential to be used in new diagnosis tests and development of vaccine.

Key words: *Leishmania infantum* (syn= *chagasi*), dogs, recombinant protein, dot blot, immunoreaction.

ABREVIATURAS E SIGLAS

μL - microlitro
μm - micrometro
°C - Graus Celsius
CaCl₂ - Cloreto de cálcio
DAT Teste de aglutinação direta
DNA Ácido desoxiribonucleico
dNTP - Desorribonucleotídeo trifosfatado
DO - Densidade óptica
EDTA - Ácido etileno diamino tetraacético
ELISA - *Enzyme linked immunosorbent assay*
FCFar - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-SP
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz
FML - Fucose Manose Ligante
GST - Glutathione S-transferase
IgG - Imunoglobulina da classe G
gDNA Ácido desoxiribonucleico genômico
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
KDa - Kilo Dalton
KCl – Cloreto de potássio
LB - Meio Luria-Bertani
LIT - Infusão de Fígado e Tryptose
LC - Leishmaniose cutânea
LDC - Leishmaniose cutânea difusa
LMC - Leishmaniose mucocutânea
LV - Leishmaniose visceral
LVC - Leishmaniose visceral canina
LVH - Leishmaniose visceral humana
MgCl₂ – Cloreto de magnésio
mL - Mililitro
mM - Milimolar
NaCl – Cloreto de sódio
NaOH – Hidróxido de sódio
Na₂HPO₄ – Fosfato ácido de sódio
ng - Nanogramas
OMS - Organização Mundial de Saúde
PBS - Salina tamponada com fosfato
pH - Potencial Hidrogênio
qsp - quantidade suficiente para
RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta
RPM - rotações por minuto
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE - Gel de poliacrilamida com SDS
Syn - Sinônimo
TAE – Tampão Tris-acetato EDTA
TR - Tandem Repeat
UNESP - Universidade Estadual Paulista
xg - rotação
WHO - Organização Mundial de Saúde
UV - Luz ultravioleta
X-gal - *Bromo-chloro-indolyl-galactopyranoside*

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Categorias utilizadas em sistemática (Segundo o Comitê de Sistemática e Evolução da Sociedade de Protozoologia, 1980)	5
Tabela 2. Linhagens de <i>E. coli</i>	27
Tabela 3. Plasmídeos utilizados	28
Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes de interesse	30
Tabela 5. Polipeptídeos selecionados através de ferramentas de bioinformática. Peso molecular (kDa) das proteínas selecionadas. Tamanho das amostras em pares de bases (pb) e peso molecular em kilo Dalton (kDa). O peso molecular do pET 42a é de 27KDa	51

INDICE FIGURAS

Figura 1. Esquema do ciclo de vida da Leishmaniose visceral	10
Figura 2. Distribuição geográfica da leishmaniose visceral no mundo, segundo a Organização Mundial de Saúde	14
Figura 3. Mapas dos plasmídeos. Painel A: Plasmídeo pTZ57 R/T. Painel B: pET 42a	28
Figura 4. Análise de bioinformática para detecção de sequências repetitivas. http://tandem.bu.edu/trf/trf.html	49
Figura 5. Predição de epítomos utilizando o programa Bepipred (http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input). Representado em amarelo, potencial epítopo (acima da linha)	50
Figura 6. Hidrofilicidade das sequências das proteínas de interesse (http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input). A região hidrofílica está representada acima da linha em vermelho e corresponde a região selecionada para desenho dos oligonucleotídeos	51
Figura 7. Análise da qualidade do DNA através de eletroforese em gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo. 1: padrão de peso molecular (<i>1kb Ladder</i> , Fermentas). 2. gDNA de <i>L. infantum</i> (<i>syn= L. chagasi</i>) (10ng/μl)	52
Figura 8. Produtos de amplificação dos fragmentos Lc 06, Lc22, Lc24 e Lc36. Eletroforese em gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo. Painel A: 1 - Produto de amplificação do fragmento Lc 06; 2 - Produto de amplificação do fragmento Lc 22; 3 - Produto de amplificação do fragmento Lc 22 maior. Painel B: 4 – Controle negativo; 5 - Produto de amplificação do fragmento Lc 24. 6 - Produto de amplificação do fragmento Lc 36. 1Kb: Peso molecular 1Kb Gene Ruller (Fermentas)	54
Figura 9. Fragmentos dos produtos de amplificação após purificação. Eletroforese em gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo. Painel A: 1 - Lc 06; 2 - Lc 22 menor; 3 - Lc 22 maior. Painel B: 4 - Lc 24; 5 - Lc 36. 1Kb: Padrão de peso molecular 1Kb <i>Gene Ruller</i> (Fermentas)	54
Figura 10. Amplificação dos clones recombinantes. Eletroforese em gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo. Painel A: (06) pTZ57-Lc06, (22) pTZ57-Lc22 (colônias 1, 2, 3 e 4 recombinantes), (22 maior) pTZ57-Lc 22 maior (clones recombinantes 1, 2 e 3). Painel B: (24) pTZ57-Lc 24 (clones recombinantes 1, 2 e 3) e (36) pTZ57-Lc 36 (clones recombinantes 1, 2 e 3). (0): clone vazio. 1Kb: Peso molecular 1Kb <i>Gene Ruller</i> (Fermentas)	55
Figura 11. PCR de colônia para confirmação dos clones recombinantes em pET 42a. Eletroforese em gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo. 24 (620pb) (PCRs	

positivos 1, 2, 3, 4, 5 e 6) e 36 (739pb) (PCRs positivos 1,2,3,4,5 e 6). 0: controle negativo;: colônia. 1Kb: Peso molecular 1Kb Gene Ruller (Fermentas)	57
Figura 12. Análise da expressão das proteínas em <i>E. coli</i> à temperatura de 37°C. SDS-PAGE 12%, corado com <i>Comassie blue</i> . Extrato de células: 24 - pET42/Lc 24 (ponto 0: não induzido; 1,2,3 e 4 horas); 36 - pET42/Lc 36 (ponto 0: não induzido; 1,2,3 e 4 horas). KDa: <i>BenchMark Protein Ladder</i> . A seta indica a localização das proteínas induzidas	58
Figura 13. Solubilidade das proteínas recombinantes rLc24 e rLc36. SDS-PAGE 12%, corado com <i>Comassie blue</i> . Extrato celular de <i>E. coli</i> . NI – não induzido; I – induzido com IPTG; P – pellet; S – sobrenadante. A seta indica a localização das proteínas. KDa – <i>Protein Marker, Broad Range</i> , (2-212 kDa) (New England, BioLabs)	59
Figura 14. Confirmação das proteínas recombinantes rLc24 e rLc36. Painel A: SDS-PAGE 12%, corado por <i>Comassie blue</i> . Extrato celular de <i>E. coli</i> Rosetta DE3 induzidas à 37° C. Painel B: <i>Western Blotting</i> do extrato celular de <i>E. coli</i> Rosetta DE3 induzidas à 37° C. 0: proteína não induzida, 1, 2, 3 e 4: proteína induzida após 1, 2, 3 e 4 horas	60
Figura 15. Detecção da fase solúvel das proteínas recombinantes rLc24 e rLc36 induzidas em <i>E. coli</i> Rosetta DE3 a 37° C. Painel A: SDS-PAGE 12%, corado por <i>Comassie blue</i> . Painel B: <i>Western Blotting</i> das proteínas rLc24 e rLc36 induzida com IPTG à 37° C, sonicadas e separadas por pellet e sobrenadante. NI – não induzida; I – induzida; P – pellet; S- sobrenadante	60
Figura 16. Purificação da proteína recombinante rLc24 por cromatografia de afinidade em coluna de Glutathione. Painel A: SDS-PAGE 12%, corado por <i>Comassie blue</i> . Extrato celular de <i>E. coli</i> Rosetta (DE3) expressado à temperatura 37° C da proteína recombinante rLc24 e purificadas usando coluna GST. KDa – <i>Ladder Protein</i> ; NI – não induzida; I – induzida; E – eluato (sobrenadante filtrado); L1 – lavagem 1; L2 – lavagem 2; L3 – lavagem 3; PE 1 – proteína eluída 1; PE 2 – proteína eluída 2; PE 3 – proteína eluída 3. Painel B: <i>Western Blotting</i> do extrato celular da purificação da proteína recombinante Lc24p em coluna de GST	61
Figura 17. Purificação da proteína recombinante rLc36 por cromatografia de afinidade em coluna de Glutathione. Painel A: SDS-PAGE 12%, corado por <i>Comassie blue</i> . Extrato celular de <i>E. coli</i> Rosetta (DE3) expressado à temperatura 37° C da proteína recombinante rLc36 e purificadas usando coluna GST. KDa – <i>Ladder Protein</i> ; NI – não induzida; I – induzida; E – eluato (sobrenadante filtrado); L1 – lavagem 1; L2 – lavagem 2; L3 – lavagem 3; PE 1 – proteína eluída 1; PE 2 – proteína eluída 2; PE 3 – proteína eluída 3. Painel B: <i>Western Blotting</i> do extrato celular da purificação da proteína recombinante Lc36p em coluna de GST	62

Figura 18. Ensaio de imunorreatividade das proteínas recombinantes rLc24 e rLc36. Análise das amostras de soro de cães infectados e não infectados com LV analisados por *immunoblotting* utilizando anticorpo anti-*dog* IgG. **Painel A:** Controle negativo. *Pool* de soros de cães não infectados com LV. Painel B: *Immunoblotting* da proteína rLc24. Painel C: *Immunoblotting* da proteína rLc36. As setas indicam a reatividade das proteínas nas diferentes concentrações das proteínas. 1. Proteína recombinante a concentração de 0,1µg/ml. 2. Proteína recombinante a concentração de 0,01µg/ml. 3. Proteína recombinante a concentração de 0,01µg/ml 63

SUMÁRIO

Capítulo 1	1
1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 SISTEMÁTICA DE <i>Leishmania</i>	5
2.2 PARASITA	7
2.3 VETORES	8
2.4 HOSPEDEIROS VERTEBRADOS	8
2.5 CICLO DE VIDA	8
2.6 LEISHMANIOSES	10
2.6.1 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR	11
2.6.2. LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LV)	12
2.7 EPIDEMIOLOGIA	13
2.8 RESPOSTA IMUNE	17
2.9 DIAGNÓSTICO	18
2.10 TRATAMENTO	22
2.11 VACINAS	24
3. OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 LINHAGEM de <i>L. infantum</i> (syn <i>L. chagasi</i>)	27
4.2 LINHAGENS de <i>E. coli</i>	27
4.3 MEIOS DE CULTURA	27
4.4 PLASMÍDEOS	28
4.5 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA	29
4.6 DESENHO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES	29
4.7 CULTURA <i>IN VITRO</i> E CRIOPRESERVAÇÃO	30
4.8 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	31
4.9 AMPLIFICAÇÃO DA FASE ABERTA DE LEITURA	31
4.10 CLONAGEM E EXPRESSÃO	32
4.10.1 CLONAGEM DO PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO NO VETOR pTZ57R/T	32
4.10.2 PCR PARA CONFIRMAÇÃO DOS CLONES RECOMBINANTES	33
4.10.3 SUBCLONAGEM EM VETOR DE EXPRESSÃO pET 42a	34
4.10.4 SELEÇÃO DE CLONES RECOMBINANTES	36
4.10.5 SEQÜENCIAMENTO DOS CLONES RECOMBINANTES	36
4.10.6 TRANSFORMAÇÃO EM LINHAGEM ROSETTA	37

4.10.7 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	37
4.11 WESTERN BLOTTING	39
4.12 CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM COLUNA DE GLUTATIONA	40
4.13 IMMUNOBLOTTING	40
5. RESULTADOS	42
5.1 BIOINFORMÁTICA	42
5.1.1 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA	42
5.1.2 ANÁLISE BLASTx CONTRA BANCO DE DADOS DE SEQUÊNCIAS NÃO-REDUNDANTE	44
5.1.2.a Sequência selecionada para desenvolvimento do Lc06	44
5.1.2.a.1 Sequência protéica selecionada para desenvolvimento do gene Lc06	45
5.1.2.b Sequência selecionada para desenvolvimento do Lc22	45
5.1.2.b.1 Sequência protéica selecionada para desenvolvimento do gene Lc22	46
5.1.2.c Sequência selecionada para desenvolvimento do Lc24	46
5.1.2.c.1 Sequência protéica selecionada para desenvolvimento do gene Lc24	47
5.1.2.d Sequência selecionada para desenvolvimento do Lc36	47
5.1.2.d.1 Sequência protéica selecionada para desenvolvimento do gene Lc36	47
5.1.3 ANÁLISE DE TRs	48
5.1.4 PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS RECONHECIDOS PELAS CÉLULAS B	49
5.1.5 DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS	50
5.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO E AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS Lc 06, Lc22, Lc24 E Lc36	52
5.3 CLONAGEM NO VETOR PTZ57 R/T	55
5.4 ANÁLISE DE RESTRIÇÃO E SEQUENCIAMENTO DOS CLONES RECOMBINANTES	56
5.5 SUBCLONAGEM NO VETOR DE EXPRESSÃO pET 42a	56
5.6 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS EM <i>E. coli</i>	57
5.7 DETECÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	59
5.8 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	61
5.9 IMMUNOBLOTTING	62
6. DISCUSSÃO	64
7. CONCLUSÃO	71
8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	73
Capítulo 2	88

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Na epidemiologia da leishmaniose visceral (LV), o cão é a espécie mais importante, porém a participação de humanos e outros animais silvestres não pode ser negligenciada (CARRILLO & MORENO, 2009).

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, a eliminação de cães infectados está baseada principalmente em métodos sorológicos, sendo parte do Programa Nacional de Controle da LV canina (BRASIL, 2003). A eutanásia é um procedimento controverso, não só devido à falta de consenso dos pesquisadores sobre sua real eficácia, mas também em relação a oposição dos proprietários dos cães, médicos veterinários e Ongs.

A leishmaniose está entre as três doenças mais importantes transmitidas por vetores, depois da malária e da filaria linfática (DESJEUX, 2004) e segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em função de seu caráter endêmico em várias regiões do mundo, encontra-se ainda entre as seis doenças infecto-parasitárias de maior importância no Brasil e na América Latina. Estima-se que, anualmente, haja uma incidência de dois milhões de casos de leishmaniose distribuídos em 88 países (LUKES et al, 2007). Quanto à leishmaniose visceral, atualmente 19 estados apresentam casos, principalmente os estados da Região Nordeste, onde se concentram 87% dos casos, com expansão nos últimos anos para as regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste. No Estado de São Paulo, a leishmaniose visceral (LV) vem se apresentando como grave problema de saúde pública na região noroeste, desde o final da década de 90 e nas áreas endêmicas, apenas *Lutzomyia longipalpis* tem sido apontada como vetor (SUCEN 2006). Na América do Sul, o número estimado de cães infectados chega a milhões, e há altos

índices de infecção em algumas áreas da Venezuela e Brasil, onde uma alta prevalência de infecção canina está associada ao alto risco de infecção humana (WERNECK et al, 2008).

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para o diagnóstico da LV humana e canina. No Brasil, os testes mais utilizados no diagnóstico de LV são o ensaio de imunofluorescência indireta (RIFI) e o imunoensaio enzimático (ELISA), sendo considerados, sobretudo este último, testes de escolha para inquéritos populacionais. (BADARÓ e GONTIJO, 2004). Nos últimos anos, vem ocorrendo muitos avanços, porém devido ao grande número de testes disponíveis para o diagnóstico, nenhum apresenta 100% de sensibilidade e especificidade.

No Brasil, o Ministério da Saúde, proíbe o tratamento para cães, mesmo havendo estudos que comprovam a eficácia do tratamento. De acordo com a OMS, os medicamentos são caros, limitados e tóxicos (MURRAY et al, 2005), podendo ainda apresentar resistência medicamentosa (CROFT et al, 2006), e sequelas da doença. Desta forma, a prevenção, como para qualquer outra doença infecciosa é mais importante do que a cura, tendo em vista que os métodos até agora utilizados são somente em partes efetivos na prevenção e controle da doença. Uma estratégia seria a vacinação profilática, sendo a forma mais eficiente do controle e propagação desta infecção (RODRIGUEZ-CORTES et al, 2007).

O objetivo deste trabalho foi selecionar genes específicos de *Leishmania infantum* (*syn = chagasi*), que não apresentam correspondentes nos genomas de outros tripanossomatídeos e que codificam para proteínas potenciais para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, bem como imunoterapia e desenvolvimento de vacinas, clonar estes genes, expressar as proteínas e purificar

utilizando coluna cromatográfica de glutationa e testar a imunorreatividade das proteínas recombinantes num ensaio de *immunoblotting*.

Quatro potenciais proteínas específicas foram selecionadas e analisadas utilizando ferramentas de bioinformática, porém as potenciais proteínas Lc06 e Lc22 não foram clonadas em vetor de expressão, somente as proteínas Lc24 e Lc 36 foram clonadas em vetor de expressão e expressas em bactérias *E. coli* linhagem Rosetta (DE3). As proteínas recombinantes desenvolvidas neste trabalho, rLc24 e rLc36, não apresentaram nenhuma similaridade com qualquer outro tripanossomatídeo, nem com qualquer outro agente infeccioso que possa co-infectar humanos e cães e apresentaram imunorreatividade com anticorpos presentes no *pool* soro de cães infectados .

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SISTEMÁTICA DE *Leishmania*

O protozoário do gênero *Leishmania* é formado por um grupo de parasitas eucarióticos heteroxenos que se caracteriza pela presença do cinetoplasto, mitocôndria complexa, com uma organização genômica própria constituída por milhares de cadeias de DNA circular distribuídos em maxi e mini- círculos, representado pela sigla kDNA (CHEN et al., 1995). Neste trabalho, adotou-se a classificação da família Trypanosomatidae proposta por Levine e colaboradores (1980), com as categorias utilizadas em sistemática conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Categorias utilizadas em sistemática (Segundo o Comitê de Sistemática e Evolução da Sociedade de Protozoologia, 1980).

Categoria	Protozoário
REINO	Protista
SUB-REINO	Protozoa
FILO	Sarcomastigophora
SUBFILO	Mastigophora
ORDEM	Kinetoplastida
SUBORDEM	Trypanosomatina
Família	Trypanosomatidae
Gênero	<i>Leishmania</i>

Atualmente, organismos do gênero *Leishmania* que infectam mamíferos, podem ser agrupados em dois subgêneros: *L. (Leishmania)* e *L. (Viannia)* em função da região do trato digestivo do flebotomíneo infectado onde ocorre o processo de diferenciação do protozoário (SILVA et al., 2007).

No subgênero *L. (Leishmania)*, promastigotas multiplicam-se e diferenciam-se

na porção anterior e média do trato digestivo do vetor. Parasitas pertencentes a este subgênero estão distribuídos na América, Ásia, Europa e África. Promastigotas do subgênero *L. (Viannia)* são observados aderidos à parede da porção posterior do intestino, com migração tardia das formas flageladas já diferenciadas para a porção anterior e média do trato digestivo no decorrer do ciclo biológico no vetor. Parasitas deste subgênero estão distribuídos pelas regiões tropicais e subtropicais da América.

A leishmaniose visceral (LV), ou calazar, pode ser causada por três espécies do parasita: a espécie *L. (Leishmania) donovani* (LAVÉLAN, 1903) é responsável pela doença na Índia, Paquistão, China Oriental, Bangladesh, Nepal, Sudão e Kênia e apresenta um perfil antroponótico (TAVARES et al., 2003); a espécie *L. (L.) infantum* (NICOLLE, 1908), agente etiológico da leishmaniose visceral na Ásia Central e sudoeste, nordeste da China, norte da África e Europa Mediterrânea; e no Novo Mundo, a espécie *L. (L.) chagasi* (CHAGAS et al., 1938) apresenta caráter antrozoonótico. Estudos enzimáticos e moleculares indicam que *L. chagasi* e *L. infantum* estão proximamente relacionados e, assim, alguns autores consideram *L. chagasi* como sinônimo de *L. infantum* (LAINSON & SHAW, 1987; MAURICIO et al., 2000; LUKES et al., 2007). Como ainda não existe um consenso a respeito deste assunto (LAINSON e RANGEL, 2005; DANTAS-TORRES, 2006a; b), optou-se neste trabalho pela denominação *L. infantum* (syn. *L. chagasi*), por se tratar de estudo realizado no Brasil (SHAW, 2006).

2.2 PARASITA

Leishmania são protozoários dimórficos, parasitas intracelulares obrigatórios pertencentes à família Trypanosomatidae e reproduzem-se por divisão binária dentro das células do sistema mononuclear fagocitário, em especial macrófagos de mamíferos suscetíveis. O parasita desenvolve seu ciclo de vida em dois hospedeiros diferentes, um invertebrado, o inseto vetor, díptero flebotomíneo, dos gêneros *Phlebotomus* ou *Lutzomyia* e um vertebrado. Morfologicamente, o gênero *Leishmania* apresenta duas formas durante seu ciclo de desenvolvimento: a) amastigota, a forma intracelular presente nos hospedeiros vertebrados que tem contorno esférico, medem de 3 a 6 µm de diâmetro, apresenta pouco citoplasma e flagelo reduzido ao segmento intracelular, tornando-a praticamente imóvel e b) promastigota, a forma que se desenvolve extracelularmente no tubo digestivo de hospedeiros invertebrados, bem como em meio de cultura, que é alongada e fusiforme, medem de 10- 15µm, é flagelada e móvel (LAWYER et al, 1990).

O genoma de *Leishmania* é constituído por dois tipos de DNA: nuclear e do cinetoplasto. O DNA nuclear é semelhante ao de outros protozoários, apresentando núcleo central de seqüências de nucleotídeos únicos ou que se repetem poucas vezes no genoma (BEVERLEY et al. 1996). O DNA do cinetoplasto é constituído por uma enorme rede de DNA formado por milhares de moléculas circulares, é uma mitocôndria complexa, que contém quantidades de DNA extranuclear distribuído em mini círculos e maxi círculos (GRIMALDI e TESH, 1993) e é característica nos representantes da ordem Kinetoplastida.

2.3 VETORES

Os vetores, conhecidos por “mosquito-palha”, pertencem a sub-família Phlebotominae, dividida em dois gêneros principais envolvidos na transmissão da leishmaniose: *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (YOUNG E DUNCAN, 1994). Nas Américas, os vetores são do gênero *Lutzomyia*, sendo as espécies *L. longipalpis*, *L. cruzi* (no Mato Grosso) e *L. evansi* (na Colômbia) o vetor da LV (LANZARO e WARBURG, 1995). Na Europa, Ásia e África, os vetores são do gênero *Phlebotomus*. Apresentam características antrozoofílicas, são hematófagos, de porte reduzido, e densamente piloso, sendo este aspecto característica geral do grupo (FORATTINI, 1973). Algumas espécies de vetores são encontradas em florestas, outras são endêmicas em regiões de deserto e algumas são peridomiciliares, residindo próximas a residências urbanas ou áreas rurais (LAINSON e SHAW, 1987).

2.4 HOSPEDEIROS VERTEBRADOS

Mais comumente ocorre a infecção em roedores, marsupiais, edentados, procionídeos, ungulados, primatas e canídeos (LAINSON e SHAW, 1987; MELLO, et al., 1988), sendo alguns considerados reservatórios naturais da leishmaniose (FALQUETO et al., 1991). No ambiente doméstico, o cão é um importante reservatório do agente *L. infantum* (syn. *L. chagasi*), e é responsável pelo caráter endêmico-epidêmico da doença (DEANE e DEANE; 1955, 1962).

2.5 CICLO DE VIDA

O ciclo de vida do parasita alterna entre formas amastigotas dentro de

macrófagos no hospedeiro vertebrado, e formas promastigotas no trato digestivo do flebotomíneo vetor (KILLICK-KENDRICK, 1999) e se inicia quando a fêmea de um díptero flebotomíneo, durante o repasto sangüíneo, ingere sangue do hospedeiro vertebrado contendo macrófagos infectados com amastigotas. Durante o trajeto pelo trato digestivo anterior do flebotomíneo (ou ao chegarem ao tubo digestivo) os macrófagos rompem-se liberando as formas amastigotas, que se diferenciam em promastigotas não infectivas (forma procíclica), que se multiplicam rapidamente durante a digestão do sangue e a seguir diferenciam-se em um processo denominado metaciclogênese até atingirem o estágio infectivo terminal, quando são encontradas como promastigotas infectivas (promastigota metacíclica) livres ou aderidas na porção anterior do aparelho sugador (proventrículo e faringe) do inseto vetor (MEDEIROS *et al.*, 2005).

As fêmeas ao picarem novamente um hospedeiro vertebrado, regurgitam formas promastigotas infectantes (formas metacíclicas) na derme do hospedeiro. Macrófagos são atraídos ao local da picada e ocorre a fagocitose dos promastigotas, mediada pelos receptores do complemento, originando o fagolisossomo, onde promastigotas completam sua diferenciação em formas amastigotas. Na ausência do controle parasitário pela célula hospedeira os parasitas sofrem sucessivas multiplicações por divisão binária simples até que o macrófago infectado sofra lise, liberando os amastigotas que serão fagocitados por outros macrófagos dando sequência ao ciclo (MEDEIROS *et al.*, 2005). Esquemáticamente o ciclo de vida está representado na figura 1.

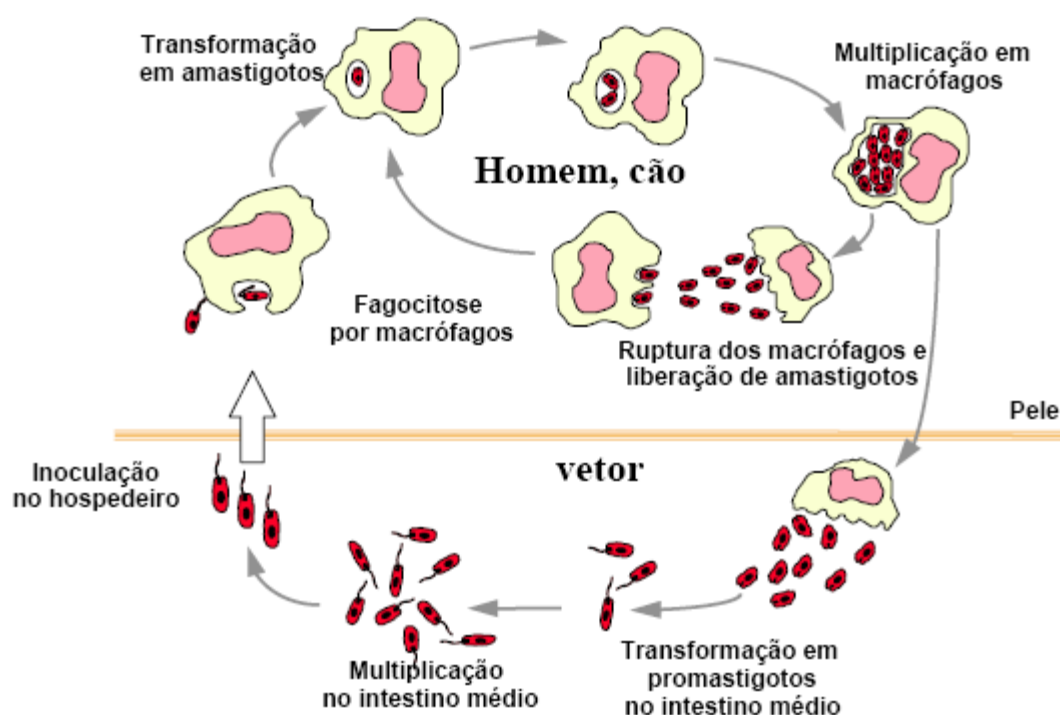


Figura 1. Esquema do ciclo de vida da Leishmaniose visceral. Fonte: Andrade et al, 1999.

2.6 LEISHMANIOSES

As leishmanioses são classificadas em quatro principais formas clínicas denominadas: leishmaniose cutânea localizada (LC), leishmaniose cutâneo-mucosa (LMC), leishmaniose cutâneo-difusa (LDC) e leishmaniose visceral (LV) ou calazar, sendo que no novo mundo, as três primeiras formas são agrupadas e uma única denominação conhecida por leishmaniose tegumentar americana (LTA).

Estas diferentes manifestações clínicas são reguladas por propriedades do parasita (infectividade, patogenicidade e virulência) e fatores próprios do hospedeiro (idade, constituição gênica, nutrição e estado imunológico) (SARAVIA et al., 1989). As principais manifestações clínicas em cães são linfadenopatia, perda de peso,

hepatoesplenomegalia, conjutivite, ceratite, onicogribose e lesões cutâneas (MARZOCHI et al., 1985; SLAPPENDELL e GREENE, 1990; ALMEIDA et al., 2003).

2.6.1 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

A leishmaniose cutânea (LC), causada por várias espécies de *Leishmania*, entre elas *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, é definida pela presença de lesões exclusivamente na pele, que se iniciam no ponto de inoculação das promastigotas infectantes, através da picada do vetor. A lesão primária é geralmente única e discreta, uma pequena pápula, embora eventualmente múltiplas picadas do flebotomíneo ou a disseminação local possam gerar um número elevado de lesões (MARZOCHI, 1992). Com o tempo, se não tratada, a lesão expande e a epiderme necrosa, abrindo uma úlcera que pode produzir metástases na mucosa nasal e oral.

A LC em cães no Brasil é causada principalmente por *L. braziliensis* e ocorre principalmente em animais que vivem no ambiente rural e podem apresentar lesões cutâneas simples ou mucosas (MADEIRA et al, 2003).

Apesar de serem todas inoculadas na pele, espécies distintas de *Leishmania* tem preferências por órgãos diferentes e causam lesões maiores ou menores, produzem ou não metástases e podem ser ou não autocuráveis. Induzem imunidade permanente ou temporária e às vezes nenhuma. Esse conjunto de fatores, e suas possíveis combinações com a capacidade de resposta do paciente, é o responsável pelas diversas formas clínicas das leishmanioses (SARAVIA et al., 1989). A leishmaniose mucocutânea apresenta difícil tratamento e prognóstico reservado quanto à possibilidade de cura. Os fatores que contribuem para que a forma inicialmente cutânea evolua para a forma mucosa não é totalmente conhecida, mas

é sabido que a demora na cicatrização da lesão primária e tratamento inicial inadequado podem estar associados (GONTIJO e CARVALHO, 2003).

2.6.2 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC)

A leishmaniose visceral canina, no Brasil, coexiste com a doença humana possuindo, porém, maior prevalência e, dependendo da região, precedendo à ocorrência de doença humana (ALENCAR, 1959).

De modo geral, o quadro clínico se assemelha à doença humana, embora no cão, além do acometimento das vísceras, há lesões de pele (KRAUSPENHAR et al., 2007). Os cães infectados por *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) apresentam características clínicas que podem variar de aparente estado sadio ao severo estágio final. Os animais podem ser classificados, segundo Mancianti e colaboradores (1988), em três formas clínicas: assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. Os assintomáticos são cães com ausência de sinais clínicos característicos de infecção por *Leishmania*. Nos oligossintomáticos ocorrem até três dos sinais clínicos característicos da infecção. Os cães sintomáticos são aqueles que apresentam mais de três sinais clínicos, entre eles, alopecia, dermatite furfurácea, úlceras, hiperqueratose, onicogribose, emagrecimento, ceratoconjuntivite, adenopatia linfóide, opacificação das córneas e opacificação do pêlo (MANCIANTI et al., 1988, ALVAR, 2004; BARRETH, 2006).

A hipertrofia e a hiperplasia do sistema fagocitário mononuclear, levando à hepatoesplenomegalia, linfodenopatia e adenopatia generalizada, é bastante freqüente (GONZALEZ et al., 1990; SLAPPENDEL e GREENE, 1990; CIARAMELLA et al., 1997). Apatia, diarreia, hemorragia intestinal, edema e vômitos são alguns

sintomas que podem estar presentes. Outras lesões também foram observadas como: dermatites crônicas (TAFURI et al., 1996; FONDEVILA et al., 1997; FERRER, 1999); reação inflamatória granulomatosa no fígado e baço (TAFURI et al., 1996); pneumonite intersticial (DUARTE et al., 1986; GONÇALVES et al., 2003) e glomerulonefrite com ou sem síndrome nefrótica (TAFURI et al., 1989; NIETO et al., 1992; FONT e CLOSA, 1997) no entanto, os sinais mais evidentes estão relacionados às alterações cutâneas.

2.7 EPIDEMIOLOGIA

As leishmanioses compreendem uma das sete endemias mundiais de prioridade absoluta da Organização Mundial de Saúde (OMS), em função de seu caráter endêmico em várias regiões do mundo, encontrando-se ainda entre as seis doenças infecto-parasitárias de maior importância no Brasil e na América Latina (GONTIJO e MELO, 2004). Estima-se que, anualmente, haja uma incidência de dois milhões de casos de leishmaniose tegumentar e 350 milhões de pessoas de 88 países estão em área de risco com cerca de 12 milhões infectadas (LUKES et al., 2007). A leishmaniose visceral é a forma clínica mais grave, está distribuída em 88 países e acomete anualmente 500 mil casos (WHO, 2009), dos quais 90% são oriundos da Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão (região Sul) e Brasil (Nordeste) (DESJEUX, 2004; SIVAKUMAR et al., 2006) (Figura 2). Nas áreas endêmicas, aproximadamente 20% das pessoas infectadas pela *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) desenvolvem a doença clássica. A maioria dos infectados desenvolve doença subclínica que pode permanecer completamente assintomática ou assumir forma

oligossintomática (BADARO, 1988; COSTA, VIANA et al., 1995; NASCIMENTO, 1996).



Figura 2. Distribuição geográfica da leishmaniose visceral no mundo, segundo a Organização Mundial de Saúde.

Fonte: <http://nsn1.utdallas.edu/.../Parasite/leishmaniasis.htm>

O Brasil é responsável pela quase totalidade dos casos da LV nas Américas, sendo que no período entre 1984 e 2004, a média anual de casos de LV foi de 3352 casos registrados com incidência de 2 casos a cada 100.000 habitantes. A letalidade média neste período foi de 6,3% (MAIA-ELKHOURY et al, 2006). Atualmente 19 estados apresentam casos, principalmente os estados da Região Nordeste, onde se concentram 87% dos casos, com expansão nos últimos anos para as regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste (OLIVEIRA et al., 2005). No Estado de São Paulo, a LV vem se apresentando como grave problema de saúde pública na região noroeste, desde o final da década de 90 (SUCEN, 2010).

Segundo a OMS, a LV canina está presente em 50 dos 88 países na qual a LV humana é endêmica. A LV canina parece estar se espalhando no Brasil e surtos têm sido reportados em cidades metropolitanas como: Belo Horizonte, MG

(GENARO et al., 1988; MICHALICK et al., 1993), Teresina, PI, São Luiz, MA, Fortaleza, CE, Rio de Janeiro, RJ (MARZOCHI et al., 1994) e Salvador, BA (CUNHA et al., 1995; ASHFORD et al., 1998). Em todos os Estados há uma associação entre cães infectados e muitos flebotomíneos (*L. longipalpis*) (DEANE e DEANE, 1962; GUEDES et al., 1978). O percentual de cães assintomáticos em uma área endêmica tem importante implicação na saúde pública, pois mesmo assintomáticos são fonte de infecção para os flebotomíneos e assim apresentam papel ativo na cadeia de transmissão da doença (MARZOCHI et al., 1994).

Os canídeos são os mais importantes reservatórios naturais relacionado com casos humanos, sendo apontado como reservatório da doença e como hospedeiro doméstico (SAVANI et al., 2003; SILVA et al., 2005), pois mesmo assintomáticos são fonte de infecção para os flebotomíneos, apresentando portanto, papel ativo na cadeia de transmissão da doença (MOLINA et al., 1994; SANTOS et al., 2005). A prevalência e incidência da LV canina constituem-se em importantes parâmetros epidemiológicos para o controle da transmissão, dependendo da pronta identificação dos cães infectados (DYE et al., 1992; DYE et al., 1993; QUINNELL et al., 1997).

O controle da LV no Brasil, recomendado pela OMS consiste no controle dos reservatórios urbanos, sendo realizado inquérito sorológico canino e eutanásia dos cães soropositivos (BRAGA et al., 1998), o tratamento das pessoas infectadas, uso de inseticidas em área de transmissão para o controle do vetor, focando principalmente o domicílio e o peridomicílio de residências onde há a confirmação de casos de LV em humanos (MADEIRA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005). Porém, essas medidas não foram suficientes para impedir o avanço da LV no país, recomendando-se principalmente enfatizar o controle e identificação de vetores ao invés do controle de reservatórios (COSTA e VIEIRA, 2001), pois modelos

matemáticos sugerem que, essas medidas não têm apresentado efetividade na redução da incidência da doença, determinando assim a necessidade de reavaliação das ações propostas pelo atual programa (OLIVEIRA et al., 2005; SILVA et al., 2005), já que esses programas de remoção falham por causa da alta incidência de infecção canina, da insensibilidade dos testes diagnósticos em detectar cães infectados e na presença de testes falsos positivos, da demora entre o diagnóstico e a remoção realizada pelos serviços de saúde pública (COURTENAY et al., 2002), além da transferência dos cães para outras áreas realizada pelos proprietários e na rápida reposição dos animais.

Embora ainda mantenha algumas características rurais, a LV apresenta-se em processo de urbanização nos últimos 20 anos (GONTIJO e MELO, 2004; MONTEIRO et al., 2005), tendo apresentado, portanto, significativa expansão geográfica, assim como aumento do número de casos humanos, devido a mudanças em seu padrão de transmissão (LINDOSO e GOTO, 2006). Tal fenômeno possivelmente se justifica através dos impactos ambientais, tais como secas prolongadas e periódicas, seguidas de migração e urbanização progressiva, deteriorização da condição sócio-econômica de ampla parcela da população e, conseqüentemente, a presença de cães infectados, propiciando assim a adaptação do parasita ao novo nicho ecológico (MONTEIRO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2005). As condições sócio-econômicas, ambientais e hábitos de vida são fatores significativos na epidemiologia da LV em áreas endêmicas. Estas condições podem contribuir para que a LV seja perpetuada nas áreas rurais e periurbanas, acometendo aglomerados humanos com baixo nível sócio-econômico que vivem em condições precárias de moradia.

2.8 RESPOSTA IMUNE

A infecção por *Leishmania* começa quando promastigotas são injetados na pele através do repasto sanguíneo do flebotomíneo. Para sobreviver, o parasita necessita resistir à exposição dos componentes do soro do hospedeiro e às células da imunidade inata presentes ou recrutadas ao local da picada.

Os linfócitos T CD4⁺ são divididos em células T auxiliaadoras tipo 1 (T_H1) e células T auxiliaadoras do tipo 2 (T_H2). As células T_H1 quando estimuladas produzem interferon-gama (IFN- γ), interleucina 2 (IL-2) e fator de necrose tumoral (TNF), as quais promovem mecanismos efetores celulares da resposta imune direcionados ao combate de patógenos intracelulares, incluindo hipersensibilidade tardia e reações inflamatórias. Por outro lado, após estimulação, as células T_H2 produzem interleucinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e promovem síntese de anticorpos IgE (COFFMAN, 2006).

Na infecção por *Leishmania*, a resposta imune é dependente de T_H1 (MELBY et al., 2001; GONZALO et al., 2001; ABBAS e LICHTMAN, 2003; DUMONTEIL *et al.*, 2003). Nas fases iniciais da infecção, há produção de IFN- γ por células natural killers (NK) e posteriormente por células T CD4⁺ T_H1 (LIEW et al., 1989; HARMS et al., 1991; LASKAY et al., 1993), que promove a ativação dos macrófagos parasitados, estimulando a produção da enzima óxido nítrico sintetase induzida que catalisa a geração de óxido nítrico (NO), o qual proporciona a destruição dos parasitos intracelulares (MELBY et al., 1998; MURRAY e NATHAN, 1999; BOGDAN et al., 2000).

A saliva do flebotomíneo apresenta componentes imunossupressores que inibem o desenvolvimento da resposta imune contra o parasita, facilitando o estabelecimento da infecção (RIBEIRO et al, 1989; ROMÃO et al, 2008).

2.9 DIAGNÓSTICO

Deve-se levar em conta a importância do diagnóstico precoce da LV a fim de evitar danos mais severos ou até mesmo a morte do paciente. O diagnóstico de rotina no homem baseia-se na demonstração da forma amastigota de *Leishmania* por microscopia em aspirados de linfonodo ou fígado, biópsia da lesão ou em sangue periférico ou cultura.

Os métodos conhecidos atualmente para o diagnóstico da leishmaniose são: diagnóstico clínico, parasitológico, sorológico, imunológico, molecular e cultivo parasitológico. No Brasil, as técnicas sorológicas recomendadas pelo Ministério da Saúde para inquérito canino são: imunofluorescência indireta (RIFI) e imunoensaio enzimático (ELISA) (SAÚDE, 2006). No Brasil, os testes mais utilizados no diagnóstico da LV humana e canina são a RIFI e ELISA, sendo considerado o ELISA, teste de escolha para inquéritos populacionais. A técnica de RIFI é um dos métodos mais comumente utilizados sendo a prova adotada como padrão ouro pelo Ministério da Saúde, onde a Leishmaniose é uma das Doenças de Notificação obrigatória em todo território Nacional. Os kits ELISA (Bio-Manguinhos e Biogene) e RIFI (Bio-Manguinhos) estão devidamente registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, sendo considerado resultado positivo para o RIFI, o título igual ou superior a 1:40 (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2003).

O diagnóstico acurado da LVC é difícil de ser realizado devido à co-infecção e à variedade de sintomas da doença, que pode ser confundido com outras doenças, tais como brucelose, babesiose, toxoplasmose, erliquiose, entre outras (FEITOSA, 2006).

Os testes sorológicos devem ser interpretados com cuidado, uma vez que não são 100% sensíveis. Entretanto, os animais infectados desenvolvem resposta imune

humoral e produzem altos títulos de IgG anti-*Leishmania* (FERRER, 1999; 2002). Ocorre a soroconversão aproximadamente três meses após a infecção e os títulos permanecem altos por no mínimo dois anos (FERRER, 2002).

O diagnóstico de certeza baseia-se em métodos diretos os quais detectam o estágio intracelular do parasita em tecido de biópsia ou punção aspirativa do baço, fígado, medula óssea ou linfonodos. No entanto, estes procedimentos invasivos requerem microscopista experiente e não fornecem diagnóstico positivo em todos os casos, pois a distribuição dos parasitas nos tecidos afetados não é homogênea (SINGH e SIVAKUMAR, 2003). A demonstração do parasito pelo exame direto de amostras colhidas de sangue periférico ou pele, eventualmente encontrarão formas amastigotas de *Leishmania*. Devido às limitações dos métodos diretos, a presença de anticorpos contra o parasita é rotineiramente utilizada como marcador da infecção.

Técnicas baseadas em PCR estão sendo cada vez mais utilizadas no diagnóstico e caracterização de espécies de *Leishmania* apresentando um alto nível de reprodutibilidade e precisão (SALOTRA et al., 2001; CORTES et al., 2004), sendo ainda uma das vantagens das técnicas de diagnóstico molecular a possibilidade de aplicação mesmo quando há pouca amostra de material (GREVELINK e LERNER, 1996). No entanto, técnicas moleculares ainda dependem de padronização e sua execução tem sido dificultada nos estudos epidemiológicos. Neste sentido, o diagnóstico imunológico permanece como um dos parâmetros laboratoriais mais relevantes em nosso país, embora ainda apresente limitação em seu uso (SUNDAR, 2003; SILVA et al., 2005).

Entre os diferentes testes disponíveis, os mais amplamente utilizados são: imunofluorescência indireta (RIFI), teste de aglutinação direta (DAT), ensaio

imunoenzimático (ELISA), dot-ELISA e *Western blotting* (GREVELINK e LERNER, 1996; DA-CRUZ e AZEREDO-COUTINHO, 2001).

Os testes RIFI e ELISA baseiam-se na utilização de frações antigênicas hidrossolúveis de promastigotas, o que limita a especificidade dos testes, e traz problemas para sua padronização. A reatividade cruzada da RIFI pode ser quase totalmente eliminada pela utilização de amastigostas como substrato antigênico. A RIFI apresenta baixa especificidade, além de não ser automatizada, necessita de microscópios fluorescentes e consome muito tempo, dependendo da interpretação subjetiva, exigindo em sua execução pessoal treinado, o que pode complicar a distinção de soros com baixos títulos. Ainda, a RIFI não está adaptada para estudos epidemiológicos em larga escala. O DAT é mais adaptável as condições de campo, porém necessita de refrigeração (PASSOS, 2003). Testes de ELISA geralmente utilizam parasitas lisados, sendo mais quantitativos, versáteis e adaptáveis. O teste é sensível, rápido e de fácil execução, permite a detecção de baixos títulos de anticorpos, mas é pouco preciso na detecção de casos subclínicos ou assintomático, (GONTIJO e MELO, 2004), porém, alguns autores relatam a ocorrência de reação cruzada com outras enfermidades parasitárias comuns nos cães (ROSARIO et al., 2005), como outras espécies da família Trypanosomatidae, e mesmo com microorganismos filogeneticamente distantes, como *Ehrlichia*, *Babesia*, *Toxoplasma* (FERREIRA et al, 2007), sendo um pouco mais sensível e um pouco menos específico que a RIFI. Portanto, no diagnóstico sorológico da LV é necessário fazer o diagnóstico diferencial com outras doenças.

A interpretação dos resultados obtidos utilizando técnicas sorológicas é frequentemente difícil, quando cães de áreas endêmicas são examinados. Embora essas técnicas possam detectar o protozoário *Leishmania* ativo, quando um alto

nível de anticorpo específico está presente, eles não conseguem distinguir entre as varias fases da doença quando os níveis de anticorpos estão próximos ou no cut-off (AISA et al, 1998).

Em 1983, um ensaio imunoenzimático (dot-ELISA) para o diagnóstico de leishmaniose visceral humana foi descrito como um método rápido e econômico, e que era mais sensível e específico que o teste ELISA (PAPPAS et al, 1983). Para o diagnóstico sorológico de leishmaniose canina, há vantagens técnicas sobre os outros métodos, como o ELISA e o RIFI. O dot-ELISA é de fácil execução, podendo ser realizado em 1,5 horas, necessitando de um leitor de espectofotômetro ou um microscópio de fluorescência, além do resultado permanecer por um grande tempo. Pode ser realizado utilizando amostras altamente diluídas, o que evita a falta de especificidade, permite a utilização de sangue seco em filtro de papel, o que é uma grande vantagem durante o trabalho de campo, e para o armazenamento de amostras no laboratório (FISA et al, 1997).

Os testes imunológicos diferem em sua sensibilidade e especificidade, na sua aplicação prática nas condições de campo e na disponibilidade de reagentes. Os testes podem permanecer positivos durante longo tempo após o tratamento, não permitindo avaliação do efeito da terapia e podendo ocorrer reações cruzadas com outras doenças (GONTIJO e MELO, 2004).

Testes mais específicos são aqueles onde se empregam antígenos específicos. Desde a década de 90, antígenos recombinantes de formas específicas do gênero *Leishmania*, como as glicoproteínas de membrana gp 63, gp 70, gp 72 e rK39, têm sido adaptados em testes diagnósticos ELISA com maior sensibilidade e especificidade (REED, 1996), mostrando-se um bom teste para ser utilizado em estudos de prevalência canina, por ser um teste rápido, de fácil execução e leitura

(GONTIJO e MELO, 2004). Porém, essas técnicas possuem limitações de uso, pois os anticorpos podem permanecer presentes após o tratamento (cicatriz sorológica), não permitindo avaliação de resposta terapêutica. Podem ocorrer, ainda, reações cruzadas com outras doenças, como tripanossomíase, hanseníase, malária, esquistossomose, tuberculose e outras leishmanioses (ROSARIO et al., 2005; CARVALHO et al., 2003; SUNDAR et al, 2002).

A rK39, tem sido usada para o diagnóstico da forma aguda da LV. É uma proteína recombinante de *L. chagasi*, da família das Cinesinas, contém 39 repetições de aminoácido, é altamente conservada e expressa por amastigotas (BRAZ et al, 2002; DOURADO et al, 2007).

A gp 36, uma glicoproteína presente na superfície celular das formas amastigotas e promastigotas dos Trypanosomatidae, é o principal antígeno do complexo ligante fucose-manose (FML), um complexo de glicoproteínas que inibe fortemente a infecção *in vitro* de macrófagos por amastigotas e promastigotas. Palatnik-de-Souza e colaboradores (1995) avaliaram o complexo FML na realização do ELISA, e obtiveram sensibilidade de 100% e especificidade de 96% no diagnóstico da LV e não observaram reação cruzada com pacientes com outras formas de leishmaniose ou doença de Chagas. Borja-Cabrera e colaboradores (1999) observaram elevada sensibilidade do ELISA FML quando comparado com o RIFI na detecção de anticorpos em soro de cães assintomáticos.

2.10 TRATAMENTO

Os principais medicamentos usados na terapia humana e canina são os compostos antimoniais pentavalentes, como o estibogluconato de sódio (Pentostan),

o antimoniato de N-methyl glucamine (Glucantime), o alopurinol, a aminosidina e a anfotericina B (FERRER et al, 1997), porém a dosagem dos antimoniais no tratamento canino é aproximadamente 10 vezes maior que o recomendado para o tratamento humano. Em cães, os antimoniais apresentam baixa eficácia em produzir cura parasitológica no cão, devido à alta excreção renal do antimônio, pelo metabolismo deste fármaco no fígado ou também por uma resposta imune não usual nos animais infectados (MARZOCHI et al, 1985). Os compostos antimoniais pentavalentes atuam na inibição seletiva de enzimas do parasito, requeridas na via glicolítica e na oxidação de ácidos graxos (MOURA, 2007).

Os fármacos utilizados no tratamento da LV humana com sucesso na terapia em humanos, como os antimoniais pentavalentes, anfotericina B, pentamidina e miltefosine são controversos em relação à eficácia no tratamento em cães, pois os medicamentos induzem uma remissão temporária dos sinais clínicos, nem sempre previnem a ocorrência de recidivas, podem causar indução de tolerância, são tóxicas e caras (GRAMICCIA, 1992; OLIVA et al., 2004).

Pelos diversos motivos acima citados, a Organização Mundial de Saúde, não recomenda a terapia antimonial convencional. No Brasil, o Ministério da Saúde proíbe o uso de N-metil glucamina no tratamento canino conforme parecer nº 0299/2004 da Advocacia Geral da União (BRASIL, 2006).

Anfotericina B é um antibiótico que vem sendo usado desde a década de 60 no tratamento das leishmanioses, porém é bastante tóxico, podendo causar efeitos colaterais como: anafilaxia, trombocitopenia, dores generalizadas, calafrios, febre, convulsões, entre outros (CARVALHO et al, 2003) além da possibilidade de recidiva (SAMPAIO et al, 1997). Outra formulação deste medicamento, a anfotericina B, é associada a lipossomas, porém seu uso é limitado devido ao custo (BRYCESON,

1987; SUNDAR, 2003). A vantagem do uso da anfotericina B associada a lipossoma, além da baixa toxicidade, fundamenta-se no fato dos lipossomas serem fagocitados pelos macrófagos, sítio da infecção intracelular, interagindo diretamente com o ergosterol do parasita e reagindo menos com o colesterol da célula do hospedeiro, aumentando assim a eficácia da droga e sua tolerabilidade (SAMPAIO e MARSDEN, 1997; LOPEZ-BERESTEIN et al, 1989).

O alopurinol inibe o metabolismo das purinas, exercendo efeito inibitório no crescimento de *Leishmania in vitro*. Sua via de aplicação é oral e efeitos colaterais incomuns (GINEL et al, 1998).

Trabalhos recentes demonstraram a ação terapêutica da vacina FML (Leishmune®) em cães com LVC, quando utilizada com o dobro da concentração de saponina (1mg de saponina) (BORJA-CABRERA et al, 2004; SANTOS et al, 2007; BORJA-CABRERA et al, 2010).

Diante deste contexto, a obtenção de novos fármacos ou novas formulações para medicamentos que possam determinar a cura completa para os cães infectados continua sendo um dos grandes desafios para o controle da doença (SCHETTINI et al., 2003).

2.11 VACINAS

Diversos pesquisadores vêm trabalhando no desenvolvimento de uma vacina contra a LV (HANDMAN, 2001, GRADONI, 2001; REQUENA et al, 2004, YAMAMOTO et al, 2010). Em cães esta medida profilática é muito importante, pois o cão é o principal reservatório doméstico da doença e se houver vacinação em massa, certamente haverá redução de numero de cães infectados, diminuindo o problema dos animais assintomáticos não diagnosticados e da eutanásia

desnecessária.

As vacinas podem ser classificadas em gerações, de acordo com o tipo de material usado para indução da resposta imune: Primeira geração, constituídas por parasitos mortos; segunda geração, constituídas por microrganismos vivos geneticamente modificados, frações de antígenos de microrganismos, antígenos sintéticos e recombinantes ou antígenos não protéicos; e terceira geração, compostas por DNA, sendo na maioria das vezes, plasmídeos codificando proteínas imunogênicas ou epítomos antigênicos (ABATH *et al.*, 1998; GRIFFIN, 2002).

Palatnik-de-Sousa e colaboradores (1993) desenvolveram uma vacina considerada de segunda geração, utilizando frações purificadas de *L. donovani*, ligante fucose-manose (FML), adicionadas à adjuvante saponina. FML é um potente imunógeno, e em testes obtiveram bons resultados, pois houve forte resposta humoral e celular. Esta vacina é industrializada e comercializada desde 2004 com o nome de Leishmune®, produzida pela Pfizer. Em análises de campo, a vacina FML protegeu 92% e 95% dos cães vacinados, os quais permaneceram saudáveis e assintomáticos, reduzindo o reservatório do parasita *L. chagasi* na área endêmica até 3,5 anos após a vacinação (DA SILVA *et al.*, 2001; BORJA-CABRERA *et al.*, 2002; NOGUEIRA *et al.*, 2005). A vacina Leishmune® mostrou-se eficiente para uso profilático contra LVC em áreas endêmicas e epidêmicas, pois os animais assintomáticos vacinados permanecem saudáveis e com uma condição não infecciosa (NOGUEIRA *et al.*, 2005).

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é selecionar genes específicos de *L. infantum* (syn. *L. chagasi*), os quais não apresentam correspondentes nos genomas de *L. major*, *L. braziliensis* e *T. cruzi*, que codificam para proteínas potenciais para o diagnóstico da LV canina e o desenvolvimento de vacinas, clonar os genes, expressar as proteínas, purificar em cromatografia de afinidade e testar a imunorreatividade das proteínas.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1.1 Análise de bioinformática para selecionar genes que codifiquem proteínas com potencial antigênico.

3.1.2 Amplificação dos genes alvo, por PCR.

3.1.3 Clonagem em vetor de expressão.

3.1.4 Seqüenciamento dos genes escolhidos para confirmação da fase aberta de leitura.

3.1.5 Expressão protéica em sistema heterólogo.

3.1.6 Purificação de proteínas por cromatografia de afinidade.

3.1.7 Teste de imunorreatividade com pool de soro de cães infectados e não infectados com LV.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. LINHAGEM de *L. infantum* (syn *L. chagasi*)

Neste estudo foram utilizadas formas promastigotas de *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) mantidas no Laboratório de Parasitologia da FCFAr-UNESP. *L. infantum* (syn *L. chagasi*) cepa MHOM/BR/1974/PP75, gentilmente cedida pelo Serviço de doação de amostras, *Leishmania* Type Culture Colection - LTCC - WDCM 731, Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz.

4.2 LINHAGENS de *Escherichia coli*

Tabela 2. Linhagens de *E. coli*

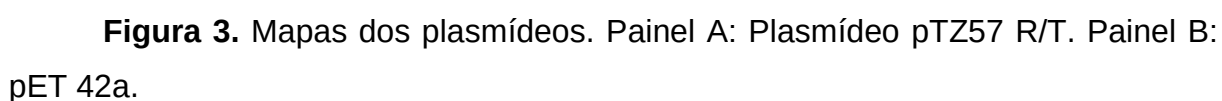
Linhagem	Genótipos
DH5 α	<i>supE44; Δlac U169 (Φ80 lacZΔM15); hsdR17 recA1; endA1; gyrA96; thi1; relA1</i>
Rosetta	<i>F⁻ ompT hsdS_B(R_B⁻ m_B⁻) gal dcm λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysSRARE (Cam^R)</i>

4.3 MEIOS DE CULTURA

- LIT - 68.4mM NaCl; 5.4mM KCl; 56.3mM Na₂HPO₄; 111mM Dextrose; 0.3% Liver Infusion Broth; 0.5% Tryptose; 25mg/l Haemin. Incuba-se a 68°C por 1 hora e ajusta-se o pH para 7.2. Esteriliza-se por filtração em membrana de 0.22μm. Ao final, adiciona-se 10% de Soro Fetal Bovino estéril.

Tabela 3. Plasmídeos utilizados

A figura abaixo (Figura 3) mostra os sítios de restrição dos plasmídeos pTZ57 pET 42a.



4.5 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

4.5.1 Buscas das seqüências de nucleotídeos e de proteínas de *Leishmania sp* utilizando os bancos de dados disponível no site <http://www.genedb.org>.

4.5.2 Busca de similaridade das seqüências de interesse através do programa “BLAST” (Basic Local Alignment Search Tool) do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) contra banco de dados de seqüências não redundantes do GeneBank (ALTSCHUL et al, 1997) ou banco de dados parasito específicos (*L. major*, *L. braziliensis* e *T. cruzi*) (<http://www.genedb.org>).

4.5.3 Busca de domínios TR: Os genes de interesse foram analisados quanto à presença de TRs, domínios geralmente reconhecidos pelos linfócitos B. O programa utilizado, *Tandem Repeat Finder*, pode ser encontrado no site <http://tandem.bu.edu/trf/trf.html> (GOTO et al, 2007).

4.5.4 As proteínas selecionadas foram analisadas quanto à hidropaticidade (regiões hidrofílicas) (KYTE e DOOLITTLE, 1982), presença de domínio transmembrana (<http://www.enzim.hu/hmmtop/>), ponto isoelétrico e peso molecular (http://expasy.org/tools/pi_tool.html).

4.5.5 Busca de epítomos reconhecidos pelos linfócitos B: Utilizou-se o banco de dados Bcipep (<http://www.imtech.res.in/raghava/bcipep>) para predição de epítomos de reconhecimento pelos linfócitos B nas seqüências protéicas dos genes em estudo (SAHA et al, 2005).

4.6 DESENHO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

Os oligonucleotídeos utilizados foram desenhados com o auxílio do programa *Jellyfish 3.3.1 Sequence Analysis Software* e parte das seqüências nucleotídicas dos

domínios abertos de leitura (ORFs) que codificam proteínas de *Leishmania* foram amplificadas através de reação em cadeia polimerase (PCR).

Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes de interesse

Oligonucleo tídeo	Seqüência (5'-3')	Sítio de restrição
06S	GGC CAT GGT GCT CTC CGT TGG TCC C	<i>Nco</i> I
06 AS	GGC TCG AGA GAC ACC GGA GAA ACG TC	<i>Xho</i> I
22 S	GGC CAT GGA CGC ACA TCC ACA AGA AGC TCC	<i>Nco</i> I
22 AS	ACT CGA GGG CGC CGG CGC GCG CAG T	<i>Xho</i> I
24 S	GGC CAT GGG CGG CAC CAC CAG AAG TAC	<i>Nco</i> I
24 AS	GGC TCG AGG CGA ATG TAC CAA AGC AG	<i>Xho</i> I
36 S	GGC CAT GGG GCG AAT CGA CTC	<i>Nco</i> I
36 AS	GGC TCG AGC AGG GCA AGA TCA ATG TCG	<i>Xho</i> I
S-tag	CGA ACG CCA GCA CAT GGA CA	-
T7 terminator	CCG CTG AGC AAT AAC TAG CA	-
T7 promoter	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	-

4.7 CULTURA *IN VITRO* E CRIOPRESERVAÇÃO

Formas promastigotas de *L.infantum* (syn. *L. chagasi*), foram mantidas em cultura, meio líquido LIT a 28° C e usadas para a obtenção de DNA genômico (gDNA). Os promastigotas foram armazenados sob criopreservação, onde 1×10^7 parasitas em fase logarítmica tardia de crescimento foram centrifugados por 10 minutos a 500xg; o sobrenadante desprezado e o sedimento ressuspenso em 1ml de LIT suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado e 20% de dimetil sulfóxido (DMSO) 10%. Estoque a -70°C.

4.8 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

Células de promastigotas de *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) de uma cultura (50mL) em fase logarítmica foram sedimentadas por centrifugação a 2000xg, por 10 minutos. As células foram lavadas com PBS e sedimentadas na mesma condição e, logo após ressuspensas em 4ml de solução 0,2M Tris-HCl (pH 8,0); 0,01 M EDTA (pH 8,0). Após este processo, utilizou-se o Kit *Wizard SV Genomic DNA purification System* (Promega®).

4.9 AMPLIFICAÇÃO DA FASE ABERTA DE LEITURA

A um tubo de microcentrífuga de 0,2mL foram adicionados: 10ng de gDNA; tampão de PCR 1x (sem MgCl₂), MgCl₂ 1,5mM, dNTP mix 0,2mM, 10pM oligonucleotídeo sense, 10pM oligonucleotídeo antisense, 1U Taq DNA polimerase (*Invitrogen*) em volume final de 50μL de água milliQ autoclavada. As reações foram realizadas no termociclador *Mastercycler gradient* (*Eppendorf*) sob as condições padronizadas: Para o gene Lc 06: 94°C por 5 minutos para desnaturação inicial, 35 ciclos de: 94°C por 1 minuto para desnaturação, 60°C por 1 minuto para anelamento. A cada ciclo, a temperatura diminuía 0,3°C, segundo protocolo para PCR *touchdown*, (SAMBROOK e RUSSELL, 2001) e 72°C por 1 minuto e 40 segundos para extensão, seguidos de um acréscimo de 7 minutos à 72°C para completar a extensão final. Para o gene Lc 22, a amplificação foi a mesma descrita para o gene Lc 06, com exceção da temperatura de anelamento igual a 76°C, diminuindo a cada ciclo a temperatura em 0,4°C. Para os genes Lc 24 e Lc 36, foram utilizadas as seguintes condições padronizadas: 94°C por 5 minutos para desnaturação inicial, 35 ciclos de: 94°C por 1 minuto para desnaturação, 52°C por 1 minuto para anelamento

e 72°C por 1 minuto e 40 segundos para extensão, seguidos de um acréscimo de 7 minutos à 72°C para completar a extensão final. Ao final das reações as amostras foram armazenadas à -20°C até o momento do uso.

Os fragmentos de interesse foram excisados do gel e purificados utilizando o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Madison, WI, USA), conforme as especificações do fabricante.

A análise dos resultados foi realizada em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo (0,5 g/ml) (Gibco) em tampão 1X TAE (Tris-Acetato 40mM; EDTA 2mM, pH 8,5). À amostra foi adicionado tampão de amostra 3x (azul de bromofenol 0,1%, SDS 1%, glicerol 50% e EDTA-Na₂ 0,1M), sendo em seguida aplicada uma tensão de 5V/cm em tampão TAE 1X. Após a migração, o gel de agarose foi visualizado em um transluminador de luz ultravioleta (UV) (BioRad – *software Quantity One 4.6.5*).

Os fragmentos de DNA foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1%, e quantificados pelo espectrofotômetro ND-1000 (*NanoDrop*). As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até o momento do uso.

4.10 CLONAGEM E EXPRESSÃO

4.10.1 CLONAGEM DO PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO NO VETOR pTZ57R/T

Os produtos amplificados Lc 06, Lc 22, Lc 24 e Lc 36 foram inseridos no vetor de clonagem pTZ57R/T, o qual possui extremidade 3' dT, que facilita a clonagem de produtos de PCR (presença de extremidades 3' dA, gerado pela Taq DNA polimerase utilizada), utilizando para isto o kit *InstAclone™ PCR Cloning Kit*

(Fermentas - Life Sciences) através de uma reação de ligação utilizando a enzima T4 DNA ligase, conforme especificações do fabricante.

A reação de ligação foi utilizada para transformar células de *E. coli* 0,1M DH5 α CaCl₂ competentes (células competentes preparadas segundo o protocolo descrito por Sambrook e Russell (2001) pelo método do choque térmico (SAMBROOK e RUSSELL, 2001).

Adicionaram-se 5 μ L das reações de ligação aos 200 μ L bactérias DH5 α competentes, seguido de choque térmico a 42°C por 90 segundos, transferindo-se imediatamente a suspensão bacteriana para o gelo por 60 segundos. Adicionou-se 800 μ L de meio LB para restabelecimento das células por 45 minutos a 37°C, 250rpm. Após este período, foram plaqueadas (200 μ L) em meio LB ágar contendo o antibiótico ampicilina (1500 μ g) (GIBCO), IPTG (200mM) (Invitrogen) e X-gal (300mg) (USB), para seleção das colônias recombinantes, e incubadas *overnight* a 37°C.

4.10.2 PCR PARA CONFIRMAÇÃO DOS CLONES RECOMBINANTES

Foram selecionadas colônias de cada uma das placas. Estas colônias foram transferidas da placa para um tubo Falcon contendo 5mL de meio LB e 5 μ L de ampicilina (100mg/mL) e colocados no *shaker* a 300 rpm por 5 horas a uma temperatura de 37°C.

Após crescimento dos pré-inóculos, foi realizada uma reação de PCR para confirmação das colônias recombinantes dos clones Lc 06, Lc 22, Lc 24 e Lc 36. Na reação foram adicionados: 1 μ L de suspensão celular, tampão de PCR 1x (sem MgCl₂), MgCl₂ 1,5mM, dNTP mix 0,2mM, 10pM dos oligonucleotídeos sense e antisense 06, 22, 24 e 36 (tabela 4) ,1U Taq DNA polimerase (*Invitrogen*) em volume

final de 50µL de água milliQ autoclavada. As reações foram realizadas no termociclador *Mastercycler gradient*, sob as mesmas condições de amplificação utilizadas na obtenção dos fragmentos gênicos de interesse. Os produtos de amplificação dos clones selecionados aleatoriamente foram visualizados através da eletroforese em gel de agarose 1% sob luz UV. Os clones recombinantes foram denominados pTZ57/Lc06, pTZ57/Lc 22, pTZ57/Lc 24 e pTZ57/Lc 36

Após seleção dos clones recombinantes, foi realizada a extração do DNA plasmidial utilizando o kit *Wizard Plus SV minipreps – DNA purification System* (Promega), segundo protocolo sugerido pelo fabricante.

4.10.3 SUBCLONAGEM EM VETOR DE EXPRESSÃO pET 42a

Vários vetores de expressão encontram-se disponíveis no mercado para a expressão heteróloga de proteínas em *E. coli*. Os mais referidos são da série pET (*plasmid for expression by T7 RNA polymerase*), cuja expressão está sob controle do promotor de transcrição f10 e dos sinais de iniciação de tradução s10 da proteína do gene 10 (a principal proteína do capsídeo) do bacteriófago T7. A grande vantagem deste vetor é que o inserto clonado é transcrito pela RNA polimerase do bacteriófago T7, que é muito seletiva e ativa, sendo capaz de alongar cadeias de RNA aproximadamente cinco vezes mais rápido que a RNA polimerase de *E. coli*. Alguns vetores da série pET apresentam o promotor T7-Lac, colocando a expressão da proteína sob controle Lac e reduzindo portanto o *background* de expressão da proteína alvo na ausência de IPTG (pET SYSTEM MANUAL, 2002).

Por este motivo o vetor escolhido para a expressão das proteínas recombinantes deste trabalho foi o pET 42a, que permite a clonagem e a expressão

do gene de interesse em fusão com a proteína GST (Glutathione S-Transferase) na porção N-terminal da proteína (facilitando posteriormente a purificação da proteína de interesse), e também em fusão com histidina; além disso, permite a seleção do clone recombinante devido à presença do gene de resistência a canamicina presente no plasmídeo (pET SYSTEM MANUAL, 2002).

Os plasmídeos recombinantes pTZ57/Lc06, pTZ57/Lc 22, pTZ57/Lc 24 e pTZ57/Lc 36, foram clivados com as enzimas *NcoI* e *XhoI*, através do protocolo estabelecido pelo fabricante a fim de obter quantidades suficientes dos insertos de interesse com extremidades coesivas adequadas para serem subclonadas no vetor de expressão pET 42a, previamente digeridos com as mesmas enzimas de restrição. Para recortar o inserto separado do vetor, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo, e analisado por transluminador UV. O produto da clivagem enzimática foi observado como dois fragmentos correspondentes ao tamanho da sequência do vetor pTZ57 R/T (2886pb) e o outro ao tamanho do inserto. A banda correspondente ao inserto foi rapidamente excisada do gel e purificada utilizando-se o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Madison, WI, USA).

Os produtos amplificados e já clivados foram ligados ao vetor de expressão pET 42a (5930pb) linearizado com as enzimas de restrição *NcoI*/ *XhoI*, utilizando-se a enzima T4 ligase. A concentração de inserto utilizada na reação de ligação foi calculada seguindo-se a proporção:

$$\frac{\text{ng vetor} \times \text{kb de inserto}}{\text{kb do vetor}} \times \frac{\text{relação molar do inserto (3)}}{\text{relação molar do vetor (1)}} = \text{ng de inserto}$$

A reação de ligação foi utilizada para transformar células de *E. coli* 0,1M DH5 α CaCl₂ competentes (células competentes preparadas segundo o protocolo

descrito por Sambrook e Russell (2001) pelo método do choque térmico (SAMBROOK e RUSSELL, 2001), conforme descrito anteriormente.

4.10.4 SELEÇÃO DE CLONES RECOMBINANTES

A seleção dos clones recombinantes seguiu-se como descrito no item 4.10.2 PCR PARA CONFIRMAÇÃO DOS CLONES RECOMBINANTES.

4.10.5 SEQÜENCIAMENTO DOS CLONES RECOMBINANTES

Os vetores pTZ57Lc 06, pTZ57Lc 22, pTZ57Lc 22 maior, pET42Lc 24 e pET42Lc 36 foram seqüenciados para confirmação da seqüência, fase aberta de leitura e orientação correta dos fragmentos inseridos, através do método de terminação da cadeia de seqüenciamento de DNA (Sanger, Nicklen *et al.*, 1977), em seqüenciador automático “MegaBACE 1000 Flex” (GE Healthcare), utilizando o kit “DYEnamic TM ET Terminator Cycle Sequencing Kit”, conforme orientação do fabricante.

Foi utilizado como amostra o plasmídeo e os oligonucleotídeos *sense* ou *antisense* para as amostras pTZ57Lc 06, pTZ57Lc 22, pTZ57Lc 22 maior e *S-tag* ou *T7 terminator* para seqüenciamento das amostras pET42Lc 24 e pET42Lc 36. As condições de reação de seqüenciamento foram:

95° C	20´	30x
50° C	15´´	
60° C	1´15´´	
4° C	tempo indeterminado	

A reação foi precipitada em etanol e acetato de amônio 7,5M segundo instruções do fabricante para remover os dideoxinucleotídeos marcados não incorporados. A análise das sequências foi feita pelo software “Sequence Analyser-Base Caller Cimarron 3.12” (GE Healthcare).

4.10.6 TRANSFORMAÇÃO EM LINHAGEM ROSETTA

Após confirmação da integridade do vetor, os plasmídeos foram transformados em células de *E. coli*, linhagem Rosetta (DE3), onde adicionou-se 200µL de suspensão de células bacterianas competentes, descongeladas em banho de gelo, e 1µL do produto da mini-prep (50ng/µL), seguido de choque térmico a 42°C por 90 segundos, transferindo-se imediatamente a suspensão bacteriana para o gelo por 60 segundos. Adicionou-se 800µL de meio LB para restabelecimento das células por 45 minutos a 37°C, 250rpm. Após o choque térmico, as bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB Agar contendo os antibióticos canamicina (25mg/mL) e cloranfenicol (25µg/mL).

4.10.7 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Para realizar os testes de expressão gênica, foram feitos pré-inóculos das colônias resultantes da transformação bacteriana em Rosetta (DE3) com os plasmídeos pET recombinantes selecionados aleatoriamente em meio LB ágar sólido contendo antibiótico específico. Estas colônias foram inoculadas em meio LB canamicina (25µg/mL) e cloranfenicol (25µg/mL) e crescidas *overnight*, à 37°C, sob agitação de 250rpm.

As culturas foram então diluídas na proporção 1:50 em meio LB contendo antibiótico e novamente crescidas no *shaker* a 200rpm a 37°C, até atingir a D.O. de 0,600 a 600nm, lido no espectrofotômetro (*Spectronic® Genesys™ 2*). Nesta D.O. foi coletado 1mL da cultura não induzida (controle negativo), sendo este considerado o ponto zero da indução e centrifugado por 60 segundos a 2000xg, o sobrenadante descartado por inversão e ressuspendido em 40 µL de água Milli-Q autoclavada, levado ao vórtex e adicionado 20µL de tampão de amostra 3x (625mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 2%, glicerol 87%, azul de bromofenol 0,5% e β -mercaptoetanol 5%). Nas horas subseqüentes foi realizado o mesmo procedimento com a amostra induzida.

Depois de retirar a alíquota correspondente ao ponto zero, foi adicionado ao restante da cultura uma concentração de 0,4mM IPTG (Invitrogen) para que a indução fosse iniciada. A cultura foi induzida durante 3 horas a 37°C a 200rpm, coletando-se uma alíquota de 1mL da cultura induzida em intervalos de 1, 2, 3 horas, e o protocolo de centrifugação descrito acima foi realizado para cada uma delas.

Decorridas às 3 horas de indução, os restantes das culturas induzidas foram centrifugados a 5.000 rpm por 10 minutos a 4° C em centrífuga Sorvall (RC 5C Plus), o sobrenadante descartado e os *pellets* obtidos de cada cultura induzida ressuspendidas em 50ml/L de Tampão de Lise (10mM Tris-Base; 50mM NaH₂PO₄ e 100mM NaCl). Os *pellets* foram dissolvidos sob agitação em gelo e após completa homogenização, colocados em tubos tipo Falcon.

As amostras foram sonicadas para lise celular, utilizando o aparelho *Fisher Scientific Model 500 Digital Sonic Dismembrator*. As amostras foram lisadas por 9 minutos, com intervalo de 30 segundos entre cada minuto. Após a lise celular, as amostras foram novamente centrifugadas em Sorvall a 13000 rpm, por 10 minutos a

4°C. O sobrenadante foi filtrado em filtro de 0,45 µm e o *pellet* ressuspensionado no mesmo volume de tampão de lise. Alíquotas de 60µl de cada (sobrenadante e *pellet*) foram retiradas para aplicar em gel de poliacrilamida para verificação da solubilidade das proteínas de interesse. O *pellet* e o sobrenadante foram congelados a -20° C até o momento da purificação.

As amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12%, para a detecção da expressão protéica. O gel de poliacrilamida 12% (pH 8,8) foi confeccionado segundo o método descrito por Laemmli et al., 1970.

4.11 WESTERN BLOTTING

As proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (GE). Após correr o gel de poliacrilamida, mergulhou-se o gel, juntamente com dois papéis de filtro e duas esponjas no tampão de transferência (2,5g Tris, 4,13g Glicina) sem metanol, enquanto que a membrana ficou mergulhada no metanol. Transcorrido cinco minutos, a membrana e o metanol foram misturados ao tampão de transferência, e deixados por mais 5 minutos. O “sanduiche” foi montado colocando-se entre as esponjas e o papel de filtro, a membrana face-a-face com o gel, e aplicada uma corrente elétrica de 150V (150mA) por duas horas, fazendo com que as proteínas carregadas movessem do gel para a membrana mantendo a mesma disposição que continham no gel. Após a transferência, a membrana foi corada com solução de Ponceau (250µl Ponceau; 50 µl ácido acético e água destilada 50ml qsp), marcadas as bandas de interesse com agulha e descoradas com água destilada.

A membrana foi então incubada por uma hora em solução de bloqueio (2,5g leite desnatado em pó e 50ml de TBS 1x – 60,5g Tris, 87,6g NaCl, 1L água qsp, pH

8,0) sob agitação suave para impedir ligações não específicas entre a membrana e o anticorpo usado para detectar a proteína alvo. Transcorrido o bloqueio, lavou-se a membrana com TBS 1x, 3 vezes, por 5 minutos cada lavagem sob agitação suave. A membrana foi incubada por 1 hora sob agitação suave com anticorpo primário anti-His diluído em TBS 1x, lavado como descrito anteriormente e incubado novamente por 1 hora com anticorpo secundário anti-Mouse, lavado novamente como descrito. A revelação das proteínas de interesse foi realizada com solução reveladora Step™ NBT/BCIP (Pierce) até o aparecimento das bandas de interesse e posteriormente lavada com água destilada para parar a reação.

4.12 CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM COLUNA DE GLUTATIONA

O vetor pET42a possui uma sequência que codifica a proteína GST (Glutathione S-Transferase), a qual é utilizada como proteína de fusão. O gene de interesse é clonado em fusão com a GST e a proteína híbrida resultante pode ser purificada por cromatografia de afinidade. Foi utilizada a coluna *Glutathione Sepharose 4 Fast Flow* (Amersham Biosciences) que contém o ligante glutathione acoplado a agarose 4% e as proteínas foram purificadas segundo o protocolo especificado pelo fabricante.

4.13 IMMUNOBLOTTING

100µl de proteínas purificadas nas concentrações de: 0,1; 0,01 e 0,001µg/ml foram transferidas a vácuo para a membrana de nitrocelulose, previamente umedecida em água destilada. A membrana foi bloqueada com PBS 1X e leite

desnatado a 5% *overnight*. Após lavagem com tampão, um pool de soros de cães infectados com leishmaniose foi diluído nas concentrações de 1:10; 1:50 e 1:100 em PBS 1X e leite desnatado a 1% e incubado por quatro horas a temperatura ambiente, sob suave agitação. O controle negativo também foi realizado, adicionando-se à membrana de nitrocelulose pool de soro de cães não infectados. Após três lavagens de cinco minutos com tampão PBS 1X, adicionou-se anticorpo IgG anti-cão marcado com peroxidase (Sigma) diluído a 1:6000 em PBS 1X e leite desnatado a 1% e as membranas incubadas por uma hora a temperatura ambiente, sob suave agitação. Os imunocomplexos foram visualizados pela adição do cromógeno (6 mg de 4-cloro-naphthol, 2 ml de metanol, 10 ml de PBS e 10 µl de H₂O₂). A reação foi interrompida após o aparecimento das bandas com água destilada e secas em papel de filtro.

5. RESULTADOS

5.1 BIOINFORMÁTICA

5.1.1 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

A partir do artigo “Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease” (PEACOCK et al, 2007), onde genes de *Leishmania* diferencialmente distribuídos entre as espécies *L. infantum*, *L. major* e *L. braziliensis* foram descritos, selecionou-se todos os genes específicos de *L. infantum*, ou seja, que não apresentam homólogos nas demais espécies de leishmanias. Estes foram analisados quanto à possibilidade de codificarem proteínas com potencial antigênico para o desenvolvimento de novos testes sorológicos para diagnóstico da LVC.

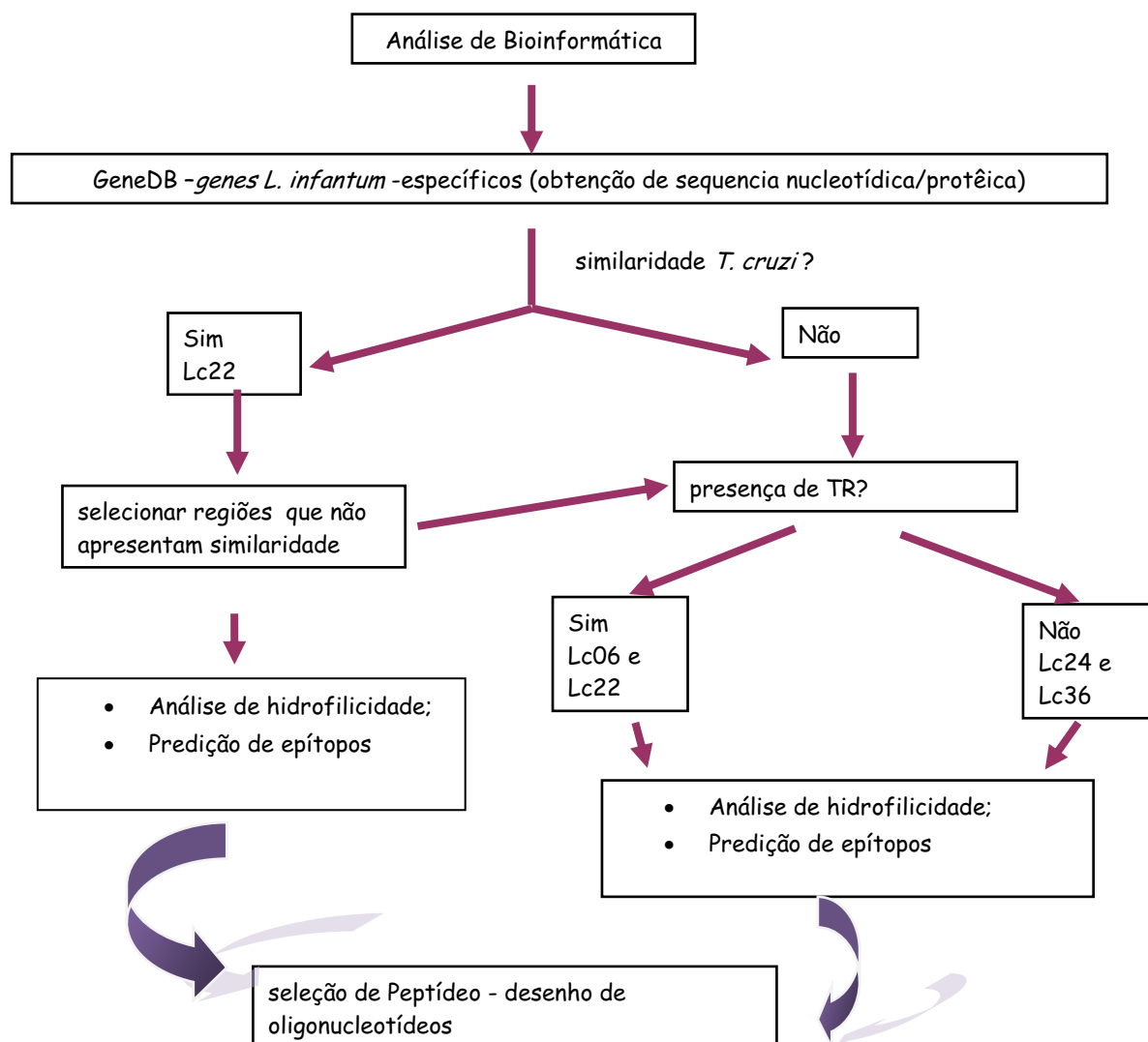
Para a análise de bioinformática, as sequências nucleotídicas e protéicas *L. infantum*-específicas foram obtidas a partir do banco de dados de domínio público disponível no sítio <http://www.genedb.org/genedb/infantum/>. As sequências foram analisadas quanto a:

- Ausência de similaridade com *Trypanosoma cruzi*, via BLASTx - www.ncbi.nih.gov, a fim de evitar reação cruzada durante o diagnóstico de cães que possam estar também infectados com este organismo, já que os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* pertencem à mesma família, Trypanosomatidae, e apresentam muitos antígenos em comum (VEXENAT et al, 1996);
- Presença de repetições *em tandem*, TRs, cuja presença está associada com antigenicidade por serem domínios geralmente reconhecidos pelos linfócitos B;

para tanto, utilizou-se o programa *Tandem Repeat Finder* disponível no sítio <http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>;

- Presença de domínios transmembrana (www.expasy.org);
- Presença de epítomos reconhecidos pelas células B (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>), incluindo região hidrofílica na sequência protéica.

Abaixo, segue um fluxograma mostrando as etapas de seleção dos genes *L. infantum* - específicos:



5.1.2 ANÁLISE BLASTx CONTRA BANCO DE DADOS DE SEQUÊNCIAS NÃO-REDUNDANTE

Os genes *L. infantum* específicos foram analisados quanto à possível similaridade com sequências de *T. cruzi*. Para isso, utilizou-se o programa Blastx contra um banco de dados de sequências não-redundantes. Os oligonucleotídeos das sequências escolhidas estão em negrito e sublinhados. Os genes selecionados foram LinJ.V3.0670 (Lc06), LinJ.V3.22.0410 (Lc22), LinJ.V3.30.1840 (Lc24) e LinJ.V3.36.2750 (Lc36).

5.1.2.a Sequência selecionada para desenvolvimento do Lc06:

<u>GCTCTCCG</u>	<u>TTGGTCCCCA</u>	GTCTGTTGGC	CCGCTCTCTG	TTGACGTTGG	CCCGCTCTCC
GTTGGTCCGC	AGTCTGTTGG	CCCGCTCTCC	GTTGGCCCCG	AGGCTGTTGG	CCCGCTCTCC
GTTGGCCCCG	AGTCTGTTGG	CCCGCTCTCT	GTTGACGTTG	GCCCGCAGGC	TGTTGGCCCCG
CAGTCCGTCG	GCCCGCTCTC	CGTTGGCCCCG	CAGTCTGTTG	GCCCGCTCTC	CGTTGGCCCCG
CAGTCTGTTG	GCCCGCTCTC	TGTTGGCCCCG	CTCTCCGTTG	GTCCGCAGTC	TGTTGGCTCG
CTCTCCGTTG	GCCCGCAGTC	CGTCGGCCCCG	CTCTCTGTTG	GCCCGCTCTC	TGTTGACGTT
GGCCCGCAGG	CTGTTGGCCC	GCTCTCCGTC	GGTCCGCAGG	CTGTTGGCCC	GCTCTCCGTT
GGTCCGCAGT	CCGTCGGCCC	GCTCTCCGTT	GGCCCGCAGT	CCGTTGGCCC	GCTCTCCGTT
GGTCCGCAGT	CTGTCGGCCC	GCTCTCTGTT	GGCCCGCAGT	CCGTCGGCCC	GCTCTCTGTG
GGCCCGCAGT	CCGTTGGCCC	GCTCTCCGTT	GACGTTGGTC	CGCAGTCCGT	TGGCCCGCTC
TCCGTTGGTC	CGCAGTCCGT	CGGCCCGCTC	TCCGTTGGCC	CGCAGTCCGT	TGGCCCGCTC
TCCGTTGGCC	CGCAGTCTGT	TGGCCCGCTC	TCCGTTGGTC	CGCAGTCCGT	CGGCCCGCTC
TCCGTTGGCC	CGCAGTCCGT	TGGCCCGCTT	TCTGTTGGCC	CGCAGGCTGT	TGGCCCGCTC
TCTGTCGACG	TTGGCCCGCA	GTCCGTCGGC	CCGCTCTCTG	TTGGCCCGCA	GGCTGTCGGC
CCGCTCTCCG	TTGGTCCGCA	GTCCGTCGGC	CCGCTCTCCG	TTGGTCCGCA	GTCCGTCGGC
CCTCTCTCTG	TTGACGTTGG	TCAGCAGTCC	GTTGGCCCCG	TCTCCGTTGG	CCCGCAGTCT
GTTGGCCCCG	TCTCTGTTGG	CCCGCAGTCC	GTCGGCCCCG	TCTCCGTTGG	CCCGCAGGCT
GTTGGCCCCG	TCTCCGTTGG	CCCGCAGGCT	GTTGGCCCCG	TCTCCGTTGG	TCCGCAGGCT
GTTGGCCCCG	TCTCCGTTGG	TCCGCAGTCC	GTCGGCCCCG	TCTCCGTTGG	CCCGCAGGCT

GTTGGCCCGC TCTCCGTTGG TCCGCAGGCT GTTGGCCCGC TCTCCGTTGG TCCGCAGTCC
 GTTGGCCCGC TCTCGGTTGG CCTGCAGGCT GTTGACGTTT CTCCGGTGTC T

5.1.2.a.1 Sequência protéica selecionada para desenvolvimento do gene Lc06:

LSVGPQSVG PLSVDVGPLS VGPQSVGPLS VGPQAVGPLS VGPQSVGPLS VDVGPQAVGP
 QSVGPLSVGP QSVGPLSVGP QSVGPLSVGP LSVGPQSVGS LSVGPQSVGP LSVGPLSVDV
 GPQAVGPLSV GPQAVGPLSV GPQSVGPLSV GPQSVGPLSV GPQSVGPLSV GPQSVGPLSV
 GPQSVGPLSV DVGPPQSVGPL SVGPQSVGPL SVGPQSVGPL SVGPQSVGPL SVGPQSVGPL
 SVGPQSVGPL SVGPQAVGPL SVDVGPQSVG PLSVGPQAVG PLSVGPQSVG PLSVGPQSVG
 PLSVDVGQQS VGPLSVGPQS VGPLSVGPQS VGPLSVGPQA VGPLSVGPQA VGPLSVGPQA
 VGPLSVGPQS VGPLSVGPQA VGPLSVGPQA VGPLSVGPQS VGPLSVGLQA VDVSPVS

5.1.2.b Sequência selecionada para desenvolvimento do Lc22:

ACGCACATC CACAAGAAGC TCCCCACCAA GCCGAGCCCT TCACCTCCGC TGCCTTCACA
 CGTACCTCGA AACTCAATTC TGACACTTTC GCGCCACCGA AACCCCGCTT CTCCGGCGGC
 GTTGCTGCCG AGGCGGCGGG CGCGCTGGCG CAGCTGGCGG AGGACCGCGC CGCGGACATG
 GCGCAGGCCG TGTCGAGCGC CGAGGGAGGC AGCCGCGCCG CCCTTGAGGC AACCGAGGCC
 GCCGAGCGCG CCGAGCAGGA GCGCGCTTGC GTTGCGTCGG AGGAGTGCGC TGCGCGCGCC
 GGCCTTGCTG CCGAGGCGGC GGGCGCGCTG GCGCAGCTGG CGGAGGACCG CGCCGCGGAC
 ATGGCGCAGG CCGTGTCGAG CGCCGAGGGA GGCAGCCGCG CCGCCCTTGA GGCAACCGAG
 GCCGCCGAGC GCGCCGAGCA GGGGCGCGCT TGCGTTGCGT CGGAGGAGTG CGCTGCGCGC
 GCCGGCGTTG CTGCCGAGGC GGCGGGCGCG CTGGCGCAGC TGGCGGAGGA CCGCGCCGCG
 GACATGGCGC AGGCCGTGTC GAGCGCCGAG GGAGGCAGCC GCGCCGCCCT TGAGGCAACC
 GAGGCCGCCG AGCGCGCCGA GCAGGAGCGC GCTTGCGTTG CGTCGGAGGA GTGCGCTGCG
 CGCGCCGGCG TTGCTGCCGA GGCGGCGGGC GCGCTGGCGC AGCTGGCGGA GGACCGCGCC
 GCGGACATGG CGCAGGCCGT GTCGAGCGCC GAGGGAGGCA GCCGCGCCGC CCTTGAGGCA
 ACCGAGGCCG CCGAGCGCGC CGAGCAGGAG CGCGCTTGCG TTGCGTCGGA GGAGTGCGCT
 GCGCGCGCCG GCGTTGCTGC CGAGGCGGCG GGCGCGCTGG CGCAGCTGGC GGAGGACCGC
 GCCGCGGACA TGGCGCAGGC CGTGTCGAGC GCCGAGGGAG GCAGCCGCGC CGCCCTTGAG
 GCAACCGAGG CCGCCGAGCG CGCCGAGCAG GAGCGCGCTT GCGTTGCGTC GGAGGAGTGC

GCTGCGCGCG CCGGCGTTGC TGCCGAGGCG GCGGGCGCGC TGGCGCAGCT GGCGGAGGAC
 CGCGCCGCGG ACATGGCGCA GGCCGTGTCT AGCGCCGAGG GAGGCAGCCG CGCCGCCCTT
 GAGGCAACCG AGGCCGCCGA GCGCGCCGAG CAGGAGCGCG CTTGCGTTGC GTCGGAGGAG
 TGCCTGCGC GCGCCGGCGT TGCTGCCGAG GCGGCGGGCG CGCTGGCGCA GCTGGCGGAG
 GACCGCGCCG CGGACATGGC GCAGGCCGTG TCGAGCGCCG AGGGAGGCAG CCGCGCCGCC
 CTTGAGGCAA CCGAGGCCGC CGAGCGCGCC GAGCAGGAGC GCGCTTGCGT TCGTTCGGAG
 GAGTGCCTG CGCGCGCCGG CGTTGCTGCC GAGGCGGCGG GCGCGCTGGC GCAGCTGGCG
 GAGGACCGCG CCGCGGACAT GGCGCAGGCC GTGTCGAGCG CCGAGGGAGG CAGCCGCGCC
 GCCCTTGAGG CAACCGAGGC CGCCGAGCGC GCCGAGCAGG AGCGCGCTTG CGTTGCGTCG
 GAGGAGTGC **A CTGCGCGCGC CGGCG**

5.1.2.b.1 Sequência protéica selecionada para desenvolvimento do gene Lc22:

AHPQEAPHQ AEPFTSAAFT RTSKLNSDTF APPKPRFSGG VAAEAAGALA QLAEDRAADM
 AQAVSSAEGG SRAALEATEA AERAEQERAC VASEECAARA GVAAEAAGAL AQLAEDRAAD
 MAQAVSSAEG GSRAALEATE AAERAEQGRA CVASEECAAR AGVAAEAAGA LAQLAEDRAA
 DMAQAVSSAE GGSRAALEAT EAAERAEQER ACVASEECAA RAGVAAEAAG ALAQLAEDRA
 ADMAQAVSSA EGGSRAALEA TEAAERAEQE RACVASEECA ARAGVAAEAA GALAQLAEDR
 AADMAQAVSS AEGGSRAALE ATEAAERAEQ ERACVASEEC AARAGVAAEA AGALAQLAED
 RAADMAQAVS SAEGGSRAAL EATEAAERAE QERACVASEE CAARAGVAAE AAGALAQLAE
 DRAADMAQAV SSAEGGSRAA LEATEAAERA EQERACVASE ECAARAGVAA EAAGALAQLA
 EDRAADMAQA VSSAEGGSRA ALEATEAAER AEQERACVAS EECTARAG

5.1.2.c Sequência selecionada para desenvolvimento do Lc24:

GCGGCACCAC CAGAAGTACT TCGTATGCTG GTCGGGACGT GCGCGACAGT GACGACGCCG
 ACCATAGCAC TGGCAATGAT GCGATAGACA GCATGAGTCA GGGCAAGCCC CGCGGCAGCC
 CGCACACGTG CATTCTGTCT CACAAGCCCG GCGGCGATGC CGGTTCGACAG GGTGGTTCGC
 AGAAGACGGT TGTGTCCGCG ACTGCAGTCT CTACGCTGCG CGAGGCGACT GGCGCCGCCG
 CCATCGGCCA GAGCAATCAG CTGCGGCCGA CGGTGTCATG GGATTTGTGT AGCAAGGACG
 AAGACGCCA CCGTGCTGCC GCGACGAGTG ACGGCCCTGG GCTGCTGCGC TGGTTTGCAG
 GGTCTCCTCC CGTCGCGCCG GAACACACTC TGTCGCAGCG CAAGAATCTC AGTCACGGGC

TAGTCGCGCT	GTCGCAGATC	ATCGACGCGT	GGGCGGCGTC	TCCGCTATAT	TCGTCTCCGC
TGGCCCTGGC	CCTGCTTTAC	CACCTCTACG	GCGTCGCCTG	TGTCATCCTG	CTGCTGACCG
TGACGGACGG	CATGCTCACC	GGGCACTTTT	CCGCGCTGCG	ACTCTGCATC	GCCCTTGCTG

AGCTGCTTTG GTACATTCGC

5.1.2.c.1 Sequência protéica selecionada para desenvolvimento do gene Lc24:

GGTTRST	SYAGRDVRDS	DDADHSTGND	AIDSMSQKPK	RGSPHTCILS	HKPGGDAGR
GGAQKTVVSA	TAVSTLREAT	GAAAIQSNQ	LRPTVSWDLC	SKDEDRHRAA	ATSDGPGLLR
WFAGSPPVAP	EHTLSQRKNL	SHGLVALSQI	IDAWAASPLY	SSPLALALLY	HLYGVACVIL
LLTVTDGMLT	GHFSALRLCI	ALAEELLWYIR			

5.1.2.d Sequência selecionada para desenvolvimento do Lc36:

<u>ATGGGGCGAA</u>	<u>TCGACTC</u>	CTC	TTGTGTCGCT	GCCACGGTGA	CGCCTAGCAA	GGTCGGCGCA
TCGTCTCTTT	GTCCCGGCAC	GGCGACAAGC	ACTGGCAAGA	TAGACGAGCC	TGCTTCTCGC	
GCCGCTGCCC	CGCAGGGCCG	GGCGCAGCGA	TGTGGCCGAG	CGCGACCCGC	CCAGATGCAC	
AACAGCCTCA	GTGCGGGGAT	GTGTGATAAC	CAACAGCAGC	ACGCCGCAGG	CGTTTGGAAG	
TTGATTGCAG	GGCCGCAGAG	CGCCTCCACG	ACTCCGCCGC	CGCTCGTGAT	GGGTGACGGC	
ACAGGCGGCG	AGGATCATGC	GCAGGCTGCC	CACACCGGCG	TCCGGTGGAC	TAAGCACGCG	
TGGGAAAAGG	GCAACGACTG	CCCTGCGGGT	AGCGCGTACG	GGTCTTTTGT	AGGCGCGCCG	
CTGCGCAGGC	TGCCGCCAAC	GCCTCCGTTT	CCTGGTGTGC	GTCTTCCCGC	CTGGTGTCGG	
TCCGCGTCGG	CGACGGCGTA	TCCGCTCTCC	GAGGATGGCC	TCACAAACGA	GCTGCTGGAC	
TTCTTCTATT	ATCTGCAGTT	GACCTCCCAT	GAGGAAGCGG	CACGGGAGCG	GCTGCTTGGC	
TACGTGCAGG	CGTGCGTGCC	GAAGTTGTGG	GGCCCTGTGA	AACCGGGGAG	CGAAGCCGAG	
GGAACAGCAC	AGGTGATGCT	GTACGGCAGC	TACGCTCTAG	GGCTTTCTCT	TCCAAGCAGC	

GACATTGATC TTGCCCTG

5.1.2.d.1 Sequência protéica selecionada para desenvolvimento do gene Lc

36

MGRIDSSCVA ATVTPSKVGA SSSCPGTATS TGKIDEPASR AAPQGRAQR CGRARPAQMH

```

NSLSAGMCDN QQQHAAGVWK LIAGPQSAST TPPPLVMGDG TGGEDHAQAA HTGVRWTKHA
WEKGNDPCAG SAYGSFVGAP LRRLPPTPPF PGVRLPAWCR SASATAYPLS EDGLTNELLD
FFYYLQLTSH EEAARERLLG YVQACVAKLW GPCKPGSEAE GTAQVMLYGS YALGLSLPSS
DIDLAL

```

As sequências nucleotídicas dos genes Lc 06, Lc 22, Lc24 e Lc36 foram submetidas ao BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) contra o banco de dados de proteínas não redundantes (BLASTx). As proteínas selecionadas são genes que codificam para proteínas, tendo como produtos proteínas hipotéticas. As sequências protéicas dos genes Lc06 e Lc22 selecionadas apresentaram antígeno de superfície de *Trypanosoma cruzi*, porém a identidade com este tripanossomatídeo foi de 36% e 38% respectivamente. As sequências protéicas dos genes Lc24 e Lc36 não apresentaram nenhuma similaridade com qualquer outro tripanossomatídeo. O Lc 24 apresenta gene de resistência multidroga, e o gene Lc 36 apresenta domínios conservados.

5.1.3 ANÁLISE DE TRs

De acordo com Goto, 2007, proteínas contendo sequências repetitivas em *Tandem* (TR) são reconhecidas pelas células B para produção de anticorpos (GOTO et al, 2007). Assim, os genes *L. infantum* - específicos, acima selecionados, foram analisados quanto à presença ou ausência de tais domínios pelo programa *Tandem Repeat Finder* (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>). Neste estudo, foram considerados genes com TR verdadeiras, ou seja, excluindo-se domínio TR pequenos. De acordo com esta análise, os genes Lc06 e Lc22 apresentaram domínios TR. Lc06

apresentou 7 elementos repetitivos diferentes e Lc22, uma única repetição de 183 nucleotídeos que se repete 31 vezes ao longo da molécula (Figura 4).

Sequence: 06
Parameters: 2 7 7 80 10 50 500
Length: 1249

Tables: 1

This is table 1 of 1 (7 repeats found)

Click on indices to view alignment

[Table Explanation](#)

Indices	Period Size	Copy Number	Consensus Size	Percent Matches	Percent Indels	Score	A	C	G	T	Entropy (0-2)
23--62	21	1.9	21	94	0	71	2	35	30	32	1.71
43--1220	15	76.5	15	72	5	772	3	39	31	25	1.73
170--1218	30	34.2	30	86	4	1137	3	39	31	25	1.73
304--404	51	2.0	51	82	0	121	3	37	32	25	1.75
1--1217	216	5.6	216	86	3	1345	3	39	30	25	1.73
550--590	21	2.0	21	85	0	55	4	34	31	29	1.79
767--806	21	1.9	21	84	0	53	5	37	32	25	1.77

Sequence: 22
Parameters: 2 7 7 80 10 50 500
Length: 1585

Tables: 1

This is table 1 of 1 (1 repeats found)

Click on indices to view alignment

[Table Explanation](#)

Indices	Period Size	Copy Number	Consensus Size	Percent Matches	Percent Indels	Score	A	C	G	T	Entropy (0-2)
117--1585	183	8.0	183	99	0	2920	11	33	45	9	1.72

Tables: 1

Figura 4. Análise de bioinformática para detecção de sequências repetitivas.
<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>

5.1.4 PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS RECONHECIDOS PELAS CÉLULAS B

Os genes de *L. infantum* - específicos também foram analisados quanto a predição de epítopos, através da ferramenta de bioinformática disponível no site <http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/> (Figura 5). Todos os genes apresentaram regiões com potencial para elicitar resposta imune.



Figura 5. Predição de epítomos utilizando o programa BepiPred (http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input). Representado em amarelo, potencial epítomo (acima da linha).

5.1.5 DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS

Os genes *L. infantum* - específicos acima selecionados foram analisados pelo site www.expasy.org, a fim de escolher regiões hidrofílicas (Figura 6). Essas regiões são importantes, pois além de serem fundamentais no momento da purificação das proteínas, essas regiões podem corresponder a domínios expostos na proteína. Os polipeptídeos selecionados não ultrapassam 80kDa (Tabela 5).

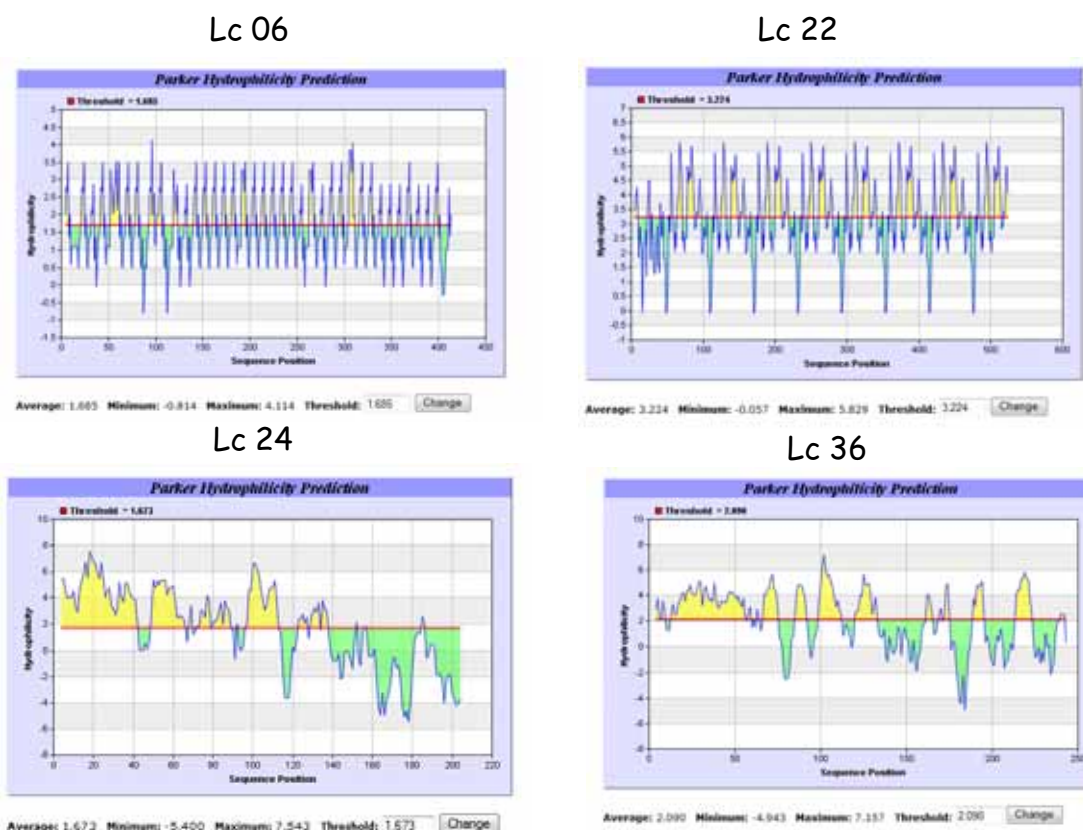


Figura 6. Hidrofilicidade das sequências das proteínas de interesse (http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input). A região hidrofílica está representada acima da linha em vermelho e corresponde a região selecionada para desenho dos oligonucleotídeos.

Tabela 5. Polipeptídeos selecionados através de ferramentas de bioinformática. Peso molecular (kDa) das proteínas selecionadas. Tamanho das amostras em pares de bases (pb) e peso molecular em kilo Dalton (kDa). O peso molecular do pET 42a é de 27KDa.

NOME	Peso molecular (kDa)	Tamanho (pb)
Lc22	51,9	1584
Lc24	21,8	620
Lc36	25,6	739
Lc06	38,4	1249

As sequências nucleotídicas destes oligonucleotídeos contém na extremidade

5' sítios de restrição para enzimas, os quais são importantes para subclonagem em fase de leitura com a sequência que codifica para glutathione S-transferase (GST), presente no vetor pET-42a. As enzimas de restrição de escolha foram *Nco*I e *Xho*I.

5.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO E AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS Lc 06, Lc22, Lc24 E Lc36

O DNA genômico foi extraído a partir de um meio de cultura com *L. infantum* (*syn*= *L. chagasi*) na fase logarítmica de crescimento. A integridade do DNA genômico foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% e quantificado por espectrofotometria (Figura 7).

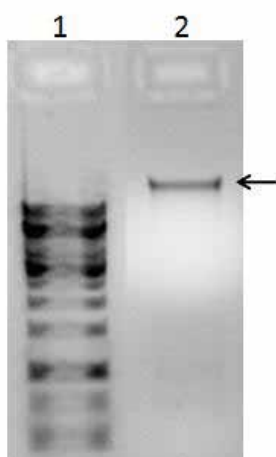


Figura 7. Análise da qualidade do DNA através de eletroforese em gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo. 1: padrão de peso molecular (1kb Ladder, Fermentas). 2: gDNA de *L. infantum* (*syn*= *L. chagasi*) (10ng/μl).

Como mencionado anteriormente, os oligonucleotídeos utilizados na amplificação do DNA genômico foram desenhados a partir de genes específicos de *L. infantum* (*syn*= *L. chagasi*) contendo sítios de restrição para as enzimas *Nco*I e *Xho*I. Estes sítios de restrição foram incorporados às sequências dos

oligonucleotídeos para posterior clonagem nos vetores de expressão. A temperatura ótima de hibridização foi 52°C para amplificação dos fragmentos Lc 24 e Lc 36; para os fragmentos Lc 06 e Lc22 a faixa de temperatura foi de 50°C para Lc 06 e 54°C para Lc 22.

A Figura 8 apresenta o perfil eletroforético dos produtos de amplificação para os fragmentos: Lc 06, Lc 22, Lc 24 e Lc 36 em gel de agarose 1%. Mesmo após padronização da amplificação, bandas inespecíficas foram obtidas em todas as amplificações (Figura 8). Desta maneira, após eletroforese em gel de agarose 1%, foi selecionada a banda de interesse de acordo com o tamanho esperado para posterior purificação utilizando o Kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Madison, WI, USA). As bandas de interesse foram recortadas do gel de agarose com lâmina sob luz UV de alto comprimento de onda. Os tamanhos esperados dos fragmentos Lc 06, 24 e 36 foram, respectivamente 1249, 620 e 739pb. O gene Lc 22, pelo fato de apresentar várias repetições em tandem, foi selecionado duas bandas: uma contendo aproximadamente 1600pb e outra, 2000pb denominando-as banda 22 menor e banda 22 maior (Figura 9).

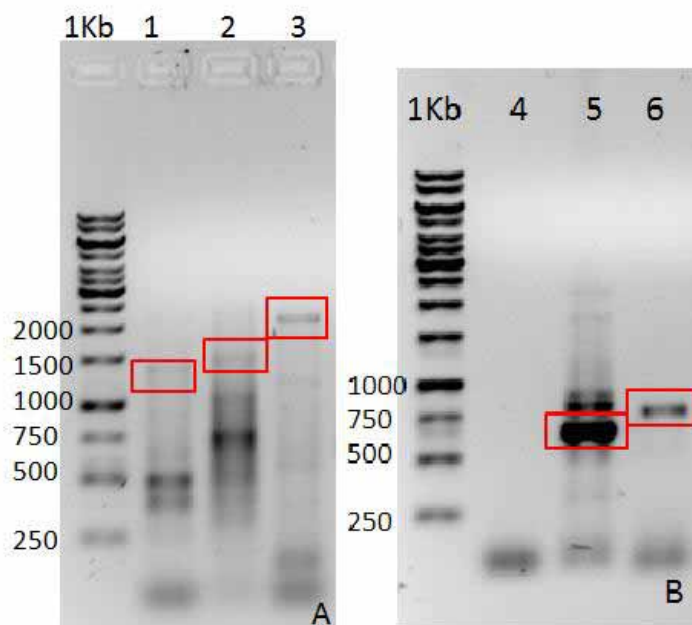


Figura 8. Produtos de amplificação dos fragmentos Lc 06, Lc22, Lc24 e Lc36. Eletroforese em gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo. **Painel A:** 1 - Produto de amplificação do fragmento Lc 06; 2 - Produto de amplificação do fragmento Lc 22; 3 - Produto de amplificação do fragmento Lc 22 maior. **Painel B:** 4 – Controle negativo; 5 - Produto de amplificação do fragmento Lc 24. 6 - Produto de amplificação do fragmento Lc 36. 1Kb: Peso molecular 1Kb Gene Ruller (Fermentas).

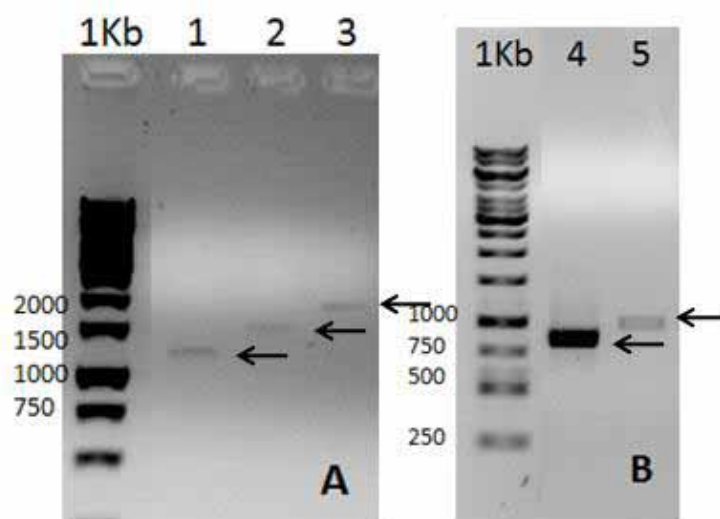


Figura 9. Fragmentos dos produtos de amplificação após purificação. Eletroforese em gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo. **Painel A:** 1 - Lc 06; 2 - Lc 22 menor; 3 - Lc 22 maior. **Painel B:** 4 - Lc 24; 5 - Lc 36. 1Kb: Padrão de peso molecular 1Kb *Gene Ruller* (Fermentas).

5.3 CLONAGEM NO VETOR PTZ57 R/T

Os produtos de PCR purificados foram clonados diretamente no vetor pTZ 57 R/T. Após transformação bacteriana em *E. coli* linhagem DH5 α , foram selecionadas colônias ampicilinas resistentes e brancas (alfa-complementação) e realizada PCR diretamente das colônias utilizando os mesmos oligonucleotídeos 06, 22, 24 e 36 *sense* e *antisense* para confirmar a presença dos plasmídeos recombinantes pTZ57-Lc06, pTZ57-Lc22, pTZ57-Lc24 e pTZ57-Lc36 (Figura 10). Todos os fragmentos obtiveram colônias recombinantes e somente um de cada foi selecionado para extração do DNA plasmidial (mini-prep).

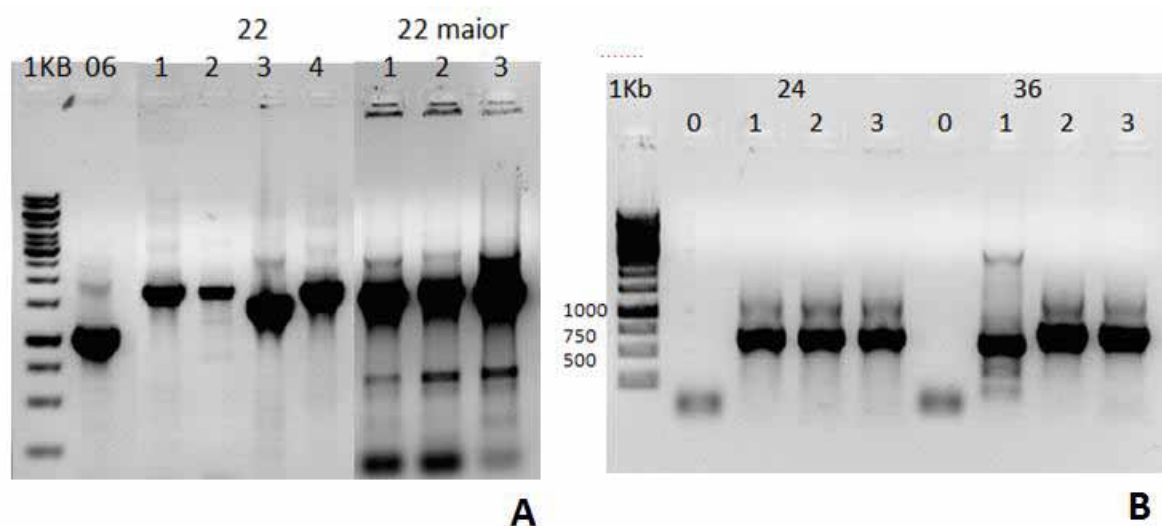


Figura 10. Amplificação dos clones recombinantes. Eletroforese em gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo. **Painel A:** (06) pTZ57-Lc06, (22) pTZ57-Lc22 (colônias 1, 2, 3 e 4 recombinantes), (22 maior) pTZ57-Lc 22 maior (clones recombinantes 1, 2 e 3). **Painel B:** (24) pTZ57-Lc 24 (clones recombinantes 1, 2 e 3) e (36) pTZ57-Lc 36 (clones recombinantes 1, 2 e 3). (0): clone vazio. 1Kb: Peso molecular 1Kb *Gene Ruller* (Fermentas).

5.4 ANÁLISE DE RESTRIÇÃO E SEQUENCIAMENTO DOS CLONES RECOMBINANTES

Os plasmídeos recombinantes pTZ57/Lc 06, pTZ57/Lc 22, pTZ57/Lc22 maior, pTZ57/Lc24 e pTZ57/Lc36 foram sequenciados e, após inúmeras tentativas, não se obteve a sequência do plasmídeo recombinante pTZ57-Lc 22. A sequência obtida do plasmídeo pTZ57-Lc 22 maior foi analisada por BLASTn contra um banco de dados de *L. infantum* e não corresponde ao gene Lc22, mas à ORF LinJ30.1360. Provavelmente a dificuldade apresentada para conseguir a sequência deste inserto se deva à presença de inúmeros elementos repetitivos. O plasmídeo recombinante pTZ57/Lc 06 após sequenciamento foi analisado por BLASTn contra um banco de dados de *L. infantum* e corresponde somente ao plasmídeo pTZ57 R/T, ou seja, não era um clone recombinante. Assim, o clone Lc 22 foi sintetizado separadamente através de síntese química, no Laboratório de Química da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Julio de Mesquita Filho, pelo Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli, Araraquara – SP e futuramente poderá ser analisado quanto à imunorreatividade.

Os plasmídeos recombinantes pTZ57/Lc24 e pTZ57/Lc36 foram confirmados por sequenciamento e, posteriormente foram digeridos com as enzimas de restrição *NcoI* e *XhoI* para clonagem no vetor de expressão pET42a, linearizado com as mesmas enzimas.

5.5 SUBCLONAGEM NO VETOR DE EXPRESSÃO pET 42a

O vetor de expressão pET 42a foi linearizado com as enzimas de restrição *NcoI* e *XhoI* para ligação dos insertos *NcoI*/ *XhoI* de 620 e 739pb originários de pTZ57/Lc24 e pTZ57/Lc36, respectivamente.

Colônias resistentes a canamicina foram selecionadas e analisadas através de PCR de colônias (Figura 11) para verificar a presença dos clones recombinantes pET42/Lc24 e pET42/Lc36.

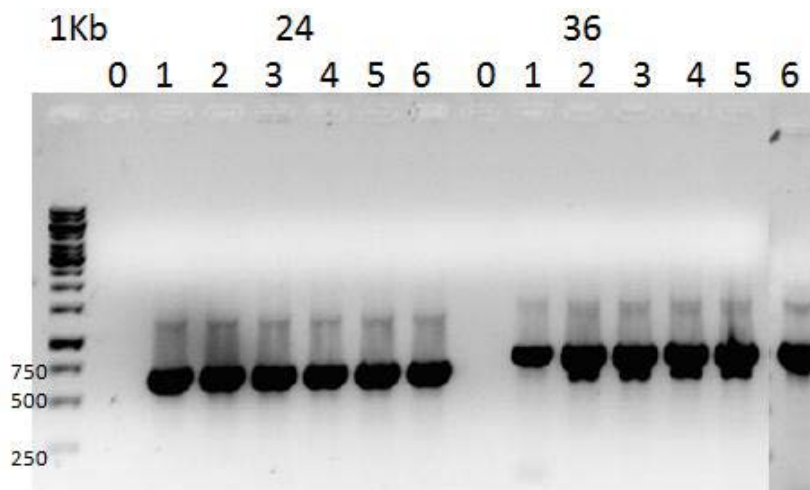


Figura 11. PCR de colônia para confirmação dos clones recombinantes em pET 42a. Eletroforese em gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo. 24 (620pb) (PCRs positivos 1, 2, 3, 4, 5 e 6) e 36 (739pb) (PCRs positivos 1,2,3,4,5 e 6). 0: controle negativo;: colônia. 1Kb: Peso molecular 1Kb Gene Ruller (Fermentas).

5.6 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS EM *E. coli*

Os clones pET42/Lc24 e pET42/Lc36 foram transformados em bactérias *E. coli*, linhagem Rosetta (DE3) competentes e as colônias selecionadas foram analisadas em SDS-PAGE 12% para confirmação da expressão da proteína de interesse. Foram realizadas três condições de indução: a 20° C, a 30° C e a 37° C para verificar qual melhor temperatura para expressão da proteína. A melhor temperatura de expressão de proteínas foi a 37° C (Figura 12).

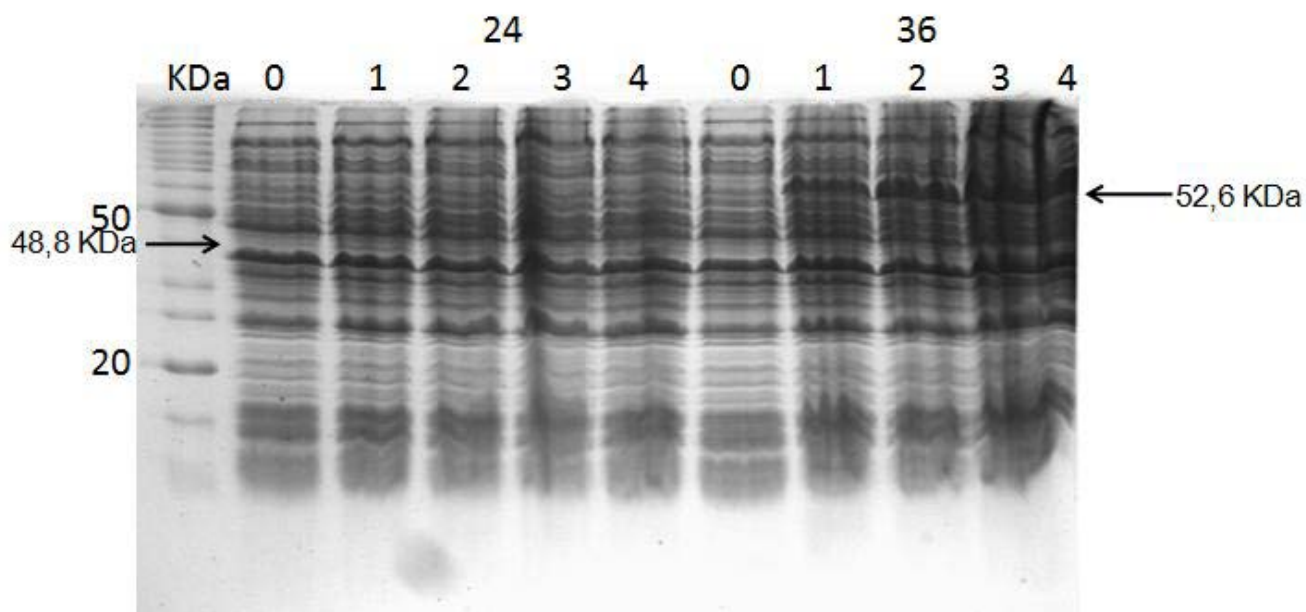


Figura 12. Análise da expressão das proteínas em *E. coli* à temperatura de 37°C. SDS-PAGE 12%, corado com *Comassie blue*. Extrato de células: 24 - pET42/Lc 24 (ponto 0: não induzido; 1,2,3 e 4 horas); 36 - pET42/Lc 36 (ponto 0: não induzido; 1,2,3 e 4 horas). KDa: *BenchMark Protein Ladder*. A seta indica a localização das proteínas induzidas.

As suspensões bacterianas foram lisadas por sonicação, e o pellet e o sobrenadante aplicados no gel de poliacrilamida para detecção da solubilidade das proteínas. Os ensaios foram realizados nas três temperaturas: 20° C, 30° C e 37° C. A 37° C, as proteínas de fusão rLc24 e rLc36 apresentaram maior solubilidade (Figura 13).

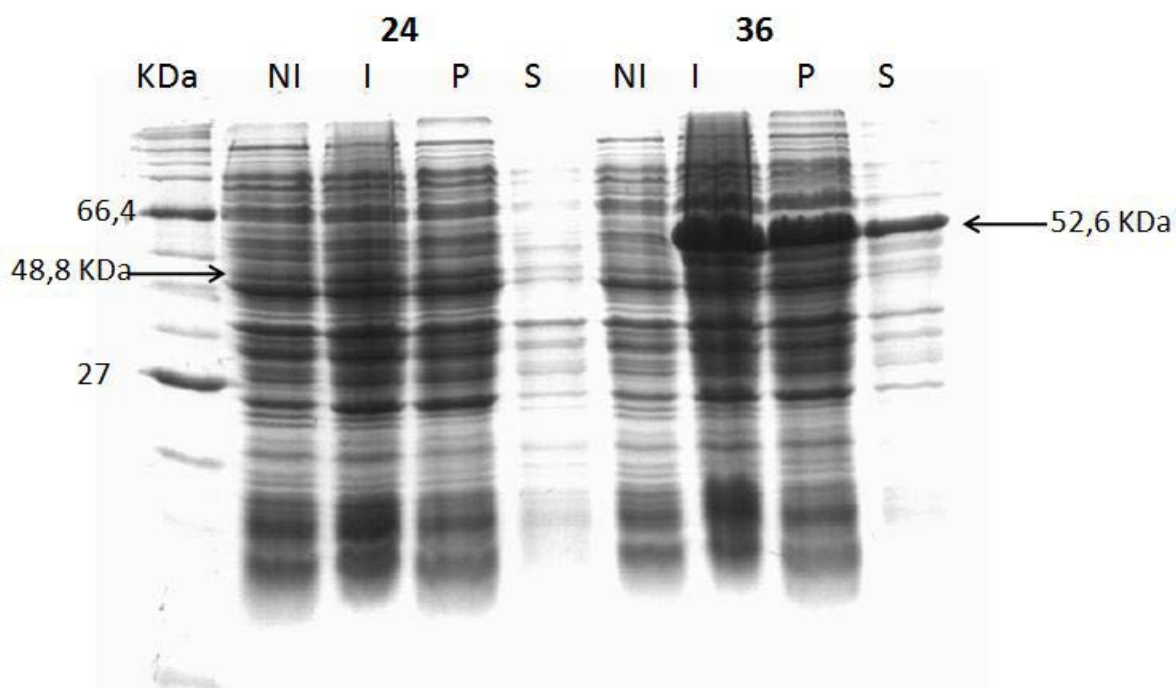


Figura 13. Solubilidade das proteínas recombinantes rLc24 e rLc36. SDS-PAGE 12%, corado com *Comassie blue*. Extrato celular de *E. coli*. NI – não induzido; I – induzido com IPTG; P – pellet; S – sobrenadante. A seta indica a localização das proteínas. KDa – *Protein Marker, Broad Range*, (2-212 kDa) (New England, BioLabs).

5.7 DETECÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Para detecção das proteínas recombinantes rLc24 e rLc36 foi realizada a técnica de *Western Blot* utilizando anticorpo anti-His (Figura 14). Os anticorpos anti-His foram capazes de detectar as bandas das proteínas esperadas rLc24 e rLc36, porém constatou-se que as proteínas sofreram degradação.

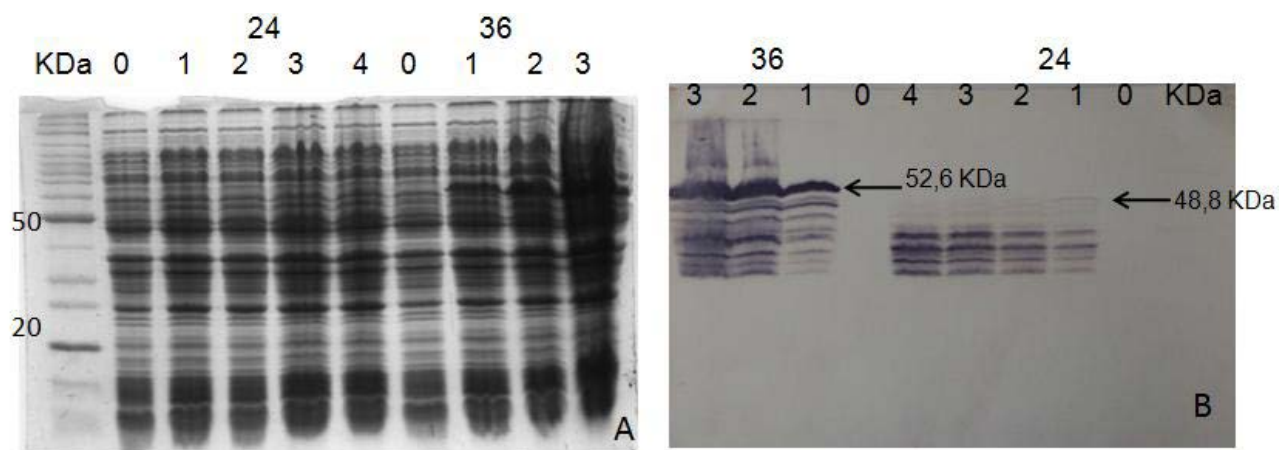


Figura 14. Confirmação das proteínas recombinantes rLc24 e rLc36. **Painel A:** SDS-PAGE 12%, corado por *Comassie blue*. Extrato celular de *E. coli* Rosetta DE3 induzidas à 37° C. **Painel B:** *Western Blotting* do extrato celular de *E. coli* Rosetta DE3 induzidas à 37° C. 0: proteína não induzida, 1, 2, 3 e 4: proteína induzida após 1, 2, 3 e 4 horas.

A técnica de *Western Blot* utilizando anticorpo anti-His também foi realizada para detecção das frações solúveis na temperatura de indução a 37° C (Figura 15).

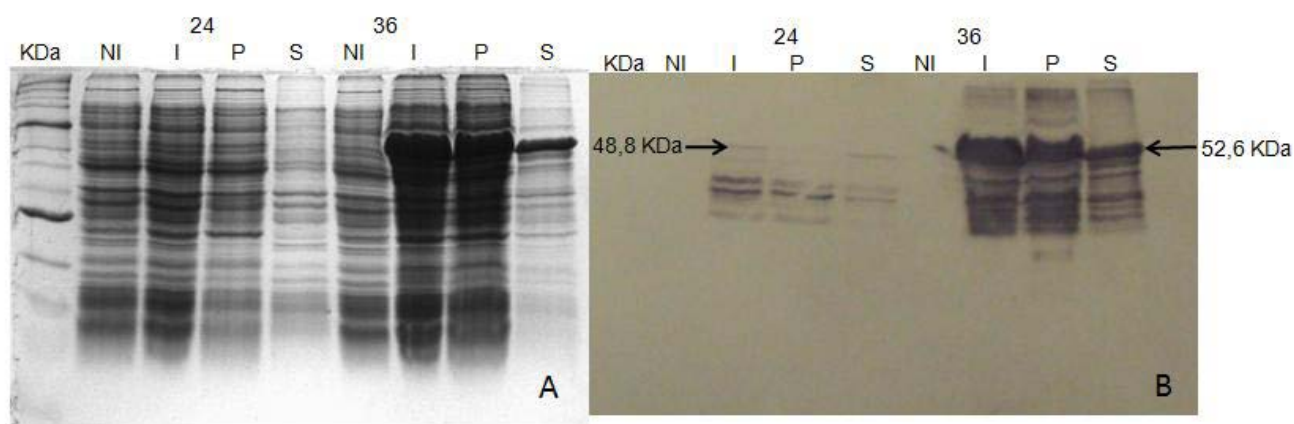


Figura 15. Detecção da fase solúvel das proteínas recombinantes rLc24 e rLc36 induzidas em *E. coli* Rosetta DE3 a 37° C. **Painel A:** SDS-PAGE 12%, corado por *Comassie blue*. **Painel B:** *Western Blotting* das proteínas rLc24 e rLc36 induzida com IPTG à 37° C, sonicadas e separadas por pellet e sobrenadante. NI – não induzida; I – induzida; P – pellet; S- sobrenadante.

5.8 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

As proteínas recombinantes rLc24 e rLc36 em sua fase solúvel foram purificadas utilizando coluna cromatográfica de Níquel e coluna de Glutathione (ITEM 4.12). A purificação em coluna de Níquel mostrou baixo rendimento, sendo, portanto, utilizada a apenas a coluna de Glutathione (Figura 16 e Figura 17). O produto purificado foi confirmado quanto à imunoreatividade com o anticorpo anti-His em *Western Blotting*.

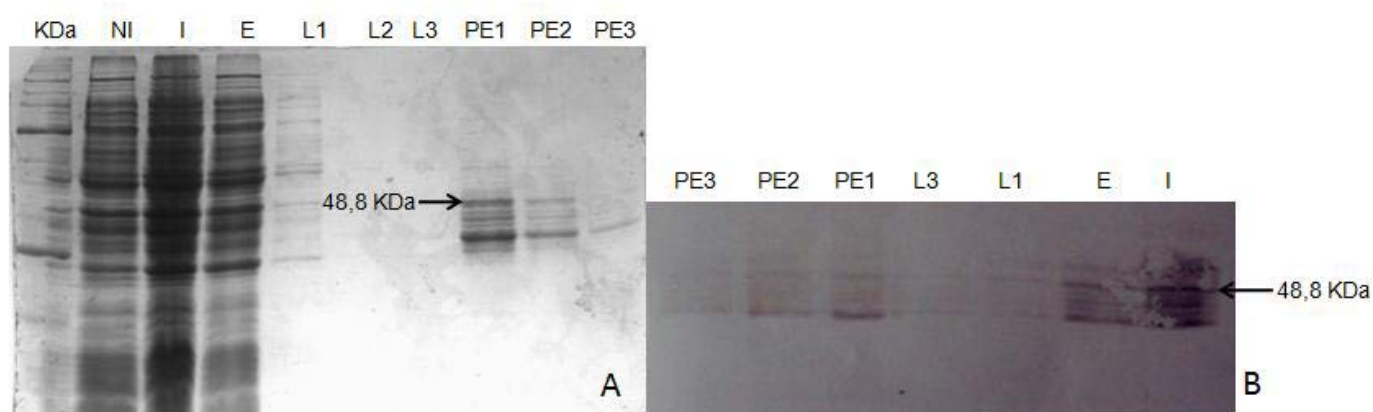


Figura 16. Purificação da proteína recombinante rLc24 por cromatografia de afinidade em coluna de Glutathione. **Painel A:** SDS-PAGE 12%, corado por *Comassie blue*. Extrato celular de *E. coli* Rosetta (DE3) expressado à temperatura 37° C da proteína recombinante rLc24 e purificadas usando coluna GST. KDa – *Ladder Protein*; NI – não induzida; I – induzida; E – eluato (sobrenadante filtrado); L1 – lavagem 1; L2 – lavagem 2; L3 – lavagem 3; PE 1 – proteína eluída 1; PE 2 – proteína eluída 2; PE 3 – proteína eluída 3. **Painel B:** *Western Blotting* do extrato celular da purificação da proteína recombinante Lc24p em coluna de GST.

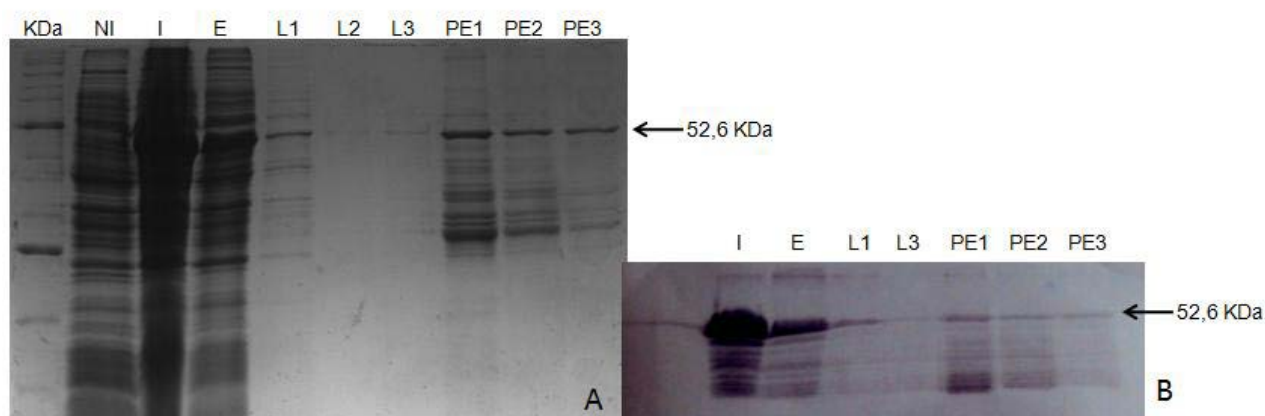


Figura 17. Purificação da proteína recombinante rLc36 por cromatografia de afinidade em coluna de Glutathione. **Painel A:** SDS-PAGE 12%, corado por *Comassie blue*. Extrato celular de *E. coli* Rosetta (DE3) expressado à temperatura 37° C da proteína recombinante rLc36 e purificadas usando coluna GST. KDa – *Ladder Protein*; NI – não induzida; I – induzida; E – eluato (sobrenadante filtrado); L1 – lavagem 1; L2 – lavagem 2; L3 – lavagem 3; PE 1 – proteína eluída 1; PE 2 – proteína eluída 2; PE 3 – proteína eluída 3. **Painel B:** *Western Blotting* do extrato celular da purificação da proteína recombinante Lc36p em coluna de GST.

5.9 IMMUNOBLOTTING

Após purificação das proteínas recombinantes rLc24 e rLc36 por cromatografia de afinidade em coluna de GST, as amostras foram testadas quanto à imunorreatividade. Diferentes concentrações das proteínas rLc 24 e rLc 36 foram dispostas em *blots* em membranas de nitrocelulose previamente umedecidas com água destilada e secadas a vácuo. As concentrações de proteínas foram: 0,1; 0,01 e 0,001µg/ml. Diferentes diluições do *pool* de soro de cães infectados foram testadas: 1:10, 1:50 e 1:100. As proteínas nas concentrações de 0,1 e 0,01µg/ml apresentaram reatividade após serem encubadas com pool de soro de cães infectados a diluição de 1:10 e com anticorpo anti-*dog* IgG ligado a peroxidase. O

controle negativo, realizado com pool de soro de cães não infectado, não apresentou nenhuma reatividade. A figura 18 mostra o ensaio de imunorreatividade das proteínas recombinantes rLc 24 e rLc36.

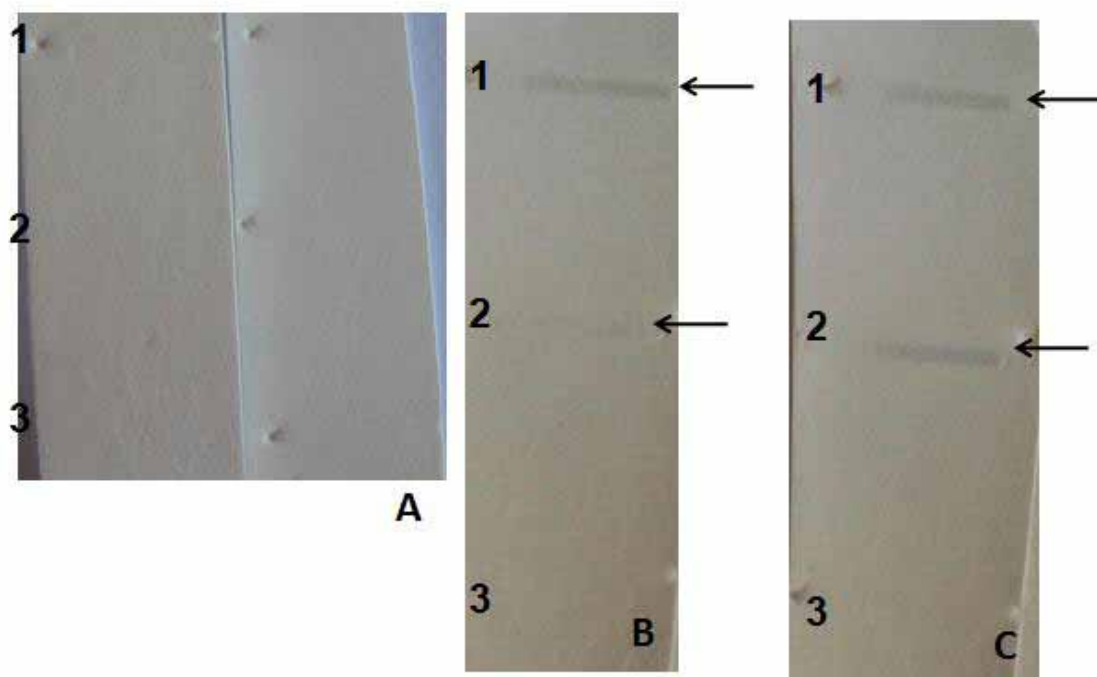


Figura 18. Ensaio de imunorreatividade das proteínas recombinantes rLc24 e rLc36. Análise das amostras de soro de cães infectados e não infectados com LV analisados por *immunoblotting* utilizando anticorpo anti-dog IgG. **Painel A:** Controle negativo. *Pool* de soros de cães não infectados com LV. **Painel B:** *Immunoblotting* da proteína rLc24. **Painel C:** *Immunoblotting* da proteína rLc36. As setas indicam a reatividade das proteínas nas diferentes concentrações das proteínas. 1. Proteína recombinante a concentração de 0,1µg/ml. 2. Proteína recombinante a concentração de 0,01µg/ml. 3. Proteína recombinante a concentração de 0,01µg/ml.

6. DISCUSSÃO

O diagnóstico da LVC representa um problema para os serviços de saúde pública e para os pesquisadores um desafio. O diagnóstico clínico não é específico, uma vez que apresenta sintomas associados com outras enfermidades, sendo necessário, portanto, o diagnóstico parasitológico e sorológico. Os métodos parasitológicos, incluindo demonstração direta do parasito por microscopia e isolamentos do parasito em cultura de aspirado de material biológico constituem métodos diagnósticos de certeza, porém o emprego dessas técnicas na rotina de laboratórios clínicos apresenta limitações, pois a distribuição dos parasitas nos tecidos não é homogênea, variando assim a sensibilidade de tais procedimentos (OSMAN et al., 1997; REALE et al., 1999; GONTIJO e MELO, 2004), somando-se a isto os procedimentos de coleta de material são invasivos e há a necessidade de profissionais qualificados (METTLER et al, 2005). Na última década, a introdução de métodos moleculares, baseados na PCR contribuiu para o aumento da sensibilidade com especificidade confirmada para detectar DNA de *Leishmania* em amostras biológicas (PIRMEZ et al, 1999), mas também apresentam limitações principalmente relacionadas ao custo operacional. Os testes sorológicos, baseado na detecção de anticorpos específicos anti- *Leishmania* representam uma ferramenta importante, uma vez que sua utilização é facilitada por ser menos invasiva e assim possibilitar maior praticidade.

Devido à falta de padronização das técnicas empregadas, os ensaios sorológicos atualmente disponíveis apresentam problemas em relação à sensibilidade e especificidade, pois apresentam resultados variáveis de acordo com as diferentes regiões estudadas, comprometendo o controle da doença (FERRER et

al, 1995; MANCIATI et al, 1996; GONTIJO e MELO, 2004; LAURENTI, 2009).

É importante ressaltar a necessidade de pesquisa de novos componentes antigênicos purificados que possam ser utilizados como ferramenta para obtenção de um diagnóstico alternativo, assegurando maior sensibilidade e especificidade aos testes. Os antígenos purificados têm mostrado maior sensibilidade que os antígenos brutos, porém sua preparação muitas vezes dispendiosa requer métodos sofisticados de purificação (CARVALHO et al, 2003; ROSÁRIO et al, 2005). Vários antígenos foram identificados e testados: A2, antígeno expresso em amastigotas, foi testado na Índia e no Sudão, com 60% e 82% de reatividade, respectivamente, no Brasil mostrou reatividade de 77% em humanos e 87% em cães com teste de RIFI positivo (CARVALHO et al, 2003); rGBP, proteína recombinante contendo 28 aminoácidos repetitivos, é expressa na superfície de formas promastigotas metacíclicas infectivas e formas amastigotas de *L. major* (JENSEN et al, 1999); rORFF, proteína recombinante codificada no locus LD1 do cromossomo 35 de *L. infantum*, é reconhecida no soro de pacientes com a forma visceral da doença (RAJ, et al, 1999), rK9/ rk26 (BHATIA et al, 1999) e rK39 (BURNS et al, 1993; BADARO et al, 1996). Algumas dessas proteínas recombinantes diminuíram a reatividade cruzada, porém também diminuíram a sensibilidade dos testes (GONTIJO e MELO, 2004). Destas proteínas recombinantes, o antígeno rK39 mostrou ser o mais sensível no diagnóstico da LV (BRAZ et al, 2002). No entanto, testes rápidos utilizando esta proteína recombinante como antígeno, mostraram-se mais adequados para os diagnósticos de casos de LVC sintomáticos, apresentando pouca sensibilidade em cães assintomáticos (REITHINGER et al, 2002; Da COSTA et al, 2003; OTRANTO et al, 2004; METTLER et al, 2005). Não detectar cães infectados assintomáticos dificulta o controle desta parasitose, pois os cães podem

permanecer assintomáticos por muito tempo, a prevalência da infecção em uma área endêmica pode ficar subestimada (DIAS et al, 2008). Dessa maneira, faz-se necessário buscar novos antígenos purificados que possam ser utilizados como ferramenta para detecção, principalmente da população canina assintomática.

Recentemente, Peacock e colaboradores (2007) identificaram genes codificados apenas na espécie *L. infantum* causadora da LV. Estes genes podem estar relacionados a diferenças na apresentação da doença, resposta imune e patogenicidade, quando comparadas às demais espécies causadoras das leishmanioses: cutânea e mucocutâneas (*L. major* e *L. braziliensis*) (PEACOCK et al, 2007). Estes genes específicos de *L. infantum*, e ausentes no genoma de outros tripanosomatídeos, podem codificar proteínas com potencial aplicação no desenvolvimento de novos testes diagnósticos, minimizando problemas com reação cruzada apresentada pelo soro de animais infectados com os demais parasitos desta família.

Co - infecção causada por *T. cruzi* e *L. infantum* (*syn = chagasi*) foi sugerida por diversos autores (CHIARAMONTE et al, 1996; 1999; TRONCARELLI et al, 2008; OLIVEIRA et al, 2008), e é considerada um importante problema em diversas regiões da América Latina onde as áreas endêmicas dessas duas parasitoses se interpõe frequentemente (DESJEUX et al., 1983). Pode ainda, haver reação cruzada e os testes diagnósticos usados podem confundir em relação a inquéritos epidemiológicos e na prevenção e tratamento das infecções (CAMARGO e REBONATO, 1969; SOARES GUIMARAES et al., 1981; CAMARGO, 1988; CHIARAMONTE et al., 1999), e uma confirmação sorológica não pode ser realizada, a não ser que antígenos específicos sejam usados, sendo necessário portanto que

um teste diagnóstico mais específico seja desenvolvido para diagnosticar corretamente a parasitose (CHIARAMONTE et al, 1999).

Segundo Bastrenta e colaboradores (2003), infecção concomitante entre espécies de *Leishmania* e *T. cruzi* ocorreu em 41% dos pacientes estudados na Bolívia. Portanto, na escolha das proteínas recombinantes específicas, teve-se o cuidado de selecionar regiões do genoma de *Leishmania infantum* (syn = *chagasi*) que não houvesse similaridade com *T. cruzi*. As proteínas recombinantes rLc24 e rLc 36 não possuem qualquer similaridade, porém as sequências do gene Lc 06 e Lc 22 apresentaram similaridade, porém muito baixa de 36 e 38%, respectivamente.

Fragmentos dos genes Lc 06 e Lc 22 foram selecionados devido a presença de repetições em Tandem que consistem em duas ou mais cópias de sequências de nucleotídeos. Estes domínios repetitivos são frequentemente epítomos de células B, havendo grandes chances de serem imunogênicos (GOTO, 2007). Porém, os fragmentos foram amplificados, clonados em vetor de propagação e seqüenciados. O seqüenciamento indicou que os clones não eram aqueles que foram selecionados. Provavelmente isso ocorreu devido às inúmeras repetições presentes nos fragmentos.

Os transportadores ABC distribuídos em genes de *Leishmania* em sua maioria apresentam função desconhecida, sendo pouco deles capazes de conferir resistência às drogas no parasita (LEPROHON et al, 2006). Antimoniais pentavalentes são os medicamentos de primeira linha no combate a leishmaniose (MURRAY, 2005), porém sua eficácia é questionável devido à resistência do parasita em diversas regiões no Brasil, onde a leishmaniose é endêmica (HADIGUI et al, 2006; ROJAS et al, 2006). A proteína recombinante rLc24 apresenta proteínas de membrana, os transportadores ABC, possuindo grandes chances de ser

imunogênico. As proteínas de superfície, possuem alta estabilidade, tornando-se bons candidatos a trabalhos em larga escala, como a glicoproteína GP36, de 36KDa, que apresenta 100% de sensibilidade e 96% de especificidade no teste ELISA (PALATINICK et al, 1995). A escolha da proteína recombinante rLc24, deve-se além de não apresentar similaridade com qualquer outro parasito, possuir proteínas de membrana, podendo ser usada no desenvolvimento de um teste diagnóstico específico e também para monitoramento terapêutico, devido a resistência a fármacos apresentada por estes transportadores ABC.

Embora existam tratamentos quimioterápicos para leishmaniose, que na maioria dos casos propiciam a cura clínica duradoura em humanos, porém transitória em cães, os medicamentos são caros, limitados e tóxicos (MURRAY et al, 2005), podendo ainda apresentar resistência medicamentosa (CROFT et al, 2006), e sequelas da doença. Além disso, não existe tratamento eficaz ou profilático para o cão infectado (DUNAN, et al 1989). Desta forma, a prevenção, como para qualquer outra doença infecciosa é mais importante do que a cura, tendo em vista que os métodos até agora utilizados são somente em parte efetivos na prevenção e controle da doença. Uma estratégia seria a vacinação profilática, sendo a forma mais eficiente do controle e propagação desta infecção (RODRIGUEZ-CORTES et al, 2007). Uma vacina deve ser segura, induzir resposta imune protetora e gerar memória imunológica (WAHREN & BRYTTING, 1997), ter baixo custo de produção, ser biologicamente estável e de fácil administração e acarretar pouco ou nenhum efeito colateral (MONTGOMERY et al., 1997). Apesar de haver bastantes pesquisas sobre a genética e a biologia do parasita e a infecção e também haver numerosas tentativas em desenvolver uma vacina bem sucedida contra a leishmaniose (PALATNICK et al, 1989; PALATNICK-De-SOUZA, 2008; DUNNING, 2009) ainda

não há uma vacina atualmente no mercado contra a leishmaniose humana (REITHINGER et al, 2007), e as duas vacinas já descritas na literatura para cães são caras e necessitam de três doses (GONTIJO & MELO, 2004).

Para o desenvolvimento de uma vacina efetiva, é importante entender os mecanismos da resposta imune a infecção por *Leishmania* para que a vacina possa ser desenvolvida a fim de induzir uma resposta protetora. As proteínas recombinantes desenvolvidas apresentam imunogenicidade, podendo ser testadas futuramente a fim de desenvolver vacinas. As vacinas de segunda geração são aquelas que utilizam proteínas recombinantes e são testadas desde a década de 90 (PALATNICK-De-SOUZA, 2008), sendo formuladas com adjuvantes ou com vetores em bactérias. Em 2003 foi licenciada no Brasil, pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), a Leishmune®, vacina de segunda geração composta por FML e adjuvante saponina. A vacina demonstrou proteção de 92% a 99% em estudos de campo realizados com desafio natural (BORJA-CABRERA et al, 2002; 2008). Uma outra vacina de segunda geração a Leish-Tec® Essas proteínas recombinantes foram usadas contra todas as espécies de *Leishmania*, porém nenhuma delas avançou a fase IV, fase que analisa a eficácia da vacina contra a infecção natural. A eficácia destas vacinas produzidas com proteínas recombinantes na redução da parasitemia apresentou 68% segundo Palatnick-de-Souza, 2008.

As proteínas recombinantes desenvolvidas rLc24 e rL36, por serem de membrana promastigota, também poderão ser importante alvo para o desenvolvimento de vacinas com poder de induzir mecanismos neutralizadores ou facilitadores das imunidades celular e humoral de cães em áreas endêmicas deste parasita. Sob este aspecto, o controle da infecção pela *Leishmania*, após inoculação pecutânea pelo flebotomíneo vetor, tem sido alvo de muitas pesquisas com

potenciais antígenos vacinais para uso profilático ou terapêutico da leishmaniose canina e humana. A imunorreatividade das proteínas rLc24 e rLc36 foram avaliadas e confirmadas em teste *immunoblotting* frente a pool de soros de cães infectados e não infectados.

Outra importante possibilidade dessas proteínas de membrana expressas em fase promastigota, deve-se ao fato de novos estudos em relação à função destas proteínas na regulação do ciclo biológico da *Leishmania* e na infecção da doença podem ser desenvolvidos, pois a importância em se investigar a interação entre o parasita e o sistema imunológico do hospedeiro permite um melhor entendimento de como a infecção pode ser combatida ou como ocorrem as estratégias de evasão destes parasitas que influenciam na suscetibilidade do hospedeiro. Um melhor entendimento na função da regulação do ciclo biológico permite que novos medicamentos quimioterápicos possam ser utilizados, bem como no desenvolvimento de uma vacina profilática efetiva capaz de induzir uma resposta imune específica.

7. CONCLUSÕES

1. As ferramentas de bioinformática empregadas foram capazes de identificar quatro potenciais proteínas específicas de *L. infantum* (*syn* = *chagasi*) (Lc 06, Lc22, Lc 24 e Lc 36), indicando parâmetros importantes como peso molecular, ponto isoelétrico, hidrofiliçidade, presença de domínios transmembrana, presença de sequências em Tandem Repeat (TR) e ausência de similaridade com qualquer outro tripanosomatídeo.
2. As sequências protéicas dos fragmentos Lc 06 e Lc 22 apresentaram baixa similaridade com *T. cruzi*, sequências repetitivas em Tandem, porém não foram clonados no vetor de expressão pET 42a, devido a dificuldade na amplificação destes genes.
3. As proteínas recombinantes rLc24 e rLc 36 não apresentam nenhuma similaridade com outro tripanosomatídeo, nem com qualquer outro agente infeccioso que possa co-infectar humanos e cães.
4. As proteínas recombinantes rLc24 e rLc36 foram clonadas em vetor de expressão pET42a e expressas em bactéria *E. coli* linhagem Rosetta (DE3).
5. As proteínas recombinantes rLc24 e rLc36 apresentam imunorreatividade, pois em presença de *pool* de soro de cães infectados com leishmaniose visceral, o anticorpo anti- *dog* IgG reconheceu as proteínas.
6. As proteínas recombinantes são específicas a espécie *L. infantum* (*syn* = *chagasi*) e podem ser desenvolvidas em um teste diagnóstico mais sensível e mais específico que o kit comercial utilizado.
7. Por serem proteínas de membrana e por apresentarem reação imunogênica em soro de cães infectados, poderão ser utilizadas como estratégias terapêuticas, podendo ser um potencial antígeno vacinal.

8. A proteína recombinante rLc24 apresenta transportador ABC, podendo ser estudada quanto a sua função em relação a resistência a medicamentos e podendo ser usada para monitoramento terapêutico.
9. Há a possibilidade de novos estudos em relação às proteínas referentes a função na regulação do ciclo biológico do protozoário e da infecção.

10.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abath F. G., S. M. Montenegro, Y. M. Gomes. Vaccines against human parasitic disease: an overview. *Acta Trop*, v.71, n.3, p. 237-254. 1998.
- Abbas, A. K., A. H. Lichtman. *Cellular and Molecular Immunology*. 5 ed. Philadelphia, PA, USA: Saunders. p. 432-452, 562p. 2003.
- Aisa, M. J., S. Castillejo, *et al*. Diagnostic potential of Western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. *Am J Trop Med Hyg*, v.58, n.2, Feb, p.154-9. 1998.
- Alencar, J. E. Calazar Canino. Contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil. Ceará, 1959. 342 p.
- Almeida, M. C., V. Vilhena, A. Barral, M. Barral-Netto. Leishmanial infection: Analysis of its first steps. A review. Mem Inst Oswaldo Cruz. v. 98, n. 7, p. 861-870. 2003.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, *et al*. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, v.25, n.17, Sep 1, p.3389-402. 1997.
- Alvar J., C. Canavate, R. Molina, J. Moreno, J. Nieto Canine leishmaniasis. Adv Parasitol, v.57, p. 1-88. 2004.
- Andrade, S. L., N. F. Fé, F. F. Fé, L. M. Toledo, G. A. S. Romero. Leishmaniose tegumentar americana em área de ocupação recente na periferia da cidade de Manaus, estado do Amazonas, Brasil – Avaliação entomológica. Rev Soc Bras Med Trop. v. 32, p. 11-12. 1999.
- Ashford, D. A., J. R. David, *et al*. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, v.59, n.1, Jul, p.53-7. 1998.
- Badaro, R. Progress of research in visceral leishmaniasis in the endemic area of Jacobina-Bahia 1934-1989. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.21, n.4, Oct-Dec, p.159-64. 1988.
- Badaro, R., D. Benson, *et al*. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*, v.173, n.3, Mar, p.758-61. 1996.
- Bastrenta, B., N. Mita, R. Buitrago, F. Vargas, M. Flores, M. Machane, N. Yacsik, M. Torrez, F. Le Pont, F. Brenière. Human mixed infections of *Leishmania spp.* and *Leishmania-Trypanosoma cruzi* in a sub Andean Bolivia area: identification by polymerase chain reaction/hybridization and isoenzyme. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 98, n. 2, p. 255-264, 2003.

Beverley, S. M., R. B. Ismach, D. M. Pratt. Evolution of the genus *Leishmania* as revealed by comparisons of nuclear DNA restriction fragment patterns. Evolution and Medical Sciences. v. 84, p. 484-488.1987.

Bhatia, A., N. S. Daifalla, *et al.* Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasitol*, v.102, n.2, p.249-61. 1999.

Bogdan, C., M. Röllinghoff, a. Diefenbach. The role of nitric oxide in innate immunity. Immunological Reviews. v. 173, p. 17–26. 2000

Borja-Cabrera, G. P., N. N. Correia Pontes, V. O. da Silva, E. Paraguai de Souza, W. R. Santos, E. M. Gomes, *et al.* Long lasting protection against canine kala-azar using the ML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante). Vaccine, v. 20, p. 3277-3284. 2002.

Borja-Cabrera, G. P., A. Cruz Mendes, E. Paraguai de Souza, L. Y. Hashimoto Okada , F. A. de A Trivellato, J. K. Kawasaki, A. C. Costa, A. B. Reis, O. Genaro, L. M. Batista, M. Palatnik, C. B. Palatnik-de-Sousa. Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. Vaccine. v. 22, n.17-18, p. 2234-43. 2004.

Borja-Cabrera, G. P., F. N. Santos, F. S. Bauer, L. E. Parra, I. Menz, A. A. Morgado, I. S. Soares, L. M. Batista, C. B. Palatnik-de-Sousa. Immunogenicity assay of the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. Vaccine. Sep 15, v. 26, n. 39, p. 4991-7. 2008.

Borja-Cabrera, G.P., F. N. Santos, F. B. Santos, F. A. Trivellato, J. K. Kawasaki, A. C. Costa, T. Castro, F. S. Nogueira, M. A. Moreira, M. C. Luvizotto, M. Palatnik, C. B. Palatnik-de-Sousa. Immunotherapy with the saponin enriched-Leishmune vaccine versus immunochemotherapy in dogs with natural canine visceral leishmaniasis. Vaccine. v. 28, n. 3, p.597-603. 2010.

Braga, M. D., I. C. Coelho, *et al.* [Control of canine visceral leishmaniasis: comparison of results from a rapid elimination program of serum-reactive dogs using an immunoenzyme assay and slower elimination of serum-reactive dogs using filter paper elution indirect immunofluorescence]. Rev Soc Bras Med Trop, v.31, n.5, Sep-Oct, p.419-24. 1998.

Brasil, M. S. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Série A normas e manuais. Brasília – DF: Editora MS, 2003. 122 p.

Braz, R.F., E. T. Nascimento, D. R. Martins, M. E. Wilson, R. D. Pearson, S. G. Reed, S. M. Jeronimo. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. Am J Trop Med Hyg, v. 67, n. 4, p. 344-348. 2002.

Bryceson, A. D. M. Therapy in man *In*: Peters W, Killick-Kendrick R (ed). The leishmaniasis. Biology and Medicine, Academic Press, p. 848- 907, 1987.

Burns, J. M., Jr., W. G. Shreffler, *et al.* Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. Proc Natl Acad Sci U S A, v.90, n.2, Jan 15, p.775-9. 1993.

Camargo, M. E., C. Rebonato. Cross-reactivity fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 18, p. 500–505. 1969.

Camargo, M. E. Jr., 1988. American trypanosomiasis (Chagas' disease). In: Balows, A., Hausler, W.J. Jr., Lennette, E. (Eds.), Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases, Principles and Practice. Springer, New York, pp. 744–753.

Carrillo, E., J. Moreno. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. Vet Immunol Immunopathol, v.128, p. 67-70. 2009.

Carvalho, L. P., M. Soto, S. Jerônimo, B. Dondji, O. Bacellar, V. Luz, G. O. Orge, C. Alonso, A. R. Jesus, E. M. Carvalho. Characterization of the immune response to *Leishmania infantum* recombinant antigens. Microbes and Infection, v.5, p.7-12. 2003.

Chagas, E., A. M. Cunha, *et al.* Leishmaniose visceral americana. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.33, n.1, p.89-229. 1938.

Chen, J., C. A. Rauch, *et al.* The topology of the kinetoplast DNA network. Cell, v.80, n.1, Jan 13, p.61-9. 1995.

Chiaramonte, M. G., N. W. Zwirner, S. L. Caropresi, N. J. Taranto, E. L. Malchiodi. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. Human mixed infection. Am J Trop Med Hyg, v.54, p.271-273, 1996.

Chiaramonte, M. G., F. M. Frank, G. M. Furer, N. J. Taranto, A. Margnir, E. L. Malchiodi. Polymerase chain reaction reveals *Trypanosoma cruzi* infection suspected by serology in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis patients. Acta Tropica, v.72, p.295-308, 1999.

Ciaramella, P., G. Oliva, *et al.* A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. Vet Rec, v.141, n.21, Nov 22, p.539-43. 1997.

Cortes, S., N. Rolao, *et al.* PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.98, n.1, Jan, p.12-7. 2004.

Costa, J. M., G. M. Viana, *et al.* Visceral leishmaniasis in the State of Maranhao, Brazil: evolution of an epidemic. Cad Saude Publica, v.11, n.2, Apr-Jun, p.321-4. 1995.

Costa, C. H. e J. B. Vieira. Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil. Rev Soc Bras Med Trop, v.34, n.2, Mar-Apr, p.223-8. 2001.

Courtenay, O., R. J. Quinnell, *et al.* Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. J Infect Dis, v.186, n.9, Nov 1, p.1314-20. 2002.

Croft S, S. Sundar, H. Fairlamb. Drug resistance in leishmaniasis. Clin Microbiol Rev, v. 19, p. 111–126. 2006.

Cunha, S., M. Freire, *et al.* Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.89, n.2, Mar-Apr, p.155-8. 1995.

Da Costa, R. T., J. C. Franca, *et al.* Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens K39 and K26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.97, n.6, Nov-Dec, p.678-82. 2003.

Da-Cruz, A. M. e K. B. Azeredo-Coutinho. Leishmaniose Tegumentar Americana. Rio de Janeiro: Cultura Médica. 2001 (Medicina Tropical - Abordagem Atual das Doenças Infecciosas e Parasitárias)

Dantas-Torres, F. Final comments on an interesting taxonomic dilemma: *Leishmania infantum* versus *Leishmania infantum chagasi*. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.101, n.8, Dec, p.929-30. 2006a.

Dantas-Torres, F. Increasing case fatality rate of visceral leishmaniasis in Brazil. Rev Bras Vigilância Sanitária, v. 1, p.260-263. 2005.

Dantas-Torres, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.101, n.1, Feb, p.117-8; discussion 118. 2006b.

da Silva, V. O., G. P. Borja-Cabrera, N. N. Correia Pontes, E. Paraguai de Souza, K. G. Luz, M. Palatnik, *et al.* A Phase III trial of Efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). Vaccine, v. 19, p.1082– 1092. 2001.

Deane, L. M. e M. P. Deane. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios de *Leishmania donovani* em área endêmica de calazar no Ceará. Hospital, v.48, p.61-76. 1955.

Deane, L. M. e M. P. Deane. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.4, May-Jun, p.198-212. 1962.

Desjeux, P., E. Aranda, O. Aliaga, S. Mollinedo. Human visceral leishmaniasis in Bolivia: first proven case from 'Los Jungas'. Trans R Soc Trop Med Hyg, v. 77, p. 851–855. 1983.

Desjeux, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp. Immunol. Microbiol Infect Dis, v. 27, p.305–318. 2004.

Dias, E. L., Z. da S. Batista, R. de M. S. N. de C. Guerra, K. da S. Calabrese, T. B. Lima, A. L. Abreu-Silva. Canine visceral leishmaniasis (CVL): seroprevalence, clinical, hematological and biochemical findings of dogs naturally infected in an endemic area of São José de Ribamar Municipality, Maranhão state, Brazil. Ciência Animal Brasil, v. 9, n. 3, p. 740-745, jul./set. 2008.

Dourado, Z. F., H. D. Silva, E. de P. Silveira-Lacerda, M.T.A. García-Zapata. Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (rk39). Rev Patol Trop. v. 36, n. 3, p. 205-214. 2007.

Duarte, M. I., M. D. Laurenti, *et al.* Interstitial pneumonitis in canine visceral leishmaniasis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.28, n.6, Nov-Dec, p.431-6. 1986.

Dunan S., D. Fromel, L. Monjour, B. W. Ogunkolade, A. Cruz, M. Quilici. Vaccination trial against canine visceral leishmaniasis. Parasite Immunol, v.11, p. 397-492. 1989.

Dye, C., R. Killick-Kendrick, *et al.* Epidemiology of canine leishmaniasis: prevalence, incidence and basic reproduction number calculated from a cross-sectional serological survey on the island of Gozo, Malta. Parasitology, v.105 (Pt 1), Aug, p.35-41. 1992.

Dye, C., E. Vidor, *et al.* Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. Epidemiol Infect, v.110, n.3, Jun, p.647-56. 1993.

Falqueto, A., P. A. Sessa, *et al.* Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in Espírito Santo State, Brazil. Further evidence on the role of dogs as a reservoir of infection for humans. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.86, n.4, Oct-Dec, p.499-500. 1991.

Feitosa, M. M. D. Avaliação clínica de animais naturalmente infectados. I Forum sobre leishmaniose visceral canina. Jaboticabal. 11 de Março de 2006, 2006.

Ferreira, E. C., M. de Lana, M. Carneiro, A. B. Reis, D. V. Paes, E. S. da Silva, H. Schalling, C. M. F. Gontijo, Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. Vet Parasitol, v.146, p.235-241, 2007.

Ferrer, L., M. J. Aisa, X. Roura, M. Portús. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. Veterinary Record, v. 136, p. 514-516.1995.

Ferrer, L. Clinical aspects of canine leishmaniasis. International Canine Leishmaniasis Forum. Barcelona, 1999. 6-10 p.

Ferrer, L. The pathology of canine leishmaniasis. In: proceedings of second international canine leishmaniasis forum. Sevilla, Spain. Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. Salamanca: Intervet Internacional bv, 2002. p. 21-24.

Fisa, R., M. Gallego, *et al.* Serologic diagnosis of canine leishmaniasis by dot-ELISA. J Vet Diagn Invest, v.9, n.1, Jan, p.50-5. 1997.

Fondevila, D., M. Vilafranca, *et al.* Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. Vet Immunol Immunopathol, v.56, n.3-4, May, p.319-27. 1997.

Font, A. e J. M. Closa. Ultrasonographic localization of a caudal vena cava thrombus in a dog with leishmaniasis. Vet Radiol Ultrasound, v.38, n.5, Sep-Oct, p.394-6. 1997.

Forattini, O. Entomologia Médica: Editora Edgar Blucher Ltda. e Editora da Universidade de São Paulo, v.Psychodidae. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose. 4º volume. 1973. 658 p.

Genaro, O. *et al.* Naturally occurring leishmaniasis in dogs: clinical aspects. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.83, p.43, 1988.

Ginel, P.J., R. Lucena, R. López, J. M. Molleda. Use of allopurinol for maintenance of remission in dogs with leishmaniasis. J. of Small Animal Practice. v. 39, p. 271-274. 1998.

Goncalves, R., W. L. Tafuri, *et al.* Chronic interstitial pneumonitis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*: a histopathological and morphometric study. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.45, n.3, May-Jun, p.153-8. 2003.

Gontijo, B., M. L. R. Carvalho. Leishmaniose Tegumentar Americana. Rev Soc Bras Med Trop, v.36, n. 1, p. 71-80. 2003.

Gontijo, C. M. F., M. N. Melo. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. Rev Bras Epidemiol, v. 7, São Paulo, n. 3, Sept. 2004.

Gonzalez, J. L., M. L. Fermin, *et al.* Erosive colitis in experimental canine Leishmaniasis. Zentralbl Veterinarmed B, v.37, n.5, Jul, p.377-82. 1990.

Gonzalo, R. M., J. R. Rodríguez, D. Rodríguez, G. González-Aseguinolaza, V. Larraga, M. Esteban. Protective immune response against cutaneous leishmaniasis by prime/booster immunization regimens with vaccinia virus recombinants expressing *Leishmania infantum* p36/LACK and IL-12 in combination with purified p36. Microbes and Infection. v. 3, n. 9, p. 701-711. 2001.

Goto, Y., R. N. Coler, *et al.* Bioinformatic identification of tandem repeat antigens of the *Leishmania donovani* complex. Infect Immun, v.75, n.2, Feb, p.846-51. 2007.

Gradoni, L. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. Vet. Parasitol, v. 100, p. 87-103, 2001.

Gramiccia, M., L. Gradoni, S. Orsini. Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of *Leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment. Ann. Trop. Med. Parasitol., v. 86, p. 613-20. 1992.

Grevelink, S. A. e E. A. Lerner. Leishmaniasis. J Am Acad Dermatol, v.34, n.2 Pt 1, Feb, p.257-72. 1996.

Griffin J. F. A strategic approach to vaccine development: animal models monitoring vaccine efficacy, formulation and delivery. Adv. Drug Deliv. Rev., v.54, n. 6, p. 851-861. 2002.

Grimaldi, G. Jr., R. B. Tesh. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. Clin Microbiol Rev, V.6, N. 3, P. 230-250. 1993.

Guedes, G. E., A. Maroja, *et al.* Calazar no litoral do estado da Paraíba, Brasil. Encontro de 70 casos humanos e 16 caninos. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v.16, p.265-600. 1978.

Hadighi, R., M. Mohebbi, P. Boucher, H. Hajjarian, A. Khamesipour, and M. Ouellette. Unresponsiveness to Glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites. PLoS Med, v. 3, p.162. 2006.

Handman, E. Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development. Clin Microbiol Rev, v.14, n. 2, p. 229-243. 2001.

Harms, G., A. K. Chehade, M. Douba, M. Roepke, A. Mouakeh, F. Rosenkaimer, U. Bienzle. A randomized trial comparing a pentavalent antimonial drug and recombinant interferon- γ in the local treatment of cutaneous leishmaniasis. Transactions of the Royal Soc Trop Med Hyg. v. 85, n. 2, p. 214-216. 1991.

Jensen, A. T., S. Gasim, *et al.* Serodiagnosis of *Leishmania donovani* infections: assessment of enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant *L. donovani* gene B protein (GBP) and a peptide sequence of *L. donovani* GBP. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.93, n.2, Mar-Apr, p.157-60. 1999.

Killick-Kendrick, R. Anti-feeding effects of synthetic pyrethroids against phlebotomine sand flies and mosquitoes, and the prospects of controlling canine leishmaniasis with deltamethrin-impregnated Pro-tectorBands (Scalibor®). In R Killick-Kendrick, *Canine Leishmaniasis: an Update, Proceedings of a Canine Leishmaniasis Forum*, Barcelona (Sitges), p. 28-31 January, 1999, Wiesbaden: Hoechst Roussel Vet, p. 82-88. 1999.

Krauspenhar, C., C. Beck, *et al.* Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. Ciência Rural, p.37. 2007.

Kyte, J. e R. F. Doolittle. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J Mol Biol, v.157, n.1, May 5, p.105-32. 1982.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, v.227, n.5259, Aug 15, p.680-5. 1970.

Lainson, R. e E. F. Rangel. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.100, n.8, Dec, p.811-27. 2005.

Lainson, R. e J. J. Shaw. Classification and geographical distribution. In: W. Peter e R. Kellick-Kendrick (Ed.). The leishmaniasis in biology and medicine. Londres: Academic Press, v.1, 1987. Classification and geographical distribution, p.1-120

Lanzaro, G. e A. Warburg. Genetic variability in phlebotomine sandflies: possible implications for leishmaniasis epidemiology. Parasitol Today, v.4, p.151. 1995.

Laskay, T., M. Röllinghoff, W. Solbach. Natural killer cells participate in the early defense against *Leishmania major* infection in mice. European J Immunol. v. 23, p. 2237–2241. 1993.

Laurenti, M. D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. BEPA, Bol Epidemiol Paul, v.6, n.67, p. 13-23. 2009.

Laveran, A. Sur un protozoaire nouveau (*Piroplasma donovani*, Laveran et Mesnil), parasite d'une fièvre de l'Inde. Sur un protozoaire nouveau (*Piroplasma donovani*, Laveran et Mesnil), parasite d'une fièvre de l'Inde, v.137, p.957-962. 1903.

Lawyer, P.G., M. P. Ngumbi, C. O. Anjili, S. O. Odongo, Y. B. Mebrahtu, J. I. Githure, D. K. Koech, C. R. Roberts. Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). Am. J. Trop. Med. Hyg., v.43, n. 1, p. 31-43. 1990.

Leprohon, P., D. Légaré, M. Ouellette. Intracellular Localization of the ABCC Proteins of *Leishmania* and Their Role in Resistance to Antimonials. Antimicrob Agents Chemother, v. 53, n. 6, p. 2646–2649. 2009.

Levine, N. D., J. O. Corliss, *et al.* A newly revised classification of the protozoa. J Protozool, v.27, n.1, Feb, p.37-58. 1980.

Liew, F. Y., S. Millott, Y. Li, R. Leitchuk, W. L. Chan, H. Ziltener. Macrophage activation by interferon-gamma from host-protective T cells is inhibited by interleukin (IL)3 and IL4 produced by disease-promoting T cells in leishmaniasis. Eur J Immunol. v. 19, n. 7, p. 1227–1232. 1989.

Lindoso, J. A. L. e H. Goto. Leishmaniose Visceral: situação atual e perspectivas futuras. Informe Mensal sobre Agravos à Saúde Pública, v.26, Fevereiro. 2006.

Lopez-Berestein, G., G. P. Bodey, V. Fainstein, M. Keating, L. S. Frankel, B. Zelluf, L. Gentry, K. Mehta. Treatment of systemic fungal infections with liposomal amphotericin B. Archives of Internal Medicine, v. 149, p. 2533-2536. 1989.

Lukes, J., I. L. Mauricio, *et al.* Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. Proc Natl Acad Sci U S A, v.104, n.22, May 29, p.9375-80. 2007.

Madeira, M. F., C. M. A. Uchôa, C. A. Leal et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.36, p.551-555. 2003.

Maia-Elkhoury, A. N. S. et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 24, n. 12, Dec. 2008 .

Mancianti, F., M. Gramiccia, et al. Studies on canine leishmaniasis control. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.82, n.4, p.566-7. 1988.

Mancianti, F., F. Pedonese, A. Poli. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay. Vet Parasitol, v. 65, p. 1-9. 1996.

Marzochi, M. C. A. et al . Canine Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 80, n. 3, Sept. 1985 .

Marzochi, M. C. A., Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares. J Bras Med. v. 63, p. 82-104. 1992.

Marzochi, M. C., K. B. Marzochi, et al. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. Parasitol Today, v.10, n.1, Jan, p.37-40. 1994.

Mauricio, I. L., J. R. Stothard, et al. The strange case of *Leishmania chagasi*. Parasitol Today, v.16, n.5, May, p.188-9. 2000.

Medeiros I. M., E. L. T. Nascimento, S. L. Hinrichsen. Leishmanioses (visceral e tegumentar). In: Hinrichsen S. L. Doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2005. p. 398-409.

Melby, P. C., Y. Z. Yang, J. Cheng, W. Zhao. Regional differences in the cellular immune response to experimental cutaneous or visceral infection with *Leishmania donovani*. Infect. Immun. v. 66, p. 18-27. 1998.

Melby, P. C., B. Chandrasekar, W. Zhao, J. E. Coe. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. J. Immunol. v. 166, p 1912-1920. 2001.

Mello, D. A., A. Rego Junior Fde, et al. *Cerdocyon thous* (L.) (Carnivora, Canidae) naturally infected with *Leishmania donovani chagasi* (Cunha & Chagas, 1973) in Corumba (Mato Grosso do Sul State, Brazil). Mem Inst Oswaldo Cruz, v.83, n.2, Apr-Jun, p.259. 1988.

Mettler, M., F. Grimm, et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. J Clin Microbiol, v.43, n.11, Nov, p.5515-9. 2005.

Ministério Da Saúde, B. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília. 2003.

Moheballi, M., E. Fallah, S. Jamshidi, H. Hajjaran. Vaccine trial against canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. East Med Health J. v. 4, p. 234–238. 1998.

Molina, R., C. Amela, *et al.* Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.88, n.4, Jul-Aug, p.491-3. 1994.

Monjour, L. *et al.* Immunization of dogs with *Leishmania infantum*-derived vaccine. Vet parasitol, v. 28, p. 33-37. 1988.

Monteiro, E. M., J. C. Da Silva, *et al.* Visceral leishmaniasis: a study on phlebotomine sand flies and canine infection in Montes Claros, State of Minas Gerais. Rev Soc Bras Med Trop, v.38, n.2, Mar-Apr, p.147-52. 2005.

Moura, S. T. de *et al.* Diagnóstico de leishmaniose canina na área urbana do município de Cuiabá, Estado de Mato Grosso, Brasil. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., São Paulo, v. 36, n. 2, 1999.

Murray, H., J. Berman, C. Davies *et al.* Advances in leishmaniasis. Lancet, v. 366, p.1561–1577. 2005.

Murray, H. W., C. F. Nathan. Macrophage microbicidal mechanisms in vitro: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. J of Experimental Medicine. v. 189, p. 741-746. 1999.

Nascimento, M. D. S. B. Epidemiologia da leishmaniose visceral na Ilha de São Luís-Maranhão, Brasil: análise da dinâmica da transmissão e dos fatores de risco relacionados ao desenvolvimento da doença. Escola Paulista de Medicina., Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1996.

Nicolle, C. J. Sur trois cas d' infection splénique infantile à corps de Leishman observés en Tunisie. Archives du Institute Pasteur de Tunisia, v.3, p.1-26. 1908.

Nieto, C. G., I. Navarrete, *et al.* Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. Vet Parasitol, v.45, n.1-2, Dec, p.33-47. 1992.

Nogueira, F. S., M. A. Moreira, G. P. Borja-Cabrera, F. N. Santos, I. Menz, L. E. Parra, Z. Xu, H. J. Chu, C. B. Palatnik-de-Sousa, M. C. Luvizotto. Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. Vaccine, v. 23, p. 4805–4810. 2005.

Oliveira, F. S., C. Pirmez, *et al.* PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in

skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. Vet Parasitol, v.129, n.3-4, May 15, p.219-27. 2005.

Oliveira, A. C., N. S. Antonio, A. Piccinin. Controle e tratamento da leishmaniose visceral canina. Rev Científica Eletrônica de Med Vet. v. 6, n. 10. 2008.

Osman, O. F., L. Oskam, E. E. Zijlstra, N. C. Kroon, G. J. Schoone, E. T. Khalil, A. M. El-Hassan, P. A. Kager. Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. J Clin Microbiol, v. 35, n. 10, p. 2454-2457 1997.

Otranto, D., P. Paradies, *et al.* Rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of canine leishmaniasis. J Clin Microbiol, v.42, n.6, Jun, p.2769-70. 2004.

Palatinick de Souza, C.B., E. M. Gomes, E. Paraguai de Souza, M. Palatinick, K. G. Luz, R. Borojevic. *Leishmania donovani*: titration of antibodies to the fucose-mannose ligand as an aid in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.89, p. 390-393. 1995.

Palatnik-de-Sousa, C. B., H. S. Dutra, R. Borojevic. *Leishmania donovani* surface glycoconjugate GP36 is the major immunogen component of the fucose-mannose ligand (FML). Acta tropica. v. 53, n. 1, p.59-72. 1993.

Palatnik-de-Sousa, C. B. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. Vaccine v. 26, p. 1709—1724. 2008.

Pappas, M. G., R. Hajkowski, *et al.* Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA): a micro technique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. J Immunol Methods, v.64, n.1-2, Nov 11, p.205-14. 1983.

Passos, L. N. "Avaliação da reação em cadeia de polimerase (PCR) no diagnóstico da leishmaniose cutânea no Estado do Espírito Santo, Brasil". Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. 2003.

Peacock, C. S., K. Seeger, *et al.* Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. Nat Genet, v.39, n.7, Jul, p.839-47. 2007.

Pirmez, C., V. Da Silva Trajano, M. P. Oliveira-Neto, A. M. Da-Cruz, S. C. Goncalves-da-Costa, M. Catanho, W. Degraive, O. Fernandes. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. J Clin Microbiol, v. 37, p. 1819-1823. 1999

Quinnell, R. J., O. Courtenay, *et al.* The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. Parasitol, v.115 (Pt 2), Aug, p.143-56. 1997.

Raj, V. S., A. Ghosh, *et al.* Serodiagnosis of leishmaniasis with recombinant ORFF antigen. Am J Trop Med Hyg, v.61, n.3, Sep, p.482-7. 1999.

Reale, S., L. Maxia, F. Vitale, N. S. Glosriosos, S. Caracappa, G. Vesco. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. J Clin Microbio. v. 37, n. 9, p. 2931- 2935, 1999.

Reed, S. G. Diagnosis of leishmaniasis. Clin Dermatol, v.14, n.5, Sep-Oct, p.471-8. 1996.

Reithinger, R., R. J. Quinnell, *et al*. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. J Clin Microbiol, v.40, n.7, Jul, p.2352-6. 2002.

Reithinger, R., J. Dujardin, H. Louzir *et al*. Cutaneous leishmaniasis. Lancet Infect Dis, v. 7, p.581–596. 2007.

Requena, J. M., S. Iborra, J. Carrion, C. Alonso, M. Soto. Recent advances in vaccines for leishmaniasis. Expert Opin Biol Ther, v. 4, p. 1505-1517. 2004.

Rey, L. Parasitologia: Parasitos e doenças parasitárias do homem nas américas e na África. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2001. 856 p.

Ribeiro, J.M.C.; A. Vachereau, G.B. Modi, R.B. Tesh. A novel vasodilatory peptide from the salivary glands of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. v. 243, p. 212-212. Scienc. 1989.

Rodriguez-Cortes, A., A. Ojeda, L. Lopez-Fuertes *et al*. Vaccination with plasmid DNA encoding KMP2, TRYP, LACK, and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. Vaccine, v. 25, p. 7962–7971. 2007.

Rojas, R., L. Valderrama, M. Valderrama, M. X. Varona, M. Ouellette, and N. G. Saravia. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania* (*Viannia*) infection. J Infect Dis, v. 193, p. 1375–1383. 2006.

Romão, P. R. T., R. O. Dias, K.K. Cruz, F. C. S. Marques, M. C. Monteiro. Leishmaniasis: immune response and antioxidants mechanisms of evasion. 2008.

Rosario, E. Y., O. Genaro, *et al*. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.100, n.2, Apr, p.197-203. 2005.

Saha, S., M. Bhasin, *et al*. Bcipep: a database of B-cell epitopes. BMC Genomics, v.6, n.1, p.79. 2005.

Salotra, P., G. Sreenivas, *et al*. Development of a species-specific PCR assay for detection of *Leishmania donovani* in clinical samples from patients with kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis. J Clin Microbiol, v.39, n.3, Mar, p.849-54. 2001.

Sambrook, J. e D. W. Russell. Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001. 3 v. p.

Sampaio, R. N., P. D. Marsden. Treatment of the mucosal form of leishmaniasis without response to glucantime, with liposomal amphotericin B. Rev Soc Bras Med Trop. v. 30, n. 2, p. 125-128. 1997.

Sanger, F., S. Nicklen, *et al.* DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A, v.74, n.12, Dec, p.5463-7. 1977.

Saravia, N. G., L. Valderrama, M. Labrada, A. F. Holguin, C. Navas, G. Palma, K. A. Weigle. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. J Infect Dis. v. 159, p.725-735. 1989.

Saravia, N. G., L. Valderrama, *et al.* The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. J Infect Dis, v.159, n.4, Apr, p.725-35. 1989.

Sampaio, S. A. P., R. M. Castro, N. L. Dillon, J. E. C. Martins. Treatment of cutaneous leishmaniasis with amphotericin B. A report of 70 cases. Internat. J. of Dermatol. v.10, p. 179-181.1991.

Santos, G. P. L. *et al.* Prevalência da infecção canina em áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar americana, do município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro, no período entre 1992 e 1993. Rev Soc Bras Med Trop, v. 38, n. 2, p. 161-166, 2005.

Savani, E. S. M. M., B. V. Schimonsky, M. C. G. O. CAMARGO, S. R. D'ÁURIA. Vigilância de leishmaniose visceral americana em cães de área não endêmica, São Paulo. Rev Saúde Públ. v.37, n.2, p.260-262, 2003.

Schettini, D. A., A. P. Costa Val, L. F. Souza, C. Demicheli, O. G. F. Rocha, M. N. Melo, M. S. M. Michalick, F. Frézard. Distribution of Liposome-Encapsulated antimony in dogs. Braz. J.Med. Biol. Res., v. 36, p. 269, 2003.

Silva, E. S., G. J. Schoone, *et al.* Application of direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST) for sero-diagnosis of visceral leishmaniasis in endemic area of Minas Gerais, Brazil. Kinetoplastid Biol Dis, v.4, Jun 14, p.4. 2005.

Silva, J. G., G. L. Werneck, *et al.* [Natural infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania sp.* in Teresina, Piauí State, Brazil]. Cad Saude Publica, v.23, n.7, Jul, p.1715-20. 2007.

Singh, S. e R. Sivakumar. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. J Postgrad Med, v.49, n.1, Jan-Mar, p.55-60. 2003.

Sivakumar, R., P. Sharma, *et al.* Cloning, expression, and purification of a novel recombinant antigen from *Leishmania donovani*. Protein Expr Purif, v.46, n.1, Mar, p.156-65. 2006.

Slappendel, R. J. e C. E. Greene. Leishmaniasis. In: C. E. Greene (Ed.). Infectious diseases of the dog and cat. Filadélfia: W. B. Saunders, 1990. Leishmaniasis, p.769-777.

Soares Guimaraes, M. C., B. J. Celeste, E. A. de Castilho, J. R. Mineo, J. M. Paiva Diniz. ELISA in mucocutaneous leishmaniasis, kala-azar and Chagas' disease: an epimastigote *Trypanosoma cruzi* antigen able to distinguish between anti-*Trypanosoma* and anti-leishmania antibodies. Am J Trop Med Hyg, v. 30, p. 942-947.1981.

Superintendência de Controle de Endemias SUCEN. Vetores e Doenças - Leishmaniose Tegumentar Americana. Disponível em: <http://www.sucen.sp.gov.br/atuac/tegume.html>. Acesso em 01/04/2010.

Sundar, S., K. Pai, M. Sahu, V. Kumar, W. Murray. Immunochromatographic strip-test detection of anti-K39 antibody in Indian visceral leishmaniasis. Ann Trop Med Parasitol, v.96, p.19-23. 2002.

Sundar, S. Diagnosis of kala-azar--an important stride. J Assoc Physicians India, v.51, Aug, p.753-5. 2003.

Tafuri, W. L., A. J. Barbosa, *et al.* Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.38, n.2, Mar-Apr, p.81-9. 1996.

Tafuri, W. L., M. S. Michalick, *et al.* [Optical and electron microscopic study of the kidney of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.31, n.3, May-Jun, p.139-45. 1989.

Tavares, C. A., A. P. Fernandes, *et al.* Molecular diagnosis of leishmaniasis. Expert Rev Mol Diagn, v.3, n.5, Sep, p.657-67. 2003.

Troncarelli, M. Z., *et al.* Associação entre resultados sorológicos no diagnóstico da leishmaniose e da tripanossomíase canina, pela técnica de imunofluorescência indireta. Vet e Zootec. v. 15, n.1, p. 39-46. 2008.

Vexenat, A. C., J. M. Santana, *et al.* Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, v.38, p.177-185. 1996.

Yamamoto, D. S., H. Nagumo, S. Yoshida. Flying vaccinator; a transgenic mosquito delivers a *Leishmania* vaccine via blood feeding. Insect Mol Biol, v. 19, p.391-398. 2010.

Young, D. G., M. A. Duncan. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Memoirs Am Ent Inst, Gainesville, n.54, p. 881. 1994.

Werneck, G. L., T. J. C. Farias, G. C. Farias, F. O. Silva, F. C. Chaves, M. V. Gouvêa, C. H. N. Costa, F. A. Carvalho. Avaliação da efetividade das estratégias de controle da leishmaniose visceral na cidade de Teresina, Estado do Piauí, Brasil: resultados do inquérito inicial – 2004. Epidemiologia e Serviços de Saúde. v. 17, p. 87-96. 2008.

World Health Organization WHO. Leishmaniasis. Burden of disease. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>. Acesso em:01/02/2009.

CAPÍTULO 2

**Re: Formulário Patenteabilidade Preenchido**

Quarta-feira, 3 de Novembro de 2010 9:29

De: ""Fabiola M. Spiandorello - Agência Unesp de Inovação" <fabiola@reitoria.unesp.br>
Para: costapi@fcfar.unesp.br
Cc: thaferreira_bio@yahoo.com.br

Caro Prof. Paulo Inácio,

Acusamos o recebimento. Efetuaremos a busca de anterioridades e posteriormente entraremos em contato.

sAudações,

Fabiola Spiandorello
Agência Unesp de Inovação
Gerência Executiva

Fone: +55 11 3393-7901
Fax: +55 11 3393-7900
Skype: spiandorello
Rua Dr. Bento Teobaldo Ferraz, nº 271, bloco II, Barra Funda
01.140-070 São Paulo - SP

Aviso de confidencialidade:

Esta mensagem é enviada exclusivamente ao(s) destinatário(s) acima identificado(s) e pode conter informações confidenciais, protegidas por sigilo profissional. Caso tenha recebido-a indevidamente, por gentileza desconsidere-a e, se possível, avise o remetente.

Em 29/10/2010 18:45, costapi@fcfar.unesp.br escreveu:

> Prezada Fabiola;
> Estou enviando em anexo o formulário preenchido para avaliação quanto à
> patenteabilidade de nossa pesquisa com proteína recombinante de Leishmania
> infantum como potencial imunodiagnóstico e desenvolvimento de vacina
> profilática/terapêutica.
>
> Att.
>
> Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa
> Adjunto Disciplina de Imunologia Clínica - Depto. Análises Clínicas
> FCF/UNESP/CAr
>
>> Caro Prof. Paulo Inácio,
>>
>> Conforme contato telefônico, enviamos anexado o formulário para
>> avaliação de patenteabilidade da nova tecnologia. Após o preenchimento,
>> será feita pela Agência uma busca de anterioridades.
>>
>> Estamos à disposição.
>>
>> Atenciosamente,
>>

Re: Formulário Patenteabilidade Preenchido - Yahoo! Mail

Página 2 de 2

>> --

>> Fabíola Spiandorello

>> Agência Unesp de Inovação

>> Gerência Executiva

>>

>> Fone: +55 11 3393-7901

>> Fax: +55 11 3393-7900

>> Skype: spiandorello

>> Rua Dr. Bento Teobaldo Ferraz, nº 271, bloco II, Barra Funda

>> 01.140-070 São Paulo - SP

>>

>> -----

>>

>> Aviso de confidencialidade:

>>

>> Esta mensagem é enviada exclusivamente ao(s) destinatário(s) acima

>> identificado(s) e pode conter informações confidenciais, protegidas

>> por sigilo profissional. Caso tenha recebido-a indevidamente, por

>> gentileza desconsidere-a e, se possível, avise o remetente.

>>

>>