



Instituto de Química – UNESP
Araraquara

Camila Tita Nogueira

Busca de antígenos para diagnóstico da
leishmaniose visceral canina: potencial uso e
aplicação da proteína rLc36

Araraquara
2014

Camila Tita Nogueira

Busca de antígenos para diagnóstico da leishmaniose visceral canina:
potencial uso e aplicação da proteína rLc36.

Tese apresentada ao Programa de Biotecnologia
do Instituto de Química de Araraquara,
da Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do Título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia A. S. Graminha

Araraquara

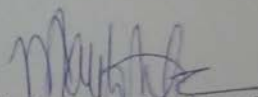
2014

CAMILA TITA NOGUEIRA

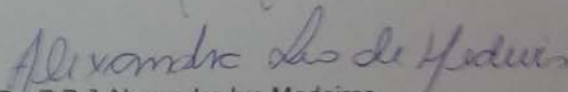
Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutora em Biotecnologia.

Araraquara, 18 de setembro de 2014

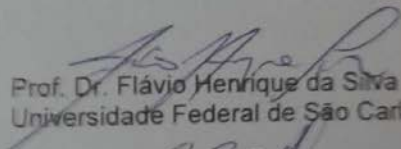
BANCA EXAMINADORA



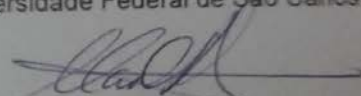
Profª Drª Márcia Apárcida Silva Graminha
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



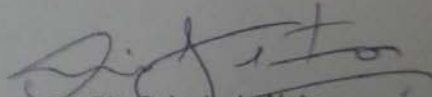
Profª Drª Alexandra Ivo Medeiros
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva
Universidade Federal de São Carlos – UFSCAr, São Carlos



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



Prof. Dr. Pio Colepicoto Neto
Instituto de Química – USP, São Paulo

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais,
José Carlos e Leila e às minhas irmãs,
Carina e Catiana, que sempre foram
exemplos de honestidade e perseverança.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à minha orientadora, professora Márcia Graminha, pelo incentivo e confiança no decorrer desses quatro anos de doutorado. Obrigada por acreditar em mim;

À Mayara L. Del Cistia, por ter sido uma pessoa fundamental no desenvolvimento desse trabalho, além de uma grande amiga e companheira nas horas difíceis;

À professora Regina Maria Barretto Cicarelli (UNESP), que gentilmente cedeu seu laboratório para que os experimentos fossem realizados; sem essa enorme ajuda este trabalho jamais teria sido concluído;

À professora Rosangela Zacarias Machado (UNESP) por gentilmente doar amostras utilizadas no trabalho e pelo auxílio intelectual;

Ao professor Hélio Langoni por gentilmente doar amostras utilizadas no trabalho;

Aos professores Henrique Ferreira (UNESP) e Flávio da Silva (UFSCAR) pelo auxílio intelectual;

Ao melhor grupo de pesquisa que alguém pode desejar (Thaís G. Passalacqua, Mayara L. Del Cistia, Letícia de Almeida, Fábio A. Esteves Torres, Isabel Martinez, Ângela Arenas Velasquez, Evelyn L. Costa); sem vocês tudo teria sido muito mais difícil e menos divertido!

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo financiamento do projeto;

Às muitas outras pessoas dos diferentes laboratórios que não tiveram seus nomes citados, mas nem por isso tiveram menor relevância na conclusão deste trabalho.

Agradeço também a todos aqueles que estiveram presentes me apoiando durante todos esses anos de trabalho duro, principalmente aos meus pais, José Carlos e Leila, minhas irmãs, Carina e Catiana, meus cunhados, Júlio e Márcio, e meus sobrinhos, Marina, Lucas e Cesinha, pois sem a presença e o apoio deles nada disso seria possível.

Agradeço às minhas queridas amigas, Eleine, Camila e Ana Carolina, que distantes ou próximas, sempre me apoiaram e transformaram esses anos em momentos inesquecíveis para a minha vida.

E agradeço, por fim, a Deus que em silêncio me deu serenidade e sabedoria para que eu pudesse caminhar por essa estrada tão importante.

*"Quando o homem aprender a respeitar até o
menor ser da criação, seja animal ou vegetal,
ninguém precisará ensiná-lo a amar seu
semelhante."*

(Albert Schweitzer)

RESUMO

A leishmaniose visceral, forma clínica mais severa das leishmanioses, pode ser fatal se não tratada. Cães infectados são reservatórios potenciais da doença, sendo um diagnóstico específico e cuidadoso requerido para a identificação dos animais infectados, com o objetivo de promover um melhor controle epidemiológico e, consequentemente, controlar a transmissão da doença para o homem. Diversos trabalhos na literatura descrevem vários testes utilizados atualmente para diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC), porém, apresentam variada especificidade e sensibilidade. Dessa forma, o desenvolvimento de um teste diagnóstico com maior sensibilidade e especificidade se torna importante para correta identificação de cães infectados. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a proteína rLc36, codificada por um gene exclusivo de *Leishmania infantum*, quanto ao potencial antigênico para desenvolvimento de um teste diagnóstico mais sensível e específico para LVC baseado no ensaio ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). Diferentes concentrações desta proteína foram testadas por ELISA usando soros de cães infectados com LV e soros de cães não infectados. A concentração de 1,0µg/mL de rLc36 foi capaz de diferenciar os soros positivos dos soros negativos e apresentou sensibilidade de 85% e especificidade de 71%, em um teste com 95% de confiança, mostrando que a proteína rLc36 é antigênica e apresenta potencial para ser aplicada no desenvolvimento de um kit diagnóstico. A proteína rLc36 foi testada em associação com a proteína A2, o qual já foi previamente avaliado como antígeno no diagnóstico sorológico da leishmaniose, e foi possível observar aumento na sensibilidade do teste (77%), mas não na especificidade (79%). Soros de outras parasitoses foram testados frente à proteína rLc36. Foi possível observar reatividade com os soros positivos para babesiose e erliquiose, e não houve reatividade com os soros positivos para toxoplasmose e leptospirose.

Palavras-chave: *Leishmania chagasi*, leishmaniose visceral canina, diagnóstico, ELISA, proteínas recombinantes.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis, the most severe clinical form of the leishmaniasis, can be fatal if untreated. Infected dogs are potential reservoirs of the disease, being a specific and careful diagnosis required for identification of the infected animals, with the aim of promoting a better epidemiological control and consequently control the transmission of the disease to humans. Several works in the literature describe various tests used for diagnosis of canine visceral leishmaniasis (CVL), however, they show varied specificity and sensitivity. In this way, the development of a diagnosis test with greater sensitivity and specificity becomes important for the correct identification of infected dogs. Thus, the development of a more sensitive and specific diagnosis test based on recombinant antigens may contribute in the correct identification of dogs truly infected and thus contribute to the more effective control of the transmission of the disease. The present work had as objective to characterize the protein rLc36, encoded by a gene unique to *Leishmania infantum*, for the antigenic potential for development of a more sensitive and specific test for CVL based on the ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Different protein concentrations were tested by ELISA using sera from dogs infected with LV and sera from non-infected dogs. The concentration of 1.0µg/mL of rLc36 protein was able to differentiate positive from negative sera and showed sensitivity of 85% and specificity of 71% on a test with 95% of confidence, showing that the protein rLc36 is antigenic and has potential for be applied in a new diagnosis test. The rLc36 protein was tested in association with the A2 protein, which was previously assessed as antigen in serological diagnosis of leishmaniasis, and it was possible to observe an increase in the sensitivity of the test (77%), but no increase was observed in the specificity (79%). Sera from other parasitic infections were tested against the rLc36 protein. It was possible to observe positive sera reactivity for babesiosis and ehrlichiosis, and there was no reactivity with positive sera for toxoplasmosis, and leptospirosis.

Keywords: *Leishmania chagasi*, canine visceral leishmaniasis, diagnosis, ELISA, recombinant proteins.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitro
μm	Micrometro
DAT	Teste de aglutinação direta
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
D.O.	Densidade óptica
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FCAV	Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal-SP
FCFAR	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-SP
IgG	Imunoglobulina da classe G
IPTG	Isopropil beta-D-1-tiogalactopiranosídeo
gDNA	Ácido desoxiribonucleico genômico
kb	Quilobase
kDa	Quilodalton
KCl	Cloreto de potássio
L	Litro
LB	Meio Luria-Bertani
LC	Leishmaniose cutânea
LDC	Leishmaniose cutâneo difusa
LIT	Infusão de fígado e triptose
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
LTCC	Leishmania Type Culture Collection
mA	Miliampere

mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanogramas
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	Open reading frame
pb	Par de bases
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Polymerase chain reaction
pDNA	Ácido desoxirribonucléico plasmidial
pH	Potencial hidrogeniônico
PM	Peso molecular
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida com SDS
TA	Temperatura ambiente
TBS	Salina tamponada com Tris
TAE	Tampão tris-acetato EDTA
TR	Tandem repeat
V/cm	Volts por centímetro
xg	Rotação
WHO	Organização Mundial de Saúde
UV	Luz ultravioleta
X-Gal	Bromo-chloro-indolyl-galactopyranoside

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Esquema do ciclo de vida da LV.....	5
Figura 2 –	Incidência da leishmaniose visceral no mundo em 2012, segundo a Organização Mundial de Saúde.....	8
Figura 3 –	Mapa do Brasil mostrando a distribuição dos casos de leishmaniose visceral no ano de 2007, segundo a OMS	8
Figura 4 –	Distribuição de municípios do Estado de São Paulo segundo a classificação epidemiológica para leishmaniose visceral americana.....	9
Figura 5 –	Mapas dos plasmídeos de clonagem pGEM T-Easy e de expressão pET28a.....	19
Figura 6 –	Fórmula de relação inserto/vetor para ligação.....	26
Figura 7 –	Predição de epítomos para células B utilizando-se o banco de dados <i>IEDB Analysis Resource</i> . Regiões de epítomos preditos para o fragmento selecionado do gene Lc36 (em amarelo). Os valores na abcissa referem-se a posição dos aminoácidos na sequência	37
Figura 8 –	Perfil eletroforético do produto de PCR em gel de agarose 1% corado por brometo de etídio. Banda de 780pb correspondente ao fragmento do gene Lc36. Amplificação	

	obtida a partir do DNA genômico de <i>L. infantum</i> com os oligonucleotídeos Lc36 <i>forward/ reverse</i> . PM: Peso molecular GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (<i>Fermentas, fornecedor Sinapse Biotecnologia LTDA</i>).....	41
Figura 9 –	Perfil eletroforético dos produtos de miniprep das colônias transformantes para verificação da clonagem dos fragmentos em vetor pGEM T-Easy. Duas colônias aleatórias de bactéria DH5α transformadas com o plasmídio recombinante pGEM_Lc36. PM: Peso molecular GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (<i>Fermentas, fornecedor Sinapse Biotecnologia LTDA</i>).....	42
Figura 10 –	Perfil eletroforético dos produtos de miniprep das colônias transformantes para verificação da clonagem do fragmento em vetor de expressão pET28a. Clones recombinantes pET28a_36. PM: corresponde ao marcador de peso molecular GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (<i>Fermentas - fornecedor Sinapse Biotecnologia LTDA</i>).....	43
Figura 11 –	Fragmento Lc36 clonado no vetor de expressão pET28a. de restrição: <i>Nco</i> I e <i>Hind</i> III com seus respectivos sítios de & = TGA = códon de parada e M = Aminoácido metionina = don de início.....	44
Figura 12 –	Análise da expressão da proteína rLc36 em <i>E. coli</i> linhagem BL21 (DE3) à temperatura de 30°C. SDS-PAGE 12%, corado	

com *Coomassie brillante blue r-250*. Gel SDS-PAGE 12% de extrato de células *E. coli* BL21 (DE3) pET28aLc_36. T0: não induzido; T4: 4 horas de indução; FT: flow through; 20 mM de imidazol; 40 mM de imidazol; 80 mM de imidazol; 200 mM de imidazol,). A seta em vermelho indica a localização de uma banda de aproximadamente 38,4kDa, correspondente à proteína rLc36 recombinante. PM: Peso molecular de massa de proteínas (Kaleidoscope Prestained Standards – Bio-Rad).....

46

Figura 13 – *Western blot* da proteína rLc36. Os gradientes de purificação da proteína rLc36 recombinante em diferentes concentrações de imidazol foram transferidos para membrana de PVDF para realização do ensaio de *Western Blot*. Proteína resultante da indução à 30°C – 250rpm – 3h. (FS) fração solúvel e (FI) fração insolúvel. A seta vermelha indica a banda correspondente à proteína rLc36 de aproximadamente 28,4kDa. PM: Peso molecular de massa de proteínas (Kaleidoscope Prestained Standards – Bio-Rad).....

47

Figura 14 – Ensaio preliminar de reatividade da proteína rLc36, utilizando-se 1,0µg/mL de antígeno/poço, diluição dos soros 1/200 e tempo de incubação de 60 minutos. **Abscissas:** concentração de soros 1/200. **Ordenadas:** absorbância das amostras em comprimento de onda 405nm. **Pontos em azul:**

três soros caninos negativos para leishmaniose visceral.

Pontos em vermelho: três soros caninos positivos para leishmaniose visceral..... 48

Figura 15 – Reatividade da proteína rLc36 frente aos soros positivos e negativos para LVC testados na diluição de 1/200 perante a concentração de 1,0µg/mL do antígeno, com 60 minutos de incubação. Os pontos vermelhos correspondem aos soros positivos enquanto os azuis aos soros negativos. A linha verde na horizontal representa o valor do *cut off* para 95,0% de confiança (Frey, Di Canzio e Zurakowski, 1998) e cujo valor corresponde a 0,185. 50

Figura 16 – Reatividade da proteína rLc36 frente aos soros positivos e negativos para LVC testados na diluição de 1/200, perante a concentração de 1,0µg/mL do antígeno, com 60 minutos de incubação. Gráfico construído com os dados da tabela 6 (em anexo). Os pontos vermelhos correspondem aos soros positivos enquanto os azuis aos soros negativos. A linha verde na horizontal representa o valor do *cut off* para 95,0% de confiança (Frey, Di Canzio e Zurakowski, 1998) e cujo valor corresponde a 0,185..... 51

Figura 17 – Reatividade da proteína rLc36 frente aos soros positivos (n=74) e negativos (n=50) para LVC testados para cálculo de

sensibilidade e especificidade na diluição de 1/200, perante a concentração de 1,0µg/mL do antígeno, com 60 minutos de incubação. Os pontos vermelhos correspondem aos soros positivos (n=74) enquanto os azuis aos soros negativos (n=50). A linha verde na horizontal representa o valor do *cut off* para 95% de confiança (Frey, Di Canzio e Zurakowski, 1998) e cujo valor corresponde a 0,181. 53

Figura 18 - Reatividade frente aos soros positivos (n=72) e negativos (n=40) para LVC, testados na diluição 1/200, perante as concentrações de 1,0µg/mL da proteína rLc36 e 2,5µg/mL da proteína A2, com 60 minutos de incubação. **Painel A:** soros positivos e negativos para LVC testados frente a proteína rLc36 na concentração 1,0µg/mL e diluição dos soros 1/200. **Painel B:** soros positivos e negativos para LVC testados frente a proteína A2 na concentração 2,5µg/mL e diluição dos soros 1/200. **Painel C:** soros positivos e negativos para LVC testados frente às proteínas rLc36 e A2 nas concentrações 1,0µg/mL e 2,5µg/mL, respectivamente, e diluição dos soros 1/200. Os pontos vermelhos correspondem aos soros positivos enquanto os azuis aos soros negativos. A linha verde na horizontal representa o valor do *cut off* para 95,0% de confiança (Frey, Di Canzio e Zurakowski, 1998) e cujo valor corresponde a 0,208 para o painel A, 0,280 para o painel B e 0,200 para o painel C..... 56

Figura 19 – Análise Blastp realizada com a sequência A2 como query contra um banco de dados de sequencias não redundantes. Os E-values (Expected Values) obtido para *Metharhizium anisopliae* e *Candida glabrata* foram, respectivamente, 2×10^{-10} e 1×10^{-5} 60

Figura 20 – Reatividade dos soros negativos para LVC e positivos para *Babesia canis* (Painel A), *Ehrlichia canis* (Painel B), *Toxoplasma gondii* (Painel C) e *Leptospira interrogans* (Painel D), testados na diluição de 1/200, perante a concentração de 10,0µg/mL da proteína rLc36, com 60 minutos de incubação. **Painel A:** soros positivos para *B. canis* e negativos para LVC testados frente a proteína rLc36 na concentração 1,0µg/mL e diluição dos soros 1/200. **Painel B:** soros positivos para *E. canis* e negativos para LVC testados frente a proteína rLc36 na concentração 1,0µg/mL e diluição dos soros 1/200. **Painel C:** soros positivos para *T. gondii* e negativos para LVC testados frente a proteína rLc36 concentração 1,0µg/mL e diluição dos soros 1/200. **Painel D:** soros positivos para *L. interrogans* e negativos para LVC testados frente a proteína rLc36 concentração 1,0µg/mL e diluição dos soros 1/200. As linhas verdes na horizontal representam os valores do *cut off* para 95,0% de confiança (Frey, Di Canzio e Zurakowski, 1998) e cujo valor corresponde a 0,191..... 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Categorias utilizadas em sistemática.....	2
Tabela 2 –	Linhagens de <i>Escherichia coli</i>	17
Tabela 3 –	Plasmídeos utilizados	19
Tabela 4 –	Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do fragmento de interesse	21
Tabela 5 –	Massa molecular da proteína selecionada	40
Tabela 6 –	Absorbância dos soros positivos e negativos utilizados no ensaio preliminar de ELISA com as variáveis de concentração de antígeno, diluição dos soros e tempo de incubação da reação	49
Tabela 7 -	Resultado inicial de sensibilidade e especificidade da proteína rLc36 em ensaio de ELISA	51
Tabela 8 -	Resultado de sensibilidade e especificidade da proteína rLc36 em ensaio de ELISA, com concentração do antígeno 1,0µg/mL, diluição dos soros 1/200 e tempo de incubação de 60 minutos	54
Tabela 9 -	Valores de sensibilidade e especificidade de diferentes antígenos para LVC	55

Tabela 10 -	Sensibilidade e especificidade das proteínas rLc36 e A2	
	testadas separadamente e em	
	associação.....	58

Apêndice B

Tabela 11 –	Absorbância dos soros positivos e negativos em diluição de 1/200 para concentração de 10µg/mL de antígeno rL36, com 60 minutos de incubação para cálculo de sensibilidade e especificidade adicionado dos dados da tabela 9 para a mesma concentração.....	81
--------------------	--	----

Tabela 12 -	Absorbância dos soros positivos (n=74) e negativos (n=50) em diluição 1/200, para concentração de 1,0µg/mL da proteína rLc36, com 60 minutos de incubação para cálculo de sensibilidade e especificidade.....	82
--------------------	---	----

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO	2
1.1.O parasito	3
1.2.Leishmanioses	5
1.1.1.Leishmaniose visceral canina (LVC)	6
1.2. Epidemiologia	7
1.3.Diagnóstico	11
2.OBJETIVOS.	16
3.MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1.Linhagem de <i>L. infantum</i>	17
3.2.Linhagens de <i>Escherichia coli</i>	17
3.3.Meios de cultura	18
3.4.Cultura <i>in vitro</i> e criopreservação de <i>L. infantum</i>	18
3.5.Plasmídeos	19
3.6.Análise de Bioinformática	20
3.7.Desenho de oligonucleotídeos iniciadores.....	20
3.8. Extração de DNA genômico.....	21
3.8.1.Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR e purificação	22
3.8.2. Purificação do produto de PCR e digestão	22
3.8.3. Análise e quantificação do fragmento de DNA	23
3.9.Clonagem em vetor pGEM T-Easy®	23
3.9.1.Preparo das células competentes pelo método de CaCl ₂	23
3.9.2.Transformação bacteriana	24

3.10.Extração do DNA plasmidial (Miniprep)	24
3.11.Subclonagem do fragmento em vetor de expressão pET28a	26
3.12.Sequenciamento dos clones recombinantes para confirmação da fase aberta de leitura	27
3.13.Expressão da proteína recombinante	27
3.14. Teste de indução da produção da proteína recombinante.....	28
3.15. Indução da expressão gênica em maior escala.....	29
3.15.1.Preparo da coluna para cromatografia por afinidade pelo níquel	30
3.15.2.Purificação da proteína recombinante.....	30
3.15.3. Quantificação da proteína recombinante.....	31
3.16. <i>Western Blot</i>	31
3.17.Ensaio imunoenzimático (ELISA) com a proteína rLc36 para detecção de anticorpos IgG ANTI-Leishmania de cães utilizando fosfatase alcalina.....	32
3.18.Cálculo de sensibilidade e especificidade.....	34
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.CONCLUSÕES	65
6.PERSPECTIVAS.....	66
REFERÊNCIAS.....	67
CAPÍTULO 2	74
APÊNDICE.....	79

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Leishmania é um parasito protozoário uniflagelado intracelular transmitido para o hospedeiro humano durante o repasto sanguíneo de flebotomídeos infectados (IVES; RNET, 2011). Neste projeto, adotou-se a classificação da família Trypanosomatidae proposta por Levine e colaboradores (1980).

Tabela 1 – Categorias utilizadas em sistemática

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

Fonte: Levine et al., 1980

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, compreende uma das sete endemias mundiais de prioridade absoluta da Organização Mundial de Saúde (OMS), encontrando-se ainda entre as seis doenças infecto-parasitárias de maior importância no Brasil e na América Latina (OMS, 2010).

A LV, que pode ser causada por três espécies do parasito: a espécie *Leishmania (Leishmania) donovani*, responsável pela doença na Índia, Paquistão,

China Oriental, Bangladesh, Nepal, Sudão e Kenia, apresenta um perfil antroponótico (TAVARES; FERNANDES; MELO, 2003); a espécie *Leishmania (Leishmania) infantum*, agente etiológico da LV na Ásia Central e sudoeste, nordeste da China, norte da África e Europa Mediterrânea; e no Novo Mundo, a espécie *Leishmania (Leishmania) chagasi* (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001) de caráter zoonótico, é um dos causadores mais comuns da LV (REIMÃO et al., 2012). Estudos enzimáticos e moleculares indicam que *L. infantum* e *L. chagasi* estão proximamente relacionados e, assim, alguns autores consideram *L. chagasi* como sinônimo de *L. infantum* (LUKES et al., 2007). Como ainda não existe um consenso a respeito deste assunto (LAINSON; RANGEL, 2005; DANTAS-TORRES, 2006), optou-se neste trabalho pela denominação *L. infantum*.

1.1. O PARASITO

As leishmanias são parasitos intracelulares obrigatórios que reproduzem-se por divisão binária dentro das células do sistema fagocítico mononuclear, em especial macrófagos de mamíferos suscetíveis. Morfologicamente, o gênero *Leishmania* apresenta duas formas durante seu ciclo de desenvolvimento: a) amastigota, forma intracelular presente nos hospedeiros vertebrados e b) promastigota, forma flagelada e móvel, que se desenvolve extracelularmente no tubo digestivo de hospedeiros invertebrados (MACLEAN et al., 2012).

Os flebotomíneos, insetos vetores conhecidos por “mosquito-palha”, “birigui”, “cangalhinha”, “asa de palha”, entre outras denominações populares, pertencem à subfamília Phlebotominae, dividida em dois gêneros principais: *Phlebotomus* e *Lutzomya*. Nas Américas, os vetores pertencem ao gênero *Lutzomya*, sendo *Lutzomya longipalpis* a espécie transmissora da LV (LANZARO; WARBURG, 1995).

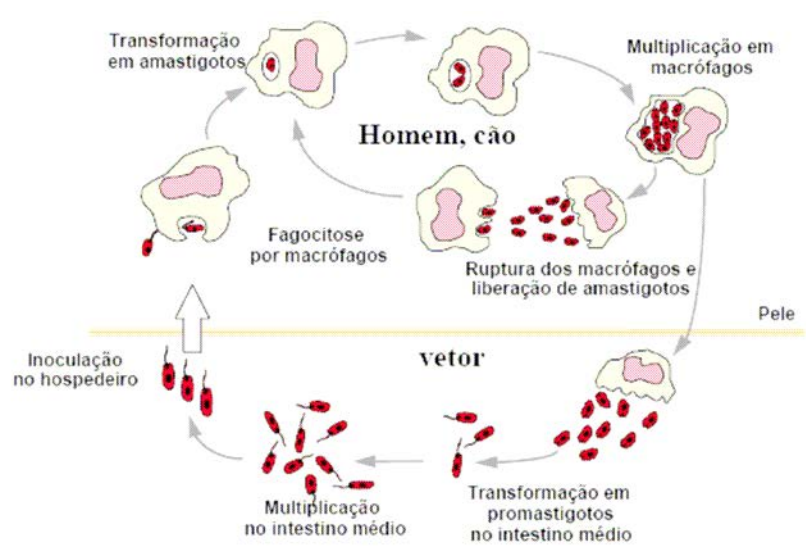
Na Europa, Ásia e África, os vetores são do gênero *Phlebotomus*. Algumas espécies de vetores são encontradas em florestas, outras são endêmicas de regiões de deserto e algumas, peridomiciliares, residindo próximas a residências urbanas ou áreas rurais (LAINSON; SHAW, 1987).

Os vertebrados que mais comumente albergam *Leishmania spp.* são roedores, marsupiais, edentados, procionídeos, ungulados, primatas e canídeos, sendo alguns considerados reservatórios naturais deste parasito (FALQUETO et al., 1991). No ambiente doméstico, o cão é um importante reservatório do agente *L. infantum*, e é responsável pelo caráter endêmico-epidêmico da doença (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001)

O ciclo de vida (ANDRADE et al., 1999) deste parasito desenvolve-se quando a fêmea de um flebotomíneo, durante o repasto sanguíneo, regurgita promastigotas infectantes (formas metacíclicas) na derme do hospedeiro mamífero. Macrófagos são atraídos ao local da picada e ocorre a fagocitose das promastigotas, mediada pelos receptores do complemento, originando o fagolisossomo, onde as promastigotas diferenciam-se em formas amastigotas. Na ausência do controle parasitário pela célula hospedeira, os parasitos sofrem sucessivas multiplicações por divisão binária simples até que o macrófago infectado sofra lise, liberando as amastigotas que serão fagocitadas por outros macrófagos. O ciclo biológico completa-se quando um inseto pica novamente um hospedeiro contaminado e ingere os macrófagos infectados que acompanham o sangue e/ou linfa intersticial. Durante o trajeto pelo trato digestivo anterior do inseto (ou ao chegarem ao tubo digestivo) os macrófagos rompem-se liberando as amastigotas. Estas formas diferenciam-se em promastigotas não infectivas (forma procíclica), que se multiplicam rapidamente durante a digestão do sangue e a seguir diferenciam-se em

formas metacíclicas livres ou aderidas na porção anterior (proventrículo e faringe) da probóscide do inseto (PETERSEN; BARR, 2009).

Figura 1 – Esquema do ciclo de vida da LV.



Fonte: Andrade et al, 1999.

1.2. LEISHMANIOSES

As leishmanioses apresentam-se sob diferentes formas clínicas: a forma cutânea, podendo ser tegumentar (LC), cutânea-difusa (LDC) ou mucocutânea (LMC) e a forma visceral (LV) ou calazar. Estas diferentes manifestações clínicas são reguladas por propriedades do parasito (infectividade, patogenicidade e virulência) e fatores próprios do hospedeiro (idade, constituição gênica, nutrição e estado imunológico) (SARAIVA et al., 1989).

1.1.1 Leishmaniose visceral canina (LVC)

No Brasil, a LVC coexiste com a doença humana possuindo, porém, maior prevalência e, via de regra, precede a ocorrência da doença humana (ALENCAR, 1959).

De modo geral, o quadro clínico se assemelha à doença humana, embora no cão, além do acometimento das vísceras, ocorra aparecimento de lesões de pele (KRAUSPENHAR et al, 2007). Os cães infectados pela *L. infantum* podem ser classificados, segundo Mancianti e colaboradores (1988), em três formas clínicas: assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos (MANCIANTI et al., 1988). 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, onicogrifose, emagrecimento, ceratoconjuntivite, adenopatia linfóide, opacificação das córneas e opacificação do pêlo (MANCIANTI et al., 1988).

A hipertrofia e a hiperplasia do sistema fagocitário mononuclear, que levam à hepatoesplenomegalia, linfodenopatia e adenopatia generalizada, são bastante frequentes (SLAPPENDEL; GREENE, 1990; CIARAMELLA et al., 1997). Apatia, diarreia, hemorragia intestinal, edema e vômitos são alguns sintomas que podem estar presentes. No entanto, os sinais mais evidentes estão relacionados às alterações cutâneas.

1.2. EPIDEMIOLOGIA

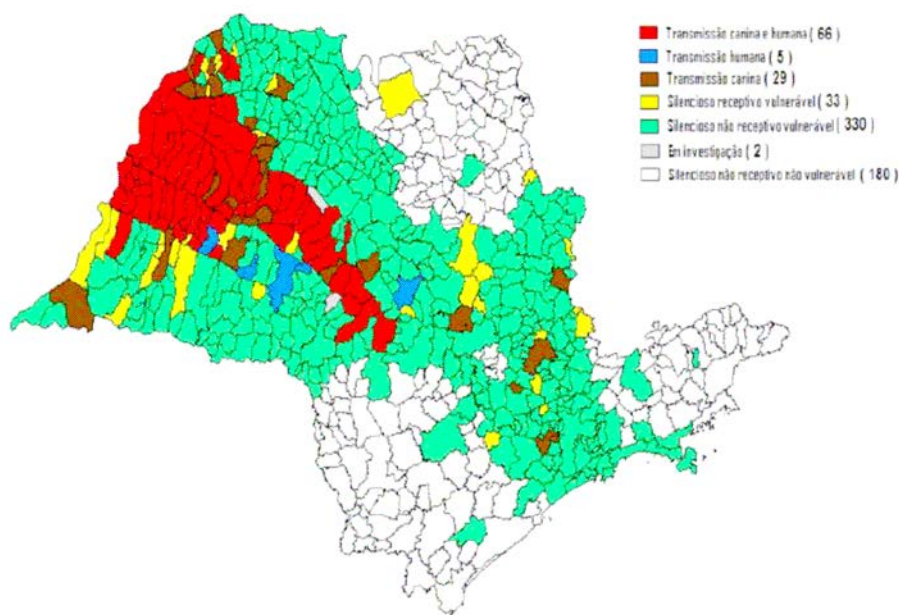
Estima-se que, anualmente, haja uma prevalência de 2 milhões de casos de leishmanioses no mundo e que 350 milhões de pessoas em 90 países estão em área de risco (LUKES et al., 2007).

A LV é a forma clínica mais grave, podendo ser fatal se não tratada; a incidência anual é de 500.000 casos em todo o mundo, com 59.000 mortes (SOUSA-GOMES et al., 2011). Nas áreas endêmicas, aproximadamente 20% das pessoas infectadas pela *L. infantum* desenvolvem a doença clássica. A maioria dos infectados desenvolvem a doença subclínica que pode permanecer completamente assintomática ou assumir forma oligossintomática (BADARÓ, 1988; COSTA; VIEIRA, 2001).

No Brasil, atualmente 23 estados apresentam casos de LV, principalmente os estados da Região Nordeste, com expansão nos últimos anos para as regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste. 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 (<http://www.who.int/leishmaniasis/resources/BRAZIL.pdf>, acesso em 20/05/2013). Segundo o Ministério da Saúde (http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=22140, acesso em 20/07/2013) a média anual de novos casos no Brasil é de 3500.

A LVC espalhou-se pelo Brasil em surtos reportados em cidades metropolitanas como: Belo Horizonte - MG (Genaro, Mayrink et al., 1988), Teresina - PI, São Luiz - MA, Fortaleza - CE, Rio de Janeiro - RJ (MARZOCHI et al., 1994) e Salvador - BA (ASHFORD et al., 1998).

Figura 4 – Distribuição de municípios do Estado de São Paulo segundo a classificação epidemiológica para leishmaniose visceral americana.



Fonte: BEPA96. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/sucen/programas/leishmanioses-tegumentar-e-americana/bepa9611.pdf>. Acesso em: 20/07/2013.

Embora ainda mantenha algumas características rurais, a LV se apresenta em processo de urbanização nos últimos 20 anos (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; GOTO, 2006).

Esse fenômeno possivelmente se justifica através dos impactos ambientais devido a 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 parasito ao novo nicho ecológico (MONTEIRO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2005).

O percentual de cães assintomáticos em uma área endêmica tem grande importância na saúde pública, pois, mesmo assintomáticos, esses animais são fonte de infecção para os flebotomíneos e assim apresentam papel ativo na cadeia de transmissão da doença (MOLINA et al., 1994).

Programas de controle da LV no Brasil têm como base o tratamento das pessoas infectadas, o 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 (COSTA; VIEIRA, 2001) e o controle dos reservatórios urbanos, com a identificação e eliminação em massa de cães soropositivos (BRAGA et al., 1998).

Cães infectados são eutanasiados, uma vez que ainda não há tratamento comprovado para obter-se uma cura parasitológica permanente dos cães, mesmo quando se utilizam medicamentos para farmacoterapia em humanos, os antimoniais pentavalentes, tais como o antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime). Este medicamento, utilizado na terapêutica humana, foi testado em cães por diversos autores, com diferentes esquemas terapêuticos e, no entanto, resultaram em fracasso e, muitas vezes, exacerbação da doença. Apesar da ineficácia comprovada, alguns médicos veterinários insistem em realizar tentativas de tratamento em animais infectados, gerando um sério problema, pois há possibilidade

de indução de resistência do parasito, fato já observado na Índia (COURTENAY et al., 2002).

Modelos matemáticos sugerem que programas de eliminação de cães soropositivos falham por causa da alta incidência de infecção canina, da insensibilidade dos testes diagnósticos em detectar cães infectados e da demora entre o diagnóstico e a remoção realizada pelos serviços de saúde pública (COURTENAY et al., 2002).

1.3. DIAGNÓSTICO

Atualmente, os métodos utilizados para o diagnóstico das leishmanioses baseiam-se em aspectos clínicos e diagnóstico parasitológico (demonstração do parasito), sorológico e molecular. É importante considerar o diagnóstico precoce da LV como uma forma de evitar danos mais severos ou até mesmo a morte do paciente (VAISH et al., 2012).

O diagnóstico clínico da LVC é difícil de ser realizado devido à inespecificidade de sintomas, que pode ser confundido com outras doenças, tais como brucelose, babesiose, toxoplasmose, entre outras (FEITOSA, 2006); além de ser perceptível apenas nos casos avançados ou em situações epidêmicas (PATTABHI et al, 2010). Os testes sorológicos devem ser interpretados com cautela, uma vez que não são 100% sensíveis e específicos, podendo apresentar reações cruzadas com outras parasitoses (VAISH et al., 2012).

O diagnóstico de rotina e de certeza baseia-se em métodos parasitológicos, os quais detectam o estágio intracelular do parasito (forma amastigota) por microscopia a partir de tecido de biópsia ou punção aspirativa do baço, fígado, medula óssea ou linfonodos; a demonstração do parasito em cultura, também pode

ser um método auxiliar no diagnóstico. No entanto, estes procedimentos invasivos requerem microscopista experiente e são pouco sensíveis, pois não fornecem diagnóstico positivo em todos os casos, já que a distribuição dos parasitos nos tecidos afetados não é homogênea (SINGH; SIVAKUMAR, 2003; VAISH et al., 2012).

Técnicas baseadas em análise de DNA estão sendo cada vez mais utilizadas no diagnóstico e caracterização de espécies de *Leishmania*, apresentando um alto nível de acurácia (SALOTRA et al., 2001; CORTES et al., 2004). No entanto, técnicas moleculares ainda dependem de padronização e sua execução tem sido dificultada nos estudos epidemiológicos. Neste sentido, o diagnóstico sorológico permanece como um dos parâmetros laboratoriais mais relevantes em nosso país, embora ainda apresente limitações 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 blot* (GREVELINK; LERNER, 1996; (DA-CRUZ; AZEREDO-COUTINHO, 2001; VAISH et al., 2012).

No Brasil, os testes mais utilizados no diagnóstico da LV humana e canina são a RIFI e ELISA, sendo considerados, sobretudo este último, testes de escolha para inquéritos epidemiológicos. A RIFI exige para a sua execução pessoal treinado e os resultados apresentados são subjetivos; além disso é uma reação dispendiosa e não adaptada para estudos epidemiológicos em larga escala, pois necessita de microscópio de fluorescência, consome muito tempo. O DAT é mais adaptável às condições de campo, porém necessita de refrigeração.

Os testes baseados no ELISA, os quais geralmente utilizam lisados dos parasitos como antígenos, são quantitativos, versáteis e adaptáveis; no entanto,

apresentam muitos problemas relacionados a reações cruzadas, gerando muitos resultados falso-positivos. Testes ELISA baseados em antígenos recombinantes, na tentativa de minimizar estas reações cruzadas, têm sido adaptados (REED, 1996; JENSEN et al., 1999; RAJ et al., 1999; BHATIA et al., 1999; BADARO et al., 1996; VAISH et al., 2012).

Apesar de algumas possibilidades diagnósticas, ainda que não sendo altamente específicas e sensíveis, no Brasil realiza-se o diagnóstico em cães pelo exame sorológico de reação de imunofluorescência indireta (RIFI), com o kit Biomanguinhos, sendo consideradas positivas as amostras com o título igual ou superior a 1:40. A técnica de RIFI é a prova adotada como padrão ouro pelo Ministério da Saúde, portaria nº 1943 (Doenças de Notificação obrigatória em todo território Nacional). De acordo com o manual do Ministério da Saúde “IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA Bio-Manguinhos”, o desempenho do teste oscila em torno de 90% para sensibilidade e 80% para especificidade, embora essa informação seja contestada no trabalho desenvolvido por Lira e colaboradores (2006), que mostra que o teste só atinge tais porcentagens de sensibilidade e especificidade quando usado em combinação com o teste de ELISA (LIRA et al., 2006).

O diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina, pelos testes atualmente disponíveis, apresenta problemas em relação à sensibilidade e especificidade, pois os resultados obtidos mostram-se variáveis, o que compromete o controle da doença em cães e, conseqüentemente, favorece a transmissão desta parasitose ao homem. Sendo assim, torna-se necessária a busca de novos antígenos purificados que possam ser utilizados como ferramenta alternativa para

detecção de anticorpos específicos contra o parasito, principalmente na população canina infectada assintomática.

A produção de proteínas recombinantes constitui uma alternativa relevante e efetiva para a preparação de grandes quantidades de antígenos puros para o uso em testes sorológicos. Essa produção tornou-se uma alternativa também para o diagnóstico da LVC. Diferentes genes de *Leishmania* spp. estão sendo estudados, não apenas para melhor compreensão da biologia do parasito, mas também para obtenção de proteínas que possam ser empregadas em vacinas e em diagnósticos mais sensíveis e específicos para a doença (CARVALHO et al., 2002; COELHO et al., 2003). Um exemplo refere-se às proteínas da família A2, expressas apenas nas formas amastigotas da espécie *L. donovani*, como descrito por Charest e Matlashewski, (1994), foi avaliada em testes sorológicos com sensibilidade e especificidade variáveis (PORROZZI et al., 2007).

Vários antígenos foram identificados e testados sistematicamente: rGBP (JENSEN et al., 1999), rORFF (RAJ et al., 1999), rK9/rK26 (BHATIA et al., 1999), rK39 (BADARO et al., 1996) e rK28 (VAISH et al., 2012). Destes, o antígeno rK39 apresenta-se como o mais sensível no diagnóstico da LV humana. Entretanto, testes rápidos utilizando esta proteína recombinante como antígeno mostraram-se mais adequados para o diagnóstico de casos de LVC sintomáticos, apresentando pouca sensibilidade em cães assintomáticos (DA COSTA et al., 2003; OTRANTO et al., 2004; METTLER et al., 2005). De acordo com Porrozzi e colaboradores (2007), enquanto testes sorológicos empregando a proteína recombinante rK39 são mais eficientes na detecção de anticorpos em animais sintomáticos, as proteínas recombinantes rK26 e A2 parecem ser eficientes no diagnóstico sorológico tanto em cães sintomáticos quanto em cães assintomáticos (PORROZZI et al., 2007).

Desta forma, a pesquisa de novos componentes antigênicos purificados que possam ser utilizados para obtenção de um diagnóstico alternativo, pode assegurar maior sensibilidade e especificidade aos testes, essencial para a correta identificação dos reservatórios e, conseqüentemente, o controle da transmissão da doença para humanos.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar uma proteína de *L. infantum*, rLc36, quanto ao potencial antigênico, para posterior validação e aplicação da mesma em teste diagnóstico para LVC.

Os objetivos específicos são:

- Análise *in silico* do gene Lc36 para determinação do potencial antigênico do mesmo;
- Amplificação de um fragmento selecionado a partir do gene Lc36;
- Clonagem do produto de amplificação do gene Lc36 no vetor pGEM T-Easy subclonagem no vetor de expressão pET28a;
- Expressão protéica em sistema heterólogo e purificação da proteína por cromatografia de afinidade;
- Preparação do teste imunoenzimático indireto com a proteína purificada;
- Teste de sensibilidade e especificidade com soros de referência de cães infectados e não-infectados com LV e outras parasitoses.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. LINHAGEM DE *L. infantum*

Foram utilizadas formas promastigotas de *L. infantum* cepa MHOM/BR/1974/PP75, cedida pelo Serviço de doação de amostras, Leishmania Type Culture Collection - LTCC - WDCM 731, Coleção de leishmanias do Instituto Oswaldo Cruz. A cepa é mantida no Laboratório de Parasitologia da FCFAr-UNESP (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP).

3.2. LINHAGENS DE *Escherichia coli*

As linhagens de *E. coli* utilizadas para clonagem e expressão estão descritas na tabela 2, que segue abaixo:

Tabela 2 – Linhagens de *E. coli*

Linhagem	Genótipos
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80d/lacZ ^Υ M15 ^Υ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, hsdR17(<i>r_K⁻ m_K⁺</i>), λ ⁻
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) λ(DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])
<i>E. coli</i> Rosetta	F ⁻ ompT hsdS _B (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) gal dcm λ(DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>]) pLysSRARE (Cam ^R)
<i>E. coli</i> BL21 Codon Plus RP	F-ompThsdS (<i>r_B-m_B-</i>) dcm+TetrgalendAHte[<i>argUproLCam_r</i>]

Fonte: tabela desenhada pelo autor com base nos dados do sítio: *E. coli* genotypes- Open Wet Ware.

Disponível em: http://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes. Acesso em: 28/08/2014.

3.3. MEIOS DE CULTURA

Foram utilizados os seguintes meios de cultura durante os experimentos:

LIT (Liver Infusion Tryptose) – Liver Infusion Broth (BD 226920) – 9,0 g, triptose (BD 211713) – 5,0 g, NaCl (85,55 mM) - 1,0 g, Na₂HPO₄ (7,04 mM) – 8,0 g, KCl (107,3 mM) - 4,0 g, glicose (22,2 mM) – 1,0 g, soro fetal bovino inativado (SFB) – 100,0 mL, hemina – 10,0 mg (0,15 mM), água milli-Q q.s.p - 1L. pH ajustado para 7,2 e 5,4 (para formas amastigotas axênicas) e esterilizado por filtração.

LB (Luria Bertani) – LB Broth (Sigma-Aldrich, Inc. 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA 314-771-5765 - Referência do produto L3022), dissolvido em água com concentração de 2% (20g para 1L) e autoclave 121°C por 15 minutos; quando necessário meio sólido com adição de 2% de ágar nº 3 do fornecedor Oxoid LTD. Descrição do meio: Triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L e NaCl 5g/L.

3.4. CULTURA *IN VITRO* E CRIOPRESERVAÇÃO DE *L. infantum*

Formas promastigotas de *L. infantum* estão mantidas a -80°C; para isso 8x10⁶ promastigotas em fase logarítmica de crescimento (por volta do quarto dia de incubação) são centrifugados por 5 minutos a 720xg; o sobrenadante desprezado e o sedimento ressuspenso em 10mL de meio LIT, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e 10% de dimetil sulfoxido (DMSO). Transfere-se 2mL desta suspensão para tubos criogênicos, os quais são estocados a -80°C .

3.6. ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

Para análise de bioinformática, as sequências nucleotídica e protéica *L. infantum*-específicas do gene Lc36 foram obtidas a partir do banco de dados de domínio público GeneDB (disponível no sítio <http://www.genedb.org/genedb/linfantum/>). As sequências foram analisadas quanto a:

Busca de similaridade das sequências de interesse através do programa —BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) contra banco de dados parasito específicos (*L. major*, *L. braziliensis* e *T. cruzi*) no GeneDB (<http://www.genedb.org>) ou TrytripDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) (ASLETT et al, 2010).

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

Presença de epítomos reconhecidos pelos linfócitos B utilizando-se o banco de dados IEDB Analysis Resource (http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input) (SAHA et al., 2005).

3.7. DESENHO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

Os oligonucleotídeos utilizados para amplificação do fragmento foram desenhados com o auxílio do programa *Gene Runner* (versão 3.01) para avaliar eventual formação de estruturas secundárias (*hairpins*, *loops internos* e *duplexes*). Os oligonucleotídeos direto (contendo o sítio de restrição *NcoI*) e reverso (contendo o sítio de restrição *HindIII*) foram desenhados de modo a garantir manutenção da

fase aberta de leitura da ORF (*open reading frame*) para posterior clonagem no vetor de expressão pET28a (Tabela 4).

Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do fragmento de interesse.

Oligonucleotídeos	Sequência (5' - 3')	Sítio de restrição
Lc36 Foward	AAA <u>CCA TGG</u> GGC GAA TCG ACT CCT CTT GTG	<i>NcoI</i>
Lc36 Reverse	TTT <u>AAG CTT</u> GTC CAC CTG CTC CTC GGC CG	<i>HindIII</i>
T7 Promoter	CCG CTG AGC AAT AAC TAG CA	-
T7 Terminator	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	-

Fonte: Autor

3.8. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

Formas promastigotas de *L. infantum* de uma cultura (1mL) em fase logarítmica de crescimento foram sedimentadas por centrifugação a 3000xg, por 1 minuto a temperatura ambiente (TA). As células foram lavadas com 800µL de “*Tryps wash buffer*” (NaCl 100mM; MgCl₂ 3mM; Tris-HCl 20mM pH 7,5) seguida de nova centrifugação a 3000xg/1 minuto/TA. Em seguida, o pellet foi ressuspenso em 250µL de TELT buffer (50mM Tris-HCl pH 8,0; 62,5mM EDTA; 2,5M LiCl; 4% Triton X-100) e o DNA extraído com igual volume de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), seguida de uma centrifugação a 16000xg / 2 minutos / TA. Após a centrifugação, a fase superior (~200µL) foi transferida para outro microtubo, seguido de nova extração com igual volume de clorofórmio. A fase superior foi transferida novamente para outro microtubo e adicionados 2,5x volume de etanol 100% e 1/10 de volume de acetato de sódio 3M pH 7,0. A mistura foi centrifugada a 16000xg / 5 minutos / TA, descartando-se o sobrenadante; o pellet foi lavado com 500µL de etanol 70%,

centrifugando-se a 16000xg / 10 minutos / TA para descartar o sobrenadante. O pellet foi deixado a TA para secar. Em seguida este foi ressuspenso em 30µL de água milli-Q estéril. Após a extração, 1/10 do DNA de formas promastigotas de *L. infantum* foi analisado através de gel de agarose 1% com 1µL de corante Bromofenol Blue (6X Loading Dye Solutin (Fermentas, fornecedor Sinapse Biotecnologia LTDA) para confirmar a qualidade do DNA extraído.

3.8.1. Eletroforese em gel de agarose 1%

Eletroforese do DNA foi realizada em gel 1% agarose contendo 0,004% de brometo de etídio (0,5g/mL) (Gibco) em tampão TAE 1X (Tris-Acetato 40mM; EDTA 2mM, pH 8,5) sob tensão de 5V/cm (Fonte BioRad). Após a migração, o gel de agarose foi visualizado em transluminador de luz ultravioleta (UV) e capturador de imagens (AlphaMager EP – software AlphaMager-AlphaView).

3.8.2. Purificação do produto de PCR e digestão

O produto de PCR ou digestão foi separado em gel de agarose 1%, visualizado por coloração por brometo de etídio (0,5g/mL) e iluminação ultravioleta (Fisher Scientific). O fragmento de interesse foi excisado do gel e purificado com o kit Purification Kit (GE Healthcare, UK Limited Little Chalfont), de acordo com as especificações do fabricante.

3.8.3. Análise e quantificação do fragmento de DNA

O fragmento de DNA foi quantificado pelo espectrofotômetro NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific) e armazenado em freezer a -20°C até o momento de uso.

3.9. CLONAGEM EM VETOR pGEM T-Easy

O produto de PCR purificado foi clonado diretamente no vetor pGEM T-Easy de acordo com as recomendações do fabricante (Promega - Madison, WI - USA). Esse vetor possui extremidade 3'dT, que facilita a clonagem de produtos de PCR (presença de extremidade 3'dA, gerada pela DNA polimerase utilizada).

3.9.1. Preparo das células competentes pelo método de CaCl_2

Para realizar preparo de células bacterianas competentes, utilizou-se tratamento com CaCl_2 descrito por Sambrook e Russell, 2001. Para tanto, foi preparado um pré-inóculo em 5mL de meio LB, sob agitação constante de 250rpm a 37°C por 12-16 horas. No dia seguinte, 2ml do pré-inóculo foram transferidos para um erlenmeyer com 100mL de meio LB e deixado sob agitação de 250rpm a 37°C até atingir a densidade óptica (D.O.) que corresponde a uma absorbância de 0,6 em comprimento de onda de 600nm.

Atingida DO adequada, a cultura foi deixada por 15 minutos em banho de gelo, transferindo-se em seguida o meio para dois tubos cônicos estéreis de 50mL que foram centrifugados a 5000xg / 5 minutos / 4°C. O meio foi desprezado e as células ressuspensas em 50mL de CaCl_2 0,1M gelado e as células foram incubadas novamente em gelo por 10 minutos e, em seguida, centrifugadas a 5000xg / 5 minutos / 4°C; o sobrenadante foi novamente desprezado e as células ressuspensas em 25mL de CaCl_2 0,1M gelado e incubadas em gelo por mais 2 horas. Após esse intervalo, a suspensão de células foi centrifugada a 5000xg / 5 minutos / 4°C e as células ressuspensas em 20mL de CaCl_2 0,1M gelado. Realizou-se mais uma centrifugação a 5000xg / 5 minutos / 4°C e ressuspendeu-se o pellet em 1mL de CaCl_2 0,1M acrescido de 10% de glicerol gelado e estéril para estoque das células a

-80°C. Todas as soluções de CaCl_2 utilizadas foram esterilizadas por filtração com filtro de seringa de 0,22 μm .

3.9.2. Transformação bacteriana

A transformação das bactérias competentes *E. coli* DH5 α foi realizada transferindo-se 200 μL de células competentes e 10 μL das reações de ligação para tubos de microcentrífuga de 1,5mL. As suspensões foram incubadas em gelo por 30 minutos, em seguida submetidas a choque térmico de 42°C por 90 segundos, seguido de incubação em gelo por 2 minutos. Ao final da incubação adicionou-se 800 μL de meio LB e seguiu-se incubação a 37°C por 1 hora.

Logo após, 100 μL de cada tubo foram plaqueados por esgotamento em placas de LB ágar com ampicilina 100 $\mu\text{g/mL}$. Os 700 μL restantes foram centrifugados e os pellets ressuspensos em 100 μL de meio LB e plaqueados em LB ágar com ampicilina na mesma concentração, caracterizando placas concentradas. As placas foram então incubadas a 37°C por 14-16 horas.

3.10. EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL (MINIPREP)

Para confirmar a presença de clones recombinantes, foram preparados diferentes pré-inóculos de bactérias transformantes em meio LB suplementado com 100 $\mu\text{g/mL}$ ampicilina permanecendo sob agitação constante de 250rpm a 37°C por 14-16 horas. Centrifugou-se 1,5mL de cada pré-inóculo a 12000xg / 30 segundos e desprezou-se o sobrenadante. Sobre o pellet adicionou-se 100 μL da solução I (6mL de glicose 1M; 2,5mL de Tris-HCl 1M pH 8,0; 2mL de EDTA 0,5M pH 8,0 e água milli-Q q.s.p. 100mL), vortexou-se para desprender o pellet, adicionou-se 200 μL da solução II (1mL de NaOH 2N, 1mL de SDS 10% e 8mL de água milli-Q), a qual foi

preparada no momento do uso, e misturou-se cuidadosamente por inversão. Adicionou-se 150µL da solução III (60mL de acetato de sódio 3M; 11,5mL de ácido acético glacial; 28,5mL de água milli-Q) misturando-se por inversão e incubou-se no gelo por 5 minutos. Centrifugou-se a 12000xg / 10 minutos / TA, adicionou-se 400µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), vortexou-se e centrifugou-se a 12000xg / 5 minutos / TA. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo de 1,5mL e o DNA plasmidial foi precipitado com 2,5x de etanol absoluto gelado, seguido de incubação em gelo por 30 minutos. Logo após centrifugou-se a 12000xg / 5 minutos / TA e o sobrenadante foi descartado por inversão. Adicionou-se 1mL de etanol 70%, centrifugou-se a 12000xg / 5 minutos / TA, descartou-se o sobrenadante por inversão, repetindo-se o procedimento de lavagem; finalmente o pellet foi deixado a TA para que secasse e logo após dissolvido em 25µL de TE adicionados de 0,5µL de RNase A 10mg/mL para concentração final 0,2mg/mL e incubou-se a 37°C por 30 minutos.

Concluída a miniprep, realizou-se digestão com as enzimas de restrição adequadas (*Nco*I e *Hind*III - Fermentas, fornecedor Sinapse Biotecnologia LTDA) para confirmação dos clones recombinantes obtidos. Para tanto, foram utilizados 2µL de DNA plasmidial, 1µL de tampão R (Fermentas, fornecedor Sinapse Biotecnologia LTDA), 1U de cada uma das enzimas de restrição e água milli-Q estéril q.s.p. 10 µL. A reação foi incubada a 37°C por 1 hora e meia. Em seguida foi feita uma eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação dos clones recombinantes e recuperação dos mesmos, como descrito no item 3.8.2.

3.11. SUBCLONAGEM DOS FRAGMENTOS EM VETOR DE EXPRESSÃO

pET28a

O vetor de expressão pET28a foi linearizado com as enzimas de restrição *Nco*I e *Hind*III para ligação do fragmento extraído do vetor pGEM T-Easy. Para chegar a uma proporção correta de fragmento e vetor, utilizou-se a fórmula do Sambrook e Russell, 2001 (Figura 6). Foi utilizado o kit de ligação (Thermo Scientific).

Figura 6 – Fórmula de relação inserto/vetor para ligação.

$$\text{Quantidade de inserto} = \frac{\text{Quantidade de vetor (ng)} \cdot \text{Tamanho de inserto (Kb)}}{\text{Tamanho de vetor (Kb)}} \cdot \frac{3}{1}$$

Fonte: SAMBROOK; RUSSELL, 2001.

Após ligação do fragmento através dos sítios de restrição *Nco*I / *Hind*III ao vetor pET28a e transformação bacteriana em *E. coli* linhagem DH5α, foram selecionadas colônias canamicina resistentes para preparo de pré-inóculos e posterior extração de DNA plasmidial (miniprep).

Realizada extração do DNA plasmidial, foi feita uma digestão dos produtos e uma eletroforese em gel de agarose 1% a fim de identificar as colônias recombinantes. Os clones selecionados foram submetidos à extração de DNA plasmidial (miniprep) conforme protocolo de Sambrook e Russell, 2001 e também descrito no item 3.10.

Os clones selecionados foram congelados em 1,5mL de cultura acrescido de 0,5mL de glicerol 60% estéril a -80°C até que se prosseguissem com os experimentos.

3.12. SEQUENCIAMENTO DOS CLONES RECOMBINANTES PARA CONFIRMAÇÃO DA FASE ABERTA DE LEITURA

Os clones recombinantes obtidos através de miniprep foram sequenciados para avaliar a fase aberta de leitura das construções. Para isso eles foram quantificados em espectrofotômetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific) e a partir das quantidades de DNA obtidas foram calculadas as quantidades necessárias para cada amostra. Os sequenciamentos dos clones foram realizados pela empresa MacroGen Inc. (Coreia do Sul), no equipamento 3730XL (Applied Biosystems). As análises dos resultados obtidos foram realizadas com programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) e com o programa SeqScape v.2.7 (Applied Biosystems).

3.13. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Foram preparados pré-inóculo sem meio LB das colônias resultantes da transformação bacteriana em *E. coli* linhagem BL21 (DE3) com o plasmídeo pET28a recombinante selecionado aleatoriamente em meio LB ágar sólido contendo canamicina (25 g/mL). Estas colônias foram inoculadas em meio LB contendo canamicina (25 g/mL) e crescidas 14-16 horas a 37°C, sob agitação constante de 250rpm. Além da linhagem BL21 (DE3), também foram testadas as linhagens Rosetta e CodonPlus quanto ao potencial de expressão.

3.14. TESTE DE INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

As culturas foram diluídas na proporção 1:50 (1mL de pré-inóculo crescido durante 14-16 horas foi transferido para 50mL de meio LB contendo canamicina a

25µg/mL) e novamente crescidas no agitador orbital a 250rpm a 37°C, até atingir a D.O. de 0,500 a 600nm. Nesta D.O. foi coletado 1mL de cada cultura não induzida (controle negativo), sendo este considerado o ponto zero da indução e centrifugado por 10 minutos a 12000xg; o sobrenadante foi descartado por inversão, o pellet foi seco, pesado e a amostra congelada a -20°C. Depois de retirar as alíquotas correspondentes ao ponto zero, foi adicionado ao restante das culturas uma concentração de 0,5mM IPTG (Invitrogen) para indução da expressão. As culturas foram induzidas por 4 horas a 30°C a 250rpm, coletando-se alíquotas de 1mL em intervalos de 1, 2, 3 e 4 horas, e o protocolo de centrifugação descrito acima foi aplicado a cada das alíquotas. Os pellets correspondentes aos tempos 0, 1, 2, 3 e 4 horas foram congelados a -20°C até o momento da análise da indução em gel SDS-PAGE 12%. Aos *pellets* bacterianos congelados foi adicionado tampão de amostra 2x (Tris-HCl 100mM pH 6,8, SDS 4%, glicerol 20% azul de bromofenol 0,2%, β-mercaptoethanol 200mM) na concentração 3:1, fervidos durante 10 minutos e aplicado sem gel SDS-PAGE 12% para a detecção da expressão protéica. O gel de poliacrilamida 12% (pH 8,8) é confeccionado segundo o método descrito por Laemmli *et al.*, 1970, onde é usado o gel de resolução contendo bis-acrilamida 0,8: 30 (m/v), em Tris-HCl 1,5M (pH 8,8) e SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) 10%, e gel de empacotamento contendo bis-acrilamida 0,8: 30 (m/v), em Tris-HCl 1M (pH 6,8) e SDS 10%. Os géis foram polimerizados em placas de vidro acopladas a sistemas verticais (Bio-Rad). Um volume de 10µL da preparação das amostras, além do padrão de peso molecular de proteínas (Kaleidoscope Prestained Standards – Bio-Rad) foram aplicados no gel. A eletroforese foi realizada em cuba de eletroforese Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad) aplicando-se uma voltagem de 100V durante aproximadamente 2 horas. O tampão dos eletrodos é constituído por uma solução

de Tris 0,125M, glicina 0,96M, SDS 0,1% pH 8,3. Após a corrida eletroforética, os géis foram imersos em solução de *Coomassie brillante blue r-250* 0,25% em metanol 45% e ácido acético 10%, sob leve agitação por 30 minutos a 1 hora para coloração das proteínas, e descorados em solução de ácido acético 7% para a revelação das bandas por aproximadamente 2 horas.

3.15. INDUÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM MAIOR ESCALA

Após adequação volumétrica para aumento da escala da indução, o mesmo procedimento padronizado para teste de indução da produção da proteína rLc36 foi utilizado. Assim, de uma placa de bactérias transformadas com os plasmídeos recombinantes foram transferidas três colônias escolhidas aleatoriamente para 3mL de meio LB líquido acrescido de canamicina a 25µg/mL. Os pré-inóculos foram incubados a 37°C / 200rpm por 10 horas. Então 100µl dos pré-inóculos foram transferidos para 20mL de meio LB líquido acrescido de canamicina a 25µg/mL e as culturas foram incubadas a 30°C / 180rpm por 12-16 horas. Dessas culturas foram transferidos 10mL para 500mL de meio LB líquido acrescido de canamicina a 25µg/mL e essas foram então incubadas a 37°C / 250rpm até atingir DO de 0,5 a 0,600nm. Atingida a DO, repetiu-se o procedimento para indução em pequena escala, porém foram coletados apenas os tempos 0, 2 e 4 de indução, a concentração de IPTG utilizada foi de 0,5mM e o processo foi realizado a 30°C. Terminada a indução, as culturas foram centrifugadas a 6000g por 15 minutos, os pellets foram lavados com tampão de lise (150mM de NaCl, 30mM Tris pH 8,0, 10% de glicerol) e congelados a - 80°C até o momento do processamento.

3.15.1. Preparo da coluna para cromatografia por afinidade pelo níquel

O vetor pET28a possui uma sequência que codifica para uma cauda de polihistidina para purificação de proteínas fusionadas à mesma. Assim, as proteínas recombinantes resultantes podem ser purificadas por cromatografia de afinidade pelo Ni. Para isso, a uma coluna poly-prepchromatography (Bio-Rad) com capacidade para 10mL foi adicionado 1mL de resina Chelating Sepharose TM Fast Flow (GE) com 20% de etanol, o qual foi removido com 10 volumes de água milli-Q. Foi adicionado à coluna 2 volumes de solução de níquel 100Mm (Synth) e, após a resina ser carregada com o níquel, foram adicionados 10 volumes de tampão de lise; destes 10 volumes, 2 volumes foram mantidos na coluna para uma proporção 1:2 de resina e tampão.

3.15.2. Purificação da proteína recombinante

O pellet foi ressuspenso em 10mL de tampão de lise e sonicado para lise celular com uso do aparelho Fisher Scientific Model 500 Digital Sonic Dismembrator, com dez pulsos de 10 segundos e intervalo de 1 minuto entre cada pulso. A amostra lisada foi então centrifugada a 18000rpm / 30 minutos / 4°C e do lisado foram retirados 40µL para posterior análise por eletroforese em gel de SDS-PAGE 12%; esta amostra foi chamada de clarificado. O sobrenadante foi separado do pellet e este foi armazenado a -80°C. O sobrenadante foi então incubado em gelo com a resina já carregada com Ni sob leve agitação durante 30 minutos. Deu-se início à cromatografia, coletando-se o segundo mL da amostra (flow through) e o restante desprezado. Foram adicionados à coluna 20 volumes de tampão de lise com 20mM de imidazol (Sigma-Aldrich), coletado o segundo mL e o restante desprezado. Em

seguida, foi feita a eluição da proteína em fusão com um gradiente de tampão de lise com imidazol (40mM, 80mM e 200mM). As frações obtidas da cromatografia foram analisadas por SDS-PAGE 12% e coloração por *Coomassie brillante blue R-250*.

3.15.3. Quantificação da proteína recombinante

A proteína recombinante foi quantificada pelo espectrofotômetro NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific) e armazenada em freezer a -80°C até o momento de uso.

3.16. WESTERN BLOT

Após eletroforese, mergulhou-se o gel juntamente com dois papéis de filtro no tampão de transferência (Tris 48mM, glicina 39mM, SDS 0,037%, metanol 20%, água milli-Q q.s.p. 1000mL), enquanto a membrana de PVDF 0,45µm (GE) permaneceu imersa em metanol por 5 minutos. Transcorrido o tempo, a membrana foi imersa no tampão de transferência onde permaneceu por mais 5 minutos. O sanduíche foi montado colocando-se entre os papéis de filtro, a membrana face-a-face com o gel e aplicada uma corrente elétrica de 150V (150mA) por 1 hora, fazendo com que as proteínas carregadas fossem transferidas para a membrana mantendo a mesma disposição que apresentavam no gel. Após a transferência, a membrana foi então incubada por 18 horas em solução de bloqueio (50mL de PBS 1x contendo 5% de leite em pó desnatado – NaCl 0,14M, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄ 10,1mM, KH₂PO₄ 1,8mM, pH 7,3 e 2,5g de leite em pó desnatado) em geladeira (4°C) para impedir ligações não específicas entre a membrana e o anticorpo usado para detectar as proteínas alvo. Transcorrido o tempo de incubação, lavou-se a membrana com PBS 1x acrescido de tween 20 a 0,05%, 3 vezes por 5 minutos cada

lavagem sob agitação suave. A membrana foi incubada por 2 horas sob agitação suave com anticorpo primário Monoclonal Anti-poli Histidina, clone HIS-1 produzido em camundongo (Sigma-Aldrich – H1029) diluído 1:1500 em PBS 1x acrescido de tween 20 e 1% de leite desnatado em pó e lavado novamente como descrito. Após as lavagens, a membrana foi incubada por 1 hora com anticorpo secundário Anti-Camundongo IgG Peroxidase produzido em coelho (Sigma-Aldrich – A9044) em 1x PBS acrescido de tween 20 em concentração de 1:40000. Transcorrido tempo de incubação lavou-se a membrana com PBS 1x acrescido de tween 20 a 0,05%, 3 vezes por 5 minutos cada lavagem sob agitação suave. A membrana foi então imersa por 5 minutos em uma solução de luminol [50mL de Tris HCl 1M pH 8,5, 443mL água milli-Q, 5mL de solução A (0,22g de luminol, 5mL de DMSO), 2,2mL de solução B (0,033g de ácido p-cumárico, 2,2mL de DMSO)] e 0,3% de peróxido de hidrogênio, que age como substrato da reação. Em uma câmara escura, a membrana foi colocada em contato com um filme fotográfico por 5 minutos e a revelação das proteínas de interesse foi realizada com solução reveladora Step™ NBT/BCIP (Pierce) até o aparecimento da banda de interesse.

3.17. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) COM A PROTEÍNA rLc36 PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-LEISHMANIA DE CÃES UTILIZANDO FOSFATASE ALCALINA

Esse ensaio foi realizado para avaliar o potencial antigênico da proteína recombinante rLc36 contra soros de cães saudáveis e infectados. Para tal, baseou-se no protocolo descrito por Machado et al. (1997) com algumas modificações. Os soros de cães saudáveis são provenientes de Jaboticabal, área considerada não endêmica para LVC e soros positivos para LVC, foram gentilmente cedidos pela

profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV – UNESP), e os soros positivos para toxoplasmose e leptospirose foram gentilmente cedidas pelo prof. Dr. Hélio Langoni, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu. As amostras foram testadas através de exame parasitológico, RIFI, PCR e ELISA para confirmação ou não das parasitoses.

Estabeleceu-se por meio do valor obtido na quantificação das proteínas que seriam utilizadas e quais soros e diluições dos mesmos seriam testadas. Em seguida, placas (Immuno-Nunc 96 poços - Maxsorp) foram sensibilizadas com 100µL /poço de uma solução tampão carbonato-bicarbonato de sódio pH 9,6 com o antígeno diluído, de acordo com as concentrações já estabelecidas. As placas foram incubadas tampadas *overnight* (não mais do que 16 horas), em câmara úmida a 4°C.

Após a incubação de sensibilização, as placas foram lavadas três vezes com PBS tween 80 0,05%, e estas foram bem secas. Em seguida os poços foram bloqueados com 200µL /poço de solução de bloqueio (PBS 0,1M; tween 80 0,05%; 2% de leite em pó desnatado), em câmara úmida, 37°C por 1 hora. Os soros de cães infectados e não infectados foram preparados nas diferentes concentrações pré-estabelecidas e diluídos em PBS tween 80 0,05% + 2% de soro normal de coelho. Após o bloqueio, as placas foram novamente lavadas três vezes com PBS tween 80 0,05% e bem secas. Os soros diluídos foram então distribuídos nos poços das placas (100µL/poço), e incubados a 37°C por 1 hora em câmara úmida.

Transcorrido esse intervalo, as placas foram lavadas novamente com PBS 1x acrescido de tween 80 0,05% três vezes, bem secas e adicionados 100µL / poço do conjugado anti-cão IgG fosfatase alcalina produzido em coelho (Sigma) diluído 1:4000 em PBS tween 80 + 2% de soro normal de coelho. Seguiu-se incubação a

37°C por 1 hora em câmara úmida. Ao final da incubação, nova lavagem foi realizada em PBS tween 80 0,05%, por três vezes. Depois das placas bem secas, adicionou-se 100µL /poço do substrato para a fosfatase alcalina (fosfato de p-nitrofelina sal sódico 5mg em tabletes) diluído em tampão dietanolamina (1mg/mL). As placas foram envolvidas em papel alumínio e incubadas por 30, 45 e 60 minutos a temperatura ambiente. As leituras foram realizadas com filtro de 405nm (Leitora ELISA Placa Robonik – Readwell Touch Leitora automática de microplaca).

3.18. DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

Os cálculos de sensibilidade e especificidade foram realizados pela aplicação das seguintes fórmulas:

Sensibilidade (S):

$$S = \frac{\text{Valores Verdadeiros Positivos (VP)}}{\text{Valores Verdadeiros Positivos + Falsos Negativos (VP+FN)}}$$

Onde, os verdadeiros positivos representam as amostras oriundas de cães portadores de LV e laboratorialmente determinados.

—

Especificidade (E):

$$E = \frac{\text{Valores Verdadeiros Negativos (VN)}}{\text{Valores Verdadeiros Negativos + Falsos Positivos (VN+FP)}}$$

Onde, os verdadeiros negativos representam as amostras oriundas de cães negativos para LV.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ANÁLISE *IN SILICO* PARA SELEÇÃO DE PROTEÍNAS DE *L. infantum* PARA IMUNODIAGNÓSTICO DE LVC.

Em trabalho anteriormente desenvolvido em nosso grupo de pesquisa, genes específicos de *L. infantum*, ou seja, aqueles que não apresentam homólogos nas demais espécies de *Leishmania* (PEACOCK et al, 2007) foram analisados quanto à possibilidade de codificarem proteínas com potencial antigênico para o desenvolvimento de novos testes sorológicos para diagnóstico da LVC (ISABEL, 2010).

Sabe-se que anticorpos presentes nos soros de pacientes com doença de Chagas, LV e leishmaniose mucocutânea se ligam a antígenos compartilhados pelos três agentes causais dessas doenças, i.e., *T. cruzi* e *Leishmania spp.*, que ocorre devido a similaridade filogenética entre estas espécies de parasitos. No caso de cães, é muito comum sobreposição de áreas endêmicas para estas doenças, incluindo ainda erlichiose, babesiose, toxoplasmose e dirofilariose canina (TRONCARELLI, 2009). Assim, parte da análise *in silico* (Blast) foi planejada a fim de evitar o uso de sequências gênicas homólogas nas diferentes espécies de parasitos (quando disponível nos bancos de dados), tentando-se, assim, minimizar potenciais reações cruzadas com soros de animais portadores de outras parasitoses e, conseqüentemente, diminuindo o número de falso – positivos. Além disso, o estudo de características físico – químicas, tais como hidropaticidade, foi adotado para seleção de regiões da proteína expostas e com capacidade de desafiar o

sistema imune do hospedeiro mamífero na geração de uma resposta imune adaptativa.

Resumidamente, sequências nucleotídicas e protéicas *L. infantum*-específicas foram obtidas a partir do banco de dados de domínio público GeneDB (disponível no sítio <http://www.genedb.org/genedb/linfantum/>) e analisadas quanto a:

- Ausência de similaridade com outros parasitos (*Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Leptospira interrogans*, *Babesia canis*, *T. cruzi* e outras espécies de parasitos disponíveis nos bancos de dados na ocasião da busca, em 2008 e 2010) utilizando o programa BLAST (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool) do NCBI (**N**ational **C**enter of **B**iotechnology **I**nformation - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) contra banco de dados de sequências não redundantes do GeneBank (ALTSCHUL et al., 1997) ou, mais especificamente, para as sequências dos tripanossomatídeos, o banco de dados GeneDB do Sanger Center;

- Hidropaticidade, para determinação de regiões hidrofílicas (KYTE; DOOLITTLE, 1982);

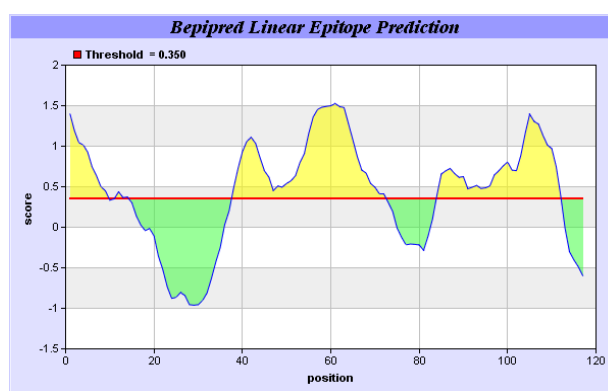
- Presença de domínios transmembrana (http://expasy.org/tools/pi_tool.html);

- Presença de epítomos reconhecidos pelos linfócitos B, utilizando-se o banco de dados IEDB Analysis Resource (<http://tools.immuneepitope.org/bcell>) (SAHA et al., 2005).

Dos genes previamente analisados com potencial antigênico (ISABEL, 2010), selecionou-se o gene Lc36 (número de acesso LinJ.36.4190) para estudos complementares, i.e, para clonagem no vetor de expressão pET28a, expressão e purificação para caracterização de seu potencial antigênico e seu uso no diagnóstico sorológico da LVC.

A sequência protéica codificada pelo gene Lc36 foi analisada, também, quanto a potenciais regiões de epítomos, a fim de selecionar um fragmento gênico para a obtenção da proteína recombinante que retenha a capacidade de ser reconhecida por anticorpos presentes nos soros de animais com LVC. Para isso utilizou-se o banco de dados do *IEDB Analysis Resource*, o qual se baseia na utilização de um banco de dados de proteínas reconhecidas por anticorpos do sistema imune (LARSEN et al., 2006). O banco de dados foi gerado a partir de dados publicados na literatura e aqueles extraídos do “AntiJen” (<http://www.ddg-pharmfac.net/antijen/AntiJen/antijenhmePAGE.htm>). Desta forma, para identificação de epítomos lineares/contínuos para as células B, realizou-se uma busca contra este banco de dados. A figura 7 mostra as potenciais regiões de epítomos para a sequência em estudo.

Figura 7 – Predição de epítomos para as células B utilizando-se o banco de dados *IEDB Analysis Resource*. Regiões de epítomos preditos para o gene Lc36 (em amarelo). Os valores na abscissa referem-se à posição dos aminoácidos na sequência.



Fonte: Autor.

A predição de epítomos vem sendo muito utilizada para identificação de antígenos para abordagens diagnósticas e desenvolvimento de vacinas (SAKIB et al,

2014; BERGMANN et al, 2013; MENDES et al, 2013). Recentemente, nosso grupo de pesquisa sintetizou diretamente dois peptídeos (EV0410 e EV0710) correspondentes a uma região de epítopo de um gene de *L. infantum* (LIMA et al, manuscrito em preparação, Processo FAPESP 2010/161850-1) no qual relata que o peptídeo mais reativo apresentou sensibilidade e especificidade de 50% e 67,39%, respectivamente, a partir de um painel de 95 soros, sendo 47 positivos e 48 negativos para LVC. Ainda, Mendes e colaboradores (2013) relatou a identificação de proteínas de *T. cruzi* antigênicas utilizando também uma abordagem *in silico* para predição de epítopos lineares/contínuos; estas proteínas mostraram-se reativas quando avaliadas contra um painel de soros de pacientes chagásicos. Estes resultados foram determinantes na escolha da região do gene Lc36 a ser clonada em vetores de expressão para posterior avaliação antigênica.

As sequências nucleotídica e protéica do fragmento selecionado estão mostradas abaixo. As sequências completas podem ser observadas no apêndice A.

6.1.1.a. Sequência nucleotídica selecionada para clonagem do gene Lc36:

>Lc36

```
ATGGGGCGAATCGACTCCTCTTGTGTCGCTGCCACGGTGACGCCTAGCAAGGTCGGCGCA
TCGTCGTCTTGTCCCGGCACGGCGACAAGCACTGGCAAGATAGACGAGCCTGCTTCTCGC
GCCGCTGCCCCGCAGGGCCGGGCGCAGCGATGTGGCCGAGCGCGACCCGCCAGATGCAC
AACAGCCTCAGTGCGGGGATGTGTGATAACCAACAGCAGCACGCCGCAGGCGTTTGAAG
TTGATTGCAGGGCCGCAGAGCGCCTCCACGACTCCGCCGCCGCTCGTGATGGGTGACGGC
ACAGGCGGCGAGGATCATGCGCAGGCTGCCACACCGGCGTCCGGTGGACTAAGCACGCG
TGGGAAAAGGGCAACGACTGCCCTGCGGGTAGCGCGTACGGGTCTTTTGTAGGCGCGCCG
CTGCGCAGGCTGCCGCCAACGCCTCCGTTCCCTGGTGTGCGTCTTCCCGCCTGGTGTCCG
TCCGCGTCGGCGACGGCGTATCCGCCTCCGAGGATGGCCTCACAAACGAGCTGCTGGACT
TCTTCTATTATCTGCAGTTGACCTCCCATGAGGAAGCGGCACGGGAGCGGCTGCTTGGCT
ACGTGCAGGCGTGCGTGGCGAAGTTGTGGGGCCCCTGTAAACGGGGAGCGAAGCCGAGGG
AACAGCACAGGTGATGCTGTACGGCAGCTACGCTCTAGGGCTTTCTCTTCCAAGCAGCGA
CATTGATCTTGCCCTGACTTTCCCGGCCGAGGAGCAGGTGGACGTCGC
```

6.1.1.b. Sequência protéica selecionada do gene Lc36:

>rLc36

```
MGRIDSSCVAATVTPSKVGASSSCP GTATSTGKIDEPASRAAAPQGRAQRCGRARPAQMH
NSLSAGMCDNQQQHAAGVWKLIAGPQSASTTPPLVMGDGTGGEDHAQAHTGVRWTKHA
WEKGND CPAGSAYGSFVGAPLRRLPPTPPFPGVRLPAWCRSASATAYPLSEDGLTNELLD
FFYYLQLTSHEEAARERLLGYVQACVAKLWGPCKPGSEAEGTAQVMLYGSYALGLSLPSS
DIDLALTFPAEEQVD
```

Determinado o fragmento e a sequência protéica codificada, a massa molecular da proteína foi obtida utilizando-se as ferramentas do programa *BioEdit* (disponível em <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) e do site *Expasy* (disponível em http://expasy.org/compute_pi).

Tabela 5 – Massa molecular da proteína selecionada.

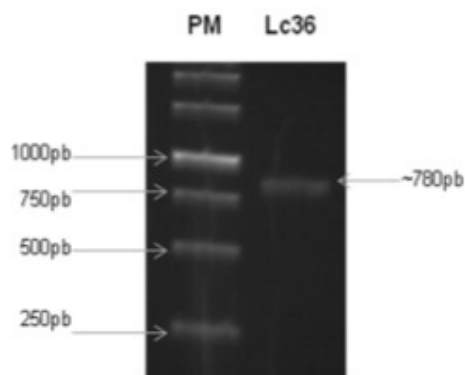
Proteínas	Massa molecular (kDa)	Tamanho (pb)
rLc36	28,40	780

Fonte: Autor

4.2. AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DO FRAGMENTO

Para amplificação do fragmento Lc36, extraiu-se o DNA genômico de formas promastigotas de *L. infantum* na fase logarítmica de crescimento. A amplificação do fragmento foi realizada com a enzima Taq DNA polimerase (Sigma-Aldrich) de acordo com as recomendações do fabricante. O produto de amplificação está mostrado na figura 8.

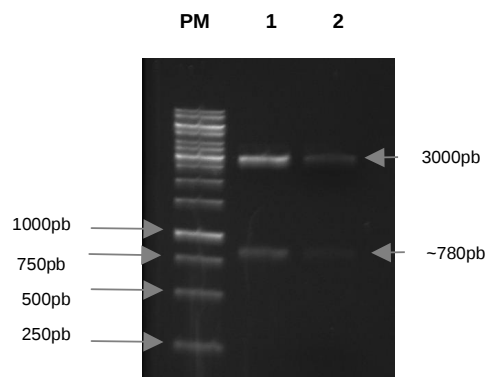
Figura 8 – Perfil eletroforético do produto de PCR em gel de agarose 1% corado por brometo de etídio. Banda de 780pb correspondente ao fragmento do gene Lc36. Amplificação obtida a partir do DNA genômico de *L. infantum* com os oligonucleotídeos Lc36 *forward/ reverse*. **PM**: Peso molecular GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (*Fermentas, fornecedor Sinapse Biotecnologia LTDA*).



Fonte: Autor.

O produto de PCR Lc36 (780pb) purificado foi clonado diretamente no vetor pGEM T-Easy de acordo com as recomendações do fabricante (Promega - Madison, WI - USA). Após transformação bacteriana em *E. coli* linhagem DH5 α , foram selecionadas colônias ampicilina resistentes e brancas (alfa-complementação pela degradação do 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo - X-Gal) para preparo de pré-inóculos e posterior extração de DNA plasmidial (miniprep). A figura 9 representa os resultados das digestões dos produtos da miniprep de diferentes plasmídeos recombinantes, aqui denominados pGEM_Lc36.

Figura 9 – Perfil eletroforético dos produtos de miniprep das colônias transformantes para verificação da clonagem dos fragmentos em vetor pGEM T-Easy. Duas colônias aleatórias de bactéria DH5 α transformadas com o plasmídio recombinante pGEM_Lc36. **PM:** Peso molecular GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas, fornecedor Sinapse Biotecnologia LTDA).

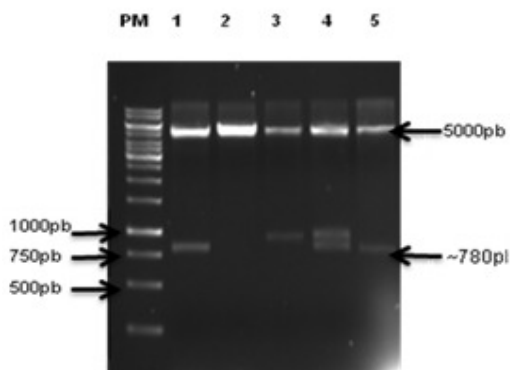


Fonte: Autor.

O plasmídeo recombinante pGEM_Lc36 foi digerido com as enzimas de restrição *Nco*I e *Hind*III. Para recuperação e purificação do fragmento de DNA e subclonagem do mesmo em vetor de expressão pET28a, foram seguidos os procedimentos descritos nos itens 3.10 e 3.11, respectivamente.

O vetor de expressão pET28a foi linearizado com as enzimas de restrição *Nco*I e *Hind*III para ligação do fragmento Lc36 *Nco*I/*Hind*III extraído do vetor recombinante pGEM_Lc36. Após ligação dos fragmentos nos sítios de restrição *Nco*I/*Hind*III do vetor pET28a, seguiu-se transformação bacteriana em *E. coli* linhagem DH5 α ; foram selecionadas colônias canamicina resistentes para preparo de pré-inóculos e posterior extração de DNA plasmidial. A figura 10 mostra resultados das digestões dos produtos da miniprep de diferentes plasmídeos recombinantes, aqui denominados pET28a_Lc36.

Figura 10 - Perfil eletroforético dos produtos de miniprep das colônias transformantes para verificação da clonagem do fragmento em vetor de expressão pET28a. Clones recombinantes pET28a_36. **PM:** corresponde ao marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder (*Fermentas* - fornecedor *Sinapse Biotecnologia LTDA*).



Fonte: Autor.

Após confirmação da clonagem do fragmento Lc36 no vetor de expressão pET28a, realizou-se sequenciamento dos clones recombinantes pela empresa MacroGen Inc. (Coréia do Sul) com o objetivo de avaliar a manutenção da fase aberta de leitura correta das construções antes do início da expressão da proteína recombinante. Para isso, as construções foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific). O resultado do sequenciamento mostrou que o plasmídeo recombinante pET28a_Lc36 estava correto quanto a fase aberta de leitura e orientação do fragmento (figura 11).

Figura 11 – Fragmento Lc36 clonado no vetor de expressão pET28a. Enzimas de restrição: *Nco*I e *Hind*III com seus respectivos sítios de restrição. & = TGA = códon de parada e M = Aminoácido metionina = ATG - códon de início.

5'	11	21	31	41	51	61	71	81	91
					Nco I				
+3	V G G T F P	S R I F C L T	L R R R Y T	M G R I D S S C V A A T V T					
1	GGGTGGGGG TACATTCCTC	TCTAGAATAT TTTGTTTAA	TTTAAGAAGG AGATATA	TTTGGCGAAT CGACTCCTCT	TGTGTCGCTG CCACGGTGAC				
	CCCACCCCC ATGTAAGGG	AGATCTTATA AAACAAATTG	AAATTCCTCC TCTATAT	TTTGGCGAAT CGACTCCTCT	TGTGTCGCTG CCACGGTGAC				
+3	P S K V G A S S S C	P G T A T S T G K I	D E P A S R A A A P Q G R						
101	GCCTAGCAAG GTCGGCGCAT	CGTCGTCTTG TCCCGGCACG	GCGACAAGCA CTGGCAAGAT	AGACGAGCCT GCTTCTCGCG	CCGCTGCCCG GCAGGGCCGG				
	CGGATCGTTC CAGCCGCGTA	GCAGCAGAAC AGGGCCGTGC	CGCTGTTCGT GACCGTTCTA	TCTGTCGGA CGAAGAGCGC	GGCGACGGGG CGTCCCGGCC				
+3	A Q R C G R A R P A	Q M H N S L S A G M	C D N Q Q Q H A A G V W K						
201	GCGCAGCGAT GTGGCCGAGC	GCGACCCGCC CAGATGCACA	ACAGCCTCAG TCGGGGATG	TGTGATAACC AACAGCAGCA	CGCCGACGGC GTTTGGAAGT				
	CGCGTCGTA CACCGGCTCG	CGCTGGGCGG GTCTACGTGT	TGTCGGAGTC ACGCCCTAC	ACACTATTGG TTGTCGTCGT	CGCGCGTCCG CAAACCTTCA				
+3	L I A G P Q S A S T	T P P P L V M G D G	T G G E D H A Q A A H T G V						
301	TGATTGCAGG GCCGACAGC	GCCTCCACGA CTCCGCCGCC	GCTCGTGATG GGTGACGGCA	CAGGCGGCGA GGATCATGCG	CAGGCTGCCC ACACCGCGCT				
	ACTAACGTCC CGCGCTCTCG	CGGAGGTGCT GAGGCGGCGG	CGAGCACTAC CCACTGCCGT	GTCCGCGGCT CCTAGTACGC	GTCCGACGGG TGTGCGCCGA				
+3	R W T K H A W E K G	N D C P A G S A Y G	S F V G A P L R R L P P T						
401	CCGTGGACT AAGCACGCGT	GGGAAAAGGG CAACGACTCG	CCTGCGGGTA GCGCGTACGG	GTCTTTTGTG GGCGCGCCGC	TGCGCAGGCT GCCGCCAACG				
	GGCCACCTGA TTCTGCGCA	CCCTTTTCCC GTTGCTGACG	GGACGCCCAT CGCGCATGCC	CAGAAAACAT CGCGCGGCGC	ACGCGTCCGA CGGCGSTTGC				
+3	P P F P G V R L P A	W C R S A S A T A Y	P L S E D G L T N E L L D						
501	CCTCCGTTC CTGTTGTGCG	TCTTCCCGCC TGGTGTCCGT	CCGCGTCGGC GACGCGGTAT	CCGCTCTCCG AGGATGGCCT	CACAAACGAG CTGCTGGACT				
	GGAGGCAAGG GACCACACGC	AGAAGGGCGG ACCACAGCCA	GGCGCAGCCG CTGCGCATA	GGCGAGAGGC TCCTACCGGA	GTGTTTGCTC GACGACCTGA				
+3	F F Y Y L Q L T S H	E E A A R E R L L G	Y V Q A C V A K L W G P C K						
601	TCTTCTATTA TCTGCAGTTG	ACCTCCCATG AGGAAGGGCG	ACGGGAGCGG CTGCTTGGCT	ACGTGCAGGC GTGCGTGGCG	AAGTTGTGGG GCCCCTGTAA				
	AGAAGATAAT AGACGTCAAC	TGGAGGTAC TCCTTCGCCG	TGCCCTCGCC GACGAACCGA	TGCACGTCCG CACGCACCCG	TTCAACACCC CGGGGACATT				
+3	P G S E A E G T A Q	V M L Y G S Y A L G	L S L P S S D I D L A L T						
701	ACCGGGGAGC GAAGCCGAGG	GAACAGCACA GGTGATGCTG	TACGGCAGCT ACGCTCTAGG	GCTTCTCTTT CCAAGCAGCG	ACATTGATCT TGCCCTGACT				
	TGGCCCTCG CTTCGGCTCC	CTTGTCGTGT CCACTACGAC	ATGCCGTGCA TCGAGATCC	CGAAAGAGAA GTTTCGTGCG	TGTAAGTAGA ACGGGACTGA				
		Hind III		Cauda de Poli-histidina					
+3	F P A E E Q V D K L	A A A L E H H H H H	H A D P A A N K A R K E A						
801	TTCCCGGCGG AGGAGCAGGT	GGACGAGCTG GCGGCGCAC	TCGAGACCCA CCACCACCAC	CAGTGAGATC CGGCTGCTAA	CAAAGCCCGA AAGGAAGCTG				
	AAGGGCCGGC TCCTCGTCCA	CCTGTTTCAA CGCCGGCGTG	AGCTCGTGGT GGTGGTGGTG	GTGACTCTAG GCCGACGATT	GTTTCGGGCT TTCCTTCGAC				
+3	E L A A A T A E Q #	L A # P L G A S K R	V L E G F F A E E R R	N Y I R					
901	AGTTGGCTGC TGCCACCGCT	GAGCAATAAC TAGCATAACC	CCTTGGGGCC TCTAAACGGG	TCTTGGAGGG GTTTTTTGTCT	GAAAGGAGGA ACTATATCCG				
	TCAACCGACG ACGGTGGCGA	CTCGTTATTG ATCGTATTGG	GGAACCCCGG AGATTTGCC	AGAACCTCCC CAAAAACGA	CTTTCCTCCT TGATATAGGC				
+3	I G E W E								
1001	GATTGGCGAA TGGGAAG								
	CTAACCGCTT ACCCTTC								

Fonte: Autor.

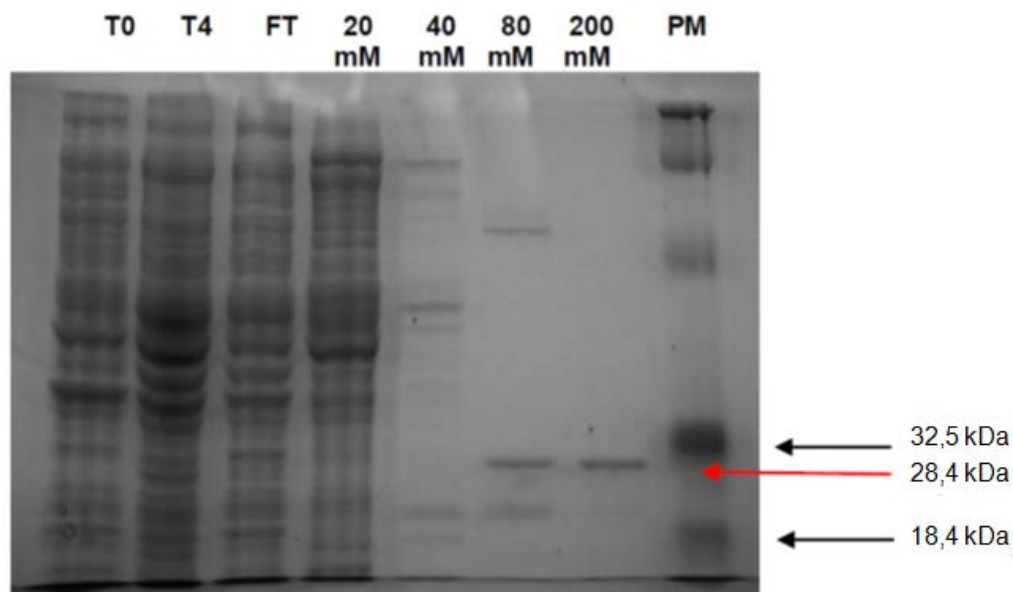
Com a confirmação da fase de leitura do plasmídeo recombinante pET28a_Lc36, seguiu-se com os experimentos de expressão da proteína rLc36. A transformação de *E. coli* linhagem BL21 (DE3) competente foi realizada para início dos experimentos de expressão da proteína.

4.3. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Foram preparados pré-inóculos em meio LB das colônias BL21 (DE3) transformadas com o plasmídeo pET28a_36 recombinante, selecionadas aleatoriamente em meio LB ágar sólido contendo canamicina (25 g/mL). Estas colônias foram crescidas por 14-16 horas a 37°C, sob agitação constante de 250rpm. Além da linhagem BL21 (DE3) (Agilent Technologies), foram também testadas, quanto ao potencial de expressão da proteína rLc36, as linhagens Rosetta (Invitrogen) e CodonPlus (Promega).

Os extratos totais foram analisados em gel SDS-PAGE 12%, conforme descrito no item 3.16. Para as bactérias expressoras Codon Plus e Rosetta, não foi possível observar uma banda referente à proteína expressa rLc36 entre as proteínas totais, uma vez que diferentes proteínas, com pesos moleculares similares, podem estar sobrepostas no gel, dificultando a visualização da expressão das proteínas de interesse. Na tentativa de observar as bandas de expressão, realizou-se a expressão em maior escala, que foi realizada de acordo com o item 3.17. Os resultados de indução e purificação em grande escala mostraram que a linhagem BL21 (DE3) expressou a proteína rL36, como é possível observar na figura 12, após processo de purificação com imidazol 200mM.

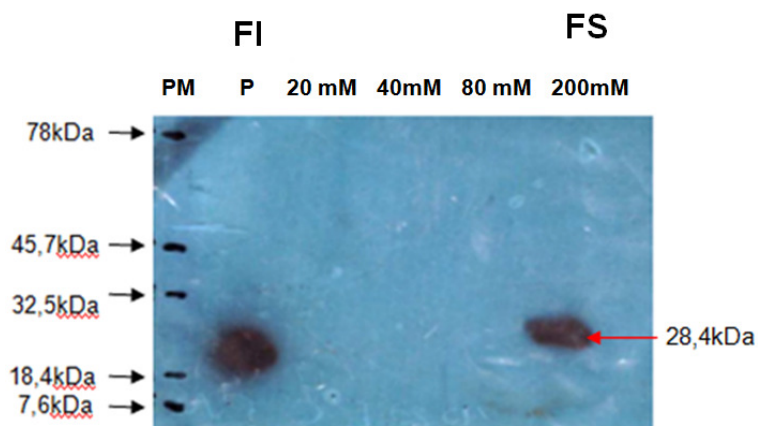
Figura 12 – Análise da expressão da proteína rLc36 em *E. coli* linhagem BL21 (DE3) à temperatura de 30°C, induzido com IPTG 0,5mM. SDS-PAGE 12%, corado com *Coomassie brillante blue r-250*. SDS-PAGE 12% de extrato de células *E. coli* BL21 (DE3) pET28aLc_36. T0: não induzido com IPTG; T4: 4 horas de indução com IPTG; FT: flow through; 20 mM de imidazol; 40 mM de imidazol; 80 mM de imidazol; 200 mM de imidazol,. A seta em vermelho indica a localização de uma banda de aproximadamente 28,4kDa, correspondente à proteína rLc36 recombinante. PM: Peso molecular de massa de proteínas (Kaleidoscope Prestained Standards – Bio-Rad).



Fonte: Autor.

O *Western blot* mostrado na figura 13 confirma a presença da cauda de polihistidina na proteína recombinante, confirmando sua identidade, mostrando que rLc36, apesar desta estar presente em grande quantidade na fração insolúvel da amostra purificada, também está em quantidade significativa na fração solúvel; assim, foi possível iniciar os testes de antigenicidade com a mesma.

Figura 13 – *Western blot* da proteína rLc36. Os gradientes de purificação da proteína rLc36 recombinante em diferentes concentrações de imidazol foram transferidos para membrana de PVDF para realização do ensaio de *Western Blot*. Proteína resultante da indução à 30°C – 250rpm – 3h. (FS) fração solúvel e (FI) fração insolúvel. A seta vermelha indica a banda correspondente à proteína rLc36 de aproximadamente 28,4kDa. PM: Peso molecular de massa de proteínas (Kaleidoscope Prestained Standards – Bio-Rad).



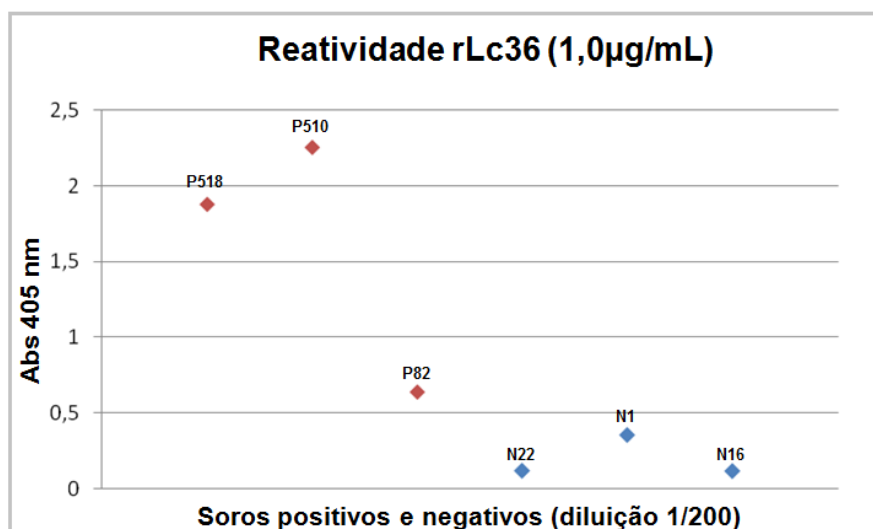
Fonte: Autor

4.4. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) COM A PROTEÍNA rLc36 PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-LEISHMANIA.

Após purificação da proteína rLc36, foram testadas diferentes concentrações da mesma (0,5 µg/mL; 1,0 µg/mL; 2,5 µg/mL; 5,0 µg/mL e 10,0 µg/mL), diferentes diluições de soros positivos e negativos para LVC (1/100, 1/200, 1/400 e 1/800) e tempos de incubação (30, 45 e 60 minutos) para ensaios preliminares, a fim de avaliar o potencial antigênico da proteína rLc36, além de padronizar os parâmetros a serem utilizados nos testes de ELISA para determinação de sensibilidade e especificidade. Para este ensaio, utilizaram-se três soros caninos positivos e três soros caninos negativos para LV.

Os resultados obtidos nesse ensaio preliminar revelaram que a melhor reatividade da proteína rLc36 frente aos soros testados foi obtida na concentração 1,0µg/mL e na diluição 1/200 dos soros; neste caso, é possível observar uma diferença maior na leitura das absorbâncias entre soros negativos e positivos, como mostrado na tabela 6 e figura 14; assim, esses parâmetros foram adotados para os demais ensaios. Nos resultados apresentados e discutidos a seguir, todos os soros precedidos da letra N são soros negativos para LVC e os precedidos da letra P são positivos para a mesma; os números utilizados foram apenas para facilitar a organização das amostras.

Figura 14 – Ensaio preliminar de reatividade da proteína rLc36, utilizando-se 1,0µg/mL de antígeno/poço, diluição dos soros 1/200 e tempo de incubação de 60 minutos. **Abcissas:** concentração de soros 1/200. **Ordenadas:** absorbância das amostras em comprimento de onda 405nm. **Pontos em azul:** três soros caninos negativos para leishmaniose visceral. **Pontos em vermelho:** três soros caninos positivos para leishmaniose visceral.



Fonte: Autor.

Tabela 6 – Absorbância dos soros positivos e negativos utilizados no ensaio preliminar de ELISA com as variáveis de concentração de antígeno, diluição dos soros e tempo de incubação da reação.

Soros Diluição 1/200	Concentrações rLc36				
	0,5ug/mL	1,0ug/mL	2,5ug/mL	5,0ug/mL	10,0ug/mL
30 minutos					
P33	0,851	1,134	1,288	0,699	0,837
P28	1,242	1,406	1,36	1,239	1,172
P11	0,415	0,404	0,303	0,341	0,336
N25	0,107	0,079	0,07	0,091	0,122
N28	0,207	0,254	0,312	0,396	0,346
N69	0,056	0,123	0,127	0,096	0,084
45 minutos					
P33	1,138	1,375	1,641	1,018	1,208
P28	1,771	1,761	1,752	1,667	1,649
P11	0,496	0,514	0,417	0,464	0,483
N25	0,133	0,107	0,107	0,176	0,173
N28	0,263	0,358	0,4	0,554	0,49
N69	0,125	0,159	0,146	0,146	0,128
60 minutos					
P33	1,6055	1,8815	2,0565	1,3495	1,5865
P28	2,2785	2,2575	2,1925	2,1695	2,1345
P11	0,6855	0,6435	0,5225	0,6285	0,6395
N25	0,1415	0,1185	0,1375	0,1045	0,2245
N28	0,3285	0,3545	0,5355	0,5975	0,6295
N69	0,1085	0,1165	0,1835	0,1555	0,1605

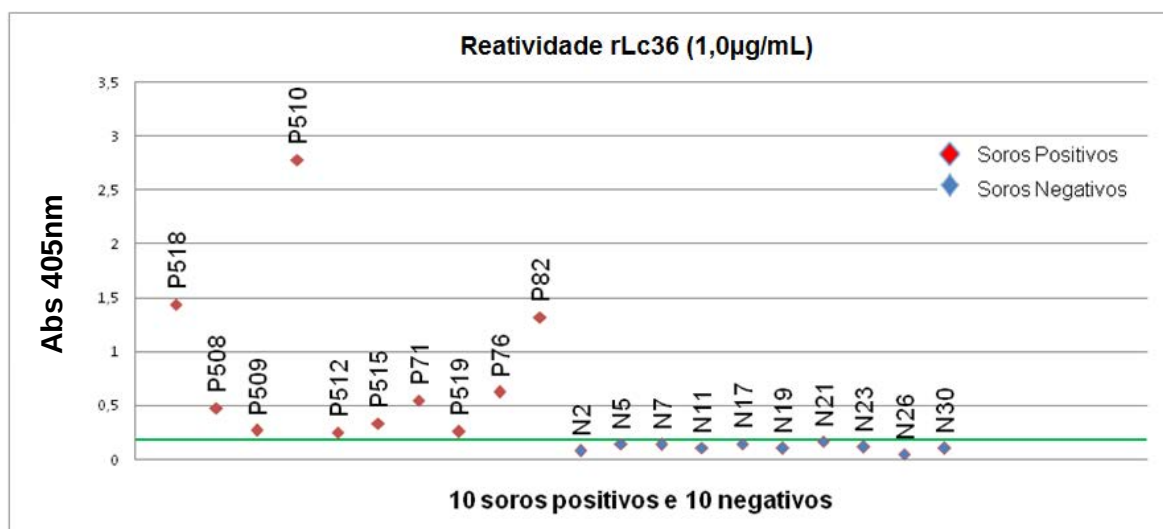
Fonte: Autor

É possível observar na figura 14 que o soro positivo P11 permaneceu muito próximo à linha dos soros negativos durante todo o experimento. Uma possível explicação para este comportamento observado pode ser o fato de cada organismo responder imunologicamente de forma diferente ao antígeno (parasito) e/ ou, dependendo do estágio da doença, apresentar resposta imunológica humoral diferenciada de acordo com os antígenos expressos em cada fase da doença.

Em busca de resultados reprodutíveis, a partir dos dados obtidos, outros soros foram testados na região em que a antigenicidade da proteína rLc36 foi

observada com maior relevância (1,0 µg/ml de antígenos, diluição dos soros 1/200 e tempo de incubação de 60 minutos). Desta forma, foram utilizados 10 soros positivos e 10 soros negativos. Como controle, foram preparados dois poços sem antígeno e sem soros para reações com o conjugado. Além disso, calculou-se o *cut off* ou ponto de corte (ponto determinado estatisticamente que caracteriza valores acima como positivos e valores iguais ou abaixo como negativos) conforme descrito por Frey e colaboradores (1998), considerando-se uma confiança de 95%.

Figura 15 – Reatividade da proteína rLc36 frente aos soros positivos e negativos para LVC testados na diluição de 1/200 perante a concentração de 1,0µg/mL do antígeno, com 60 minutos de incubação. Os pontos vermelhos correspondem aos soros positivos enquanto os azuis aos soros negativos. A linha verde na horizontal representa o valor do *cut off* para 95,0% de confiança (Frey, DI CANZIO E ZURAKOWSKI, 1998) e cujo valor corresponde a 0,185.

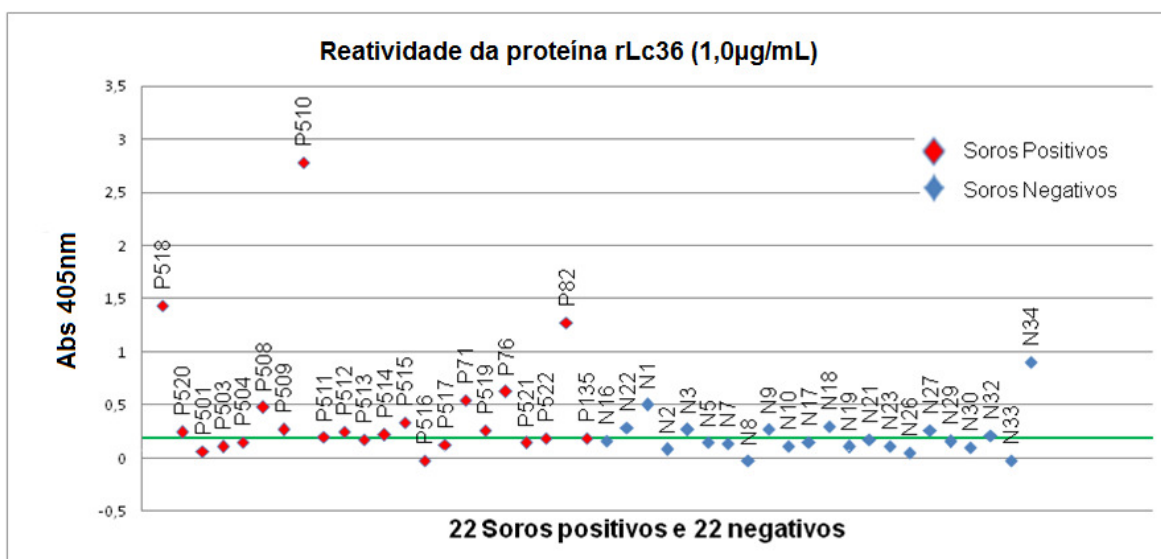


Fonte: Autor.

Soros adicionais foram testados (considerando os soros testados anteriormente), totalizando 22 soros positivos e 22 soros negativos para LVC para cálculos preliminares de sensibilidade e especificidade. Os resultados iniciais de sensibilidade e especificidade das absorbâncias estão expostos tabela 7 e na figura

16 estão expostos os resultados. Os dados de absorbância deste ensaio estão apresentados na tabela 11 apresentada no apêndice C,

Figura 16 – Reatividade da proteína rLc36 frente aos soros positivos e negativos para LVC testados na diluição de 1/200, perante a concentração de 1,0µg/mL do antígeno, com 60 minutos de incubação. Gráfico construído com os dados da tabela 11 (apêndice C). Os pontos vermelhos correspondem aos soros positivos enquanto os azuis aos soros negativos. A linha verde na horizontal representa o valor do *cut off* para 95,0% de confiança e cujo valor corresponde a 0,185.



Fonte: Autor.

Tabela 7 – Resultado inicial de sensibilidade e especificidade da proteína rLc36 em ensaio de ELISA.

	Fórmula	Resultado
Sensibilidade	$S = VP / (VP + FN)$	64%
Especificidade	$E = VN / (VN + FP)$	60%

Fonte: Autor.

Foi possível observar que os valores encontrados para sensibilidade e especificidade nestes testes preliminares mostraram-se promissores; e,

considerando a pequena quantidade de soros testados, foram necessários mais dados experimentais para confirmar a reprodutibilidade dos resultados, a ponto de afirmar o quanto o antígeno avaliado nesse método seria capaz de identificar os verdadeiros positivos (sensibilidade) e diferenciar os verdadeiros positivos de verdadeiros negativos (especificidade). Dessa forma, um número maior de soros positivos (n=74) e negativos (n=50) foi testado, utilizando 1,0µg/ml da proteína recombinante rLc36. Os dados estão apresentados na tabela 12 (apêndice C) e na figura 17.

Na tabela 8 estão mostrados os dados de sensibilidade e especificidade frente a 74 soros positivos e 50 soros negativos para LVC.

Tabela 8 – Resultado de sensibilidade e especificidade da proteína rLc36 em ensaio de ELISA, com concentração do antígeno 1,0µg/mL, diluição dos soros 1/200 e tempo de incubação de 60 minutos.

	Fórmula	Resultado
Sensibilidade	$S = VP / (VP + FN)$	85%
Especificidade	$E = VN / (VN + FP)$	71%

Proteínas recombinantes têm sido testadas como antígenos alternativos para o diagnóstico da LVC, sendo uma fonte promissora para o desenvolvimento de testes diagnósticos mais simples, rápidos e específicos, que possam ser utilizados em campo e que também sejam capazes de diferenciar animais vacinados daqueles naturalmente infectados. Um exemplo é a proteína A2 (CHAREST; MATLASHEWSKI, 1994), que é exclusiva da fase amastigota de leishmanias do complexo *L. donovani* e do complexo *L. mexicana* e que foi testada quanto a antigenicidade em testes sorológicos na tentativa de aumentar a eficácia do diagnóstico das leishmanioses (COSTA, et al., 2012; AKHOUNDI et al., 2013; PORROZZI 2007). Os resultados obtidos por Carvalho et al. (2002) mostraram que o teste utilizando essa proteína foi mais específico no diagnóstico da LVC do que os testes utilizando extrato bruto de parasitos (lisado).

Costa e colaboradores (2012) analisou uma combinação de antígenos (A2, K39, LACK e NH) através de ELISA (tabela 9), para diagnóstico de soros de

pacientes e cães com LV. Esta combinação resultou em aumento da sensibilidade e especificidade próximo a 100%. Assim, considerando estas informações decidiu-se realizar um teste que unisse as duas proteínas, rLc36 e A2, na tentativa de verificar se a combinação dos dois antígenos seria capaz de aumentar tanto sensibilidade-e especificidade.

Tabela 9 – Valores de sensibilidade e especificidade de diferentes antígenos para LVC.

	ANTÍGENOS (testados através do ensaio de ELISA)				
	rLc36	A2	rK39	LACK	NH
Sensibilidade	85%	75%	97%	85-100%	75-100%
Especificidade	71%	76%	98%	92%	92-100%
Referência	Autor	Autor	COSTA et al., 2012	COSTA et al., 2012	COSTA et al., 2012

Para a realização desses ensaios, 2,5µg/mL da proteína A2 (número de acesso GQ290460.4), gentilmente cedida pela profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (UNESP), foi utilizada nos testes de ELISA descritos a seguir (concentração padronizada em ensaios realizados pelo grupo da Dra Machado e que apresenta melhor reatividade quando ensaiado frente a soros de cães positivos para LVC).

Realizaram-se três ensaios simultâneos de ELISA com os seguintes parâmetros:

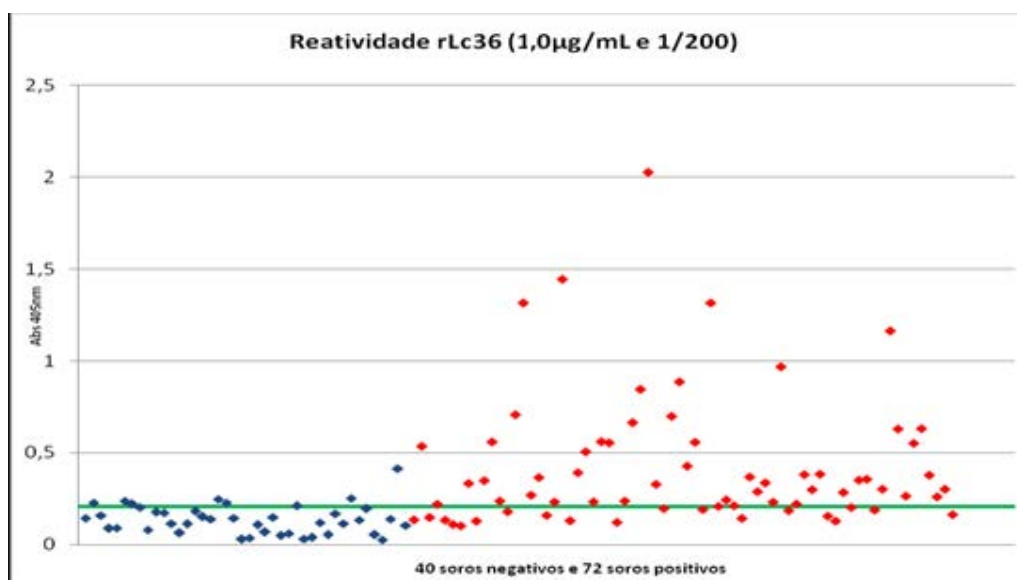
- 1,0µg/mL da proteína rLc36 e soros diluídos a 1/200;
- 2,5µg/mL de A2 e soros diluídos a 1/200;

- 1, 0µg/mL da proteína rLc36 + 2,5µg/mL e soros diluídos a 1/200.

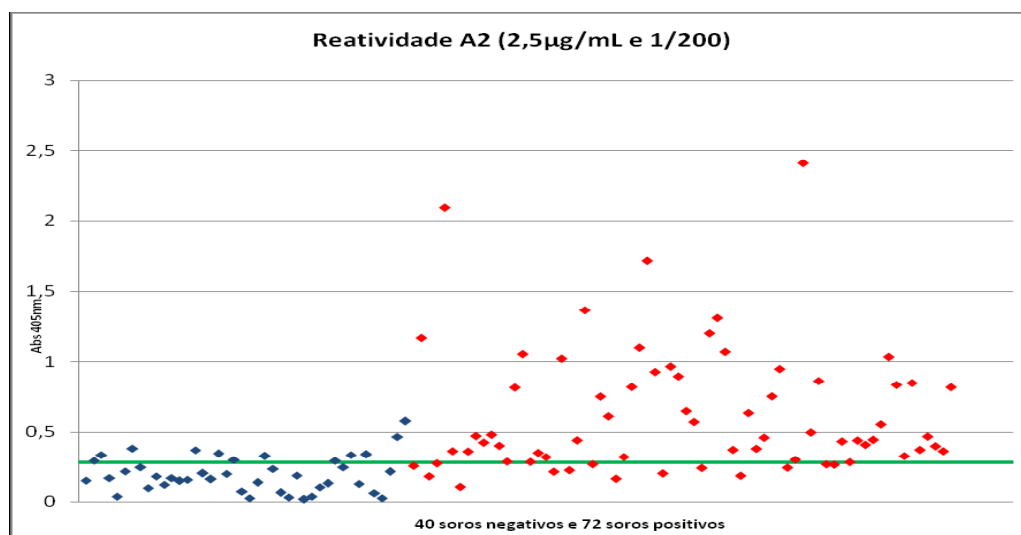
Os ensaios foram realizados utilizando-se o mesmo protocolo (item 3.18 da metodologia). Os resultados obtidos podem ser observados na figura 18 e na tabela 10 abaixo.

Figura 18 – Reatividade frente aos soros positivos (n=72) e negativos (n=40) para LVC, testados na diluição 1/200, perante as concentrações de 1,0µg/mL da proteína rLc36 e 2,5µg/mL da proteína A2, com 60 minutos de incubação. **Painel A:** soros positivos e negativos para LVC testados frente a proteína rLc36 na concentração 1,0µg/mL e diluição dos soros 1/200. **Painel B:** soros positivos e negativos para LVC testados frente a proteína A2 na concentração 2,5µg/mL e diluição dos soros 1/200. **Painel C:** soros positivos e negativos para LVC testados frente às proteínas rLc36 e A2 nas concentrações 1,0µg/mL e 2,5µg/mL, respectivamente, e diluição dos soros 1/200. Os pontos vermelhos correspondem aos soros positivos enquanto os azuis aos soros negativos. A linha verde na horizontal representa o valor do *cut off* para 95,0% de confiança (Frey, Di Canzio e Zurakowski, 1998) e cujo valor corresponde a 0,208 para o painel A, 0,280 para o painel B e 0,200 para o painel C.

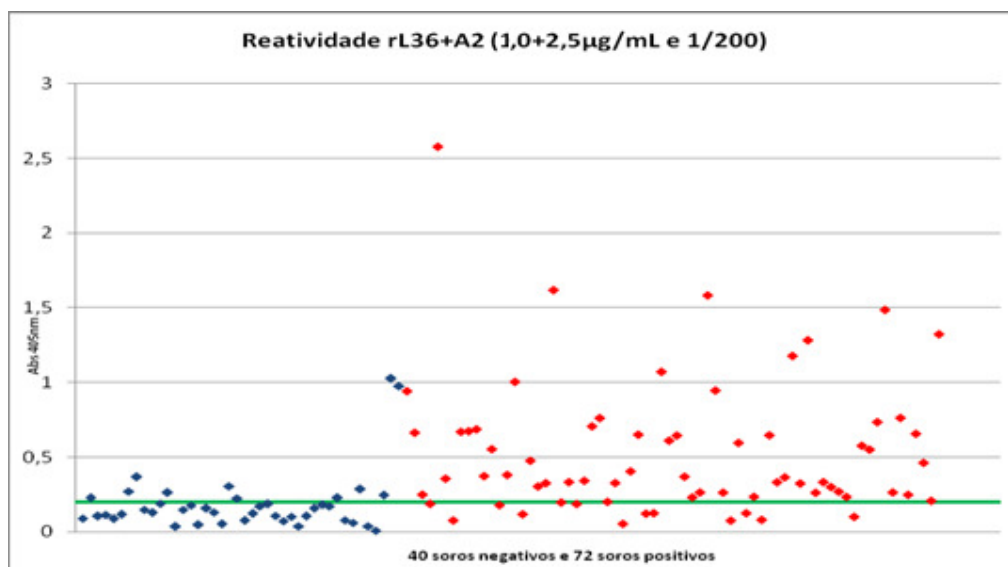
(A)



(B)



(C)



Fonte: Autor.

Tabela 10 – Sensibilidade e especificidade das proteínas rLc36 e A2 testadas separadamente e em associação.

Antígenos	Sensibilidade	Especificidade
rLc36	85%	71%
A2	75%	76%
rLc36 + A2	77%	79%

Fonte: Autor

Os resultados revelaram que a união das duas proteínas no mesmo ensaio aumentou a sensibilidade do teste, o que pode ser devido ao aumento na oferta de antígenos utilizados no ensaio; porém, diminuiu a especificidade do mesmo, quando comparado ao valor encontrado no teste apenas com a proteína rLc36. Estes resultados corroboram a pesquisa desenvolvida por Fonseca e colaboradores (2014), que testaram três diferentes antígenos de *L. infantum* separadamente e dois deles em conjunto. Os pesquisadores verificaram que, ao testar dois antígenos em conjunto, ocorreu aumento na sensibilidade do teste, porém a especificidade diminuiu quando comparada ao uso dos antígenos separadamente. Alguns autores têm descrito que, quando diferentes epítomos são unidos em uma mesma solução ou em uma molécula quimérica, os antígenos combinados não aumentam a eficiência do teste. Faria e colaboradores (2011) descreveram alguns peptídeos com sensibilidade entre 70,9% e 88,7%, e especificidade entre 55% e 95% em ensaios de ELISA para LVC. Quando esses peptídeos foram testados em conjunto, unidos em uma única solução, a performance do teste não aumentou, com sensibilidade de 75% e especificidade de 95%.

Além disso, análise BlastP da sequência A2 revelou que esta apresenta similaridade ($E\text{-value} \leq 10^{-5}$) com sequências de diferentes microrganismos que podem estar no ambiente em que os cães vivem, como por exemplo, *Metarhizium anisopliae* (PRETTE, 2007) ou mesmo infectando-os como *Candida glabrata* (BRADFORD et al., 2013), entre outros (figura 19). Como os bancos de dados são dinâmicos, ou seja, mudam periodicamente em função dos depósitos de sequências realizadas por diferentes grupos de pesquisa ao longo do tempo, nova análise Blastp foi realizada em 01/08/2014, revelando que o fragmento codificado pelo gene Lc36 agora apresenta similaridades em *L. donovani* (98% de identidade) e *L. mexicana* (84% de identidade), diferentemente do que foi observado na ocasião do início deste projeto (2010). No entanto, por se tratar de estudo realizado no Brasil, essas similaridades não interferem nos ensaios realizados, uma vez que essas espécies de leishmanias não ocorrem no país.

Figura 19 - Análise Blastp realizada com a sequência A2 como query contra um banco de dados de sequências não redundantes. Os E-values (Expected Values) obtido para *Metharhizium anisopliae* e *Candida glabrata* foram, respectivamente, 2×10^{-10} e 1×10^{-5} .

Download ▾ [GenPept](#) [Graphics](#) Sort by: E value ▾

copper radical oxidase [Metharhizium anisopliae ARSEF 23]

Sequence ID: [reflXP_007823925.1](#) Length: 1900 Number of Matches: 26

▶ [See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 461 to 544 [GenPept](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
67.4 bits(163)	2e-10	Compositional matrix adjust.	43/87(49%)	46/87(52%)	3/87(3%)
Query 15	CVA AVLALSA S AEPHKAADV G LSV D V G LSV G P QSV G LSV G LSV G P QAV G LSV G P				74
	C A+ S EP A GP GP S GPQS GP S GP S GP+ GP S GP				
Sbjct 461	CPASTGTPASTGPEPSGPA-STGPE--PSGPASTGPQSSGPASTGPASTGPEPSGPASTGP				517
Query 75	QAVGLLSVGPQSVGLSVGPQSVG L S 101				
	+ G S GPQS GP S GP S GP S				
Sbjct 518	EPSGPASTGPQSSGPASTGPASTGPES 544				

Epa2p [Candida glabrata]

Sequence ID: [gb|AAQ82692.1](#) Length: 1297 Number of Matches: 6

Range 1: 458 to 539 [GenPept](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
52.8 bits(125)	1e-05	Compositional matrix adjust.	37/82(45%)	39/82(47%)	2/82(2%)
Query 24	ASAEPHKAADV G LSV D V G LSV G P QSV G LSV G LSV G P QAV G LLS --VGPQAVGLLS				81
	+S P VD P P SV P SV P SV P SV P +V P S V P S				
Sbjct 458	SSVNPSSKPVDPSPADPSHNPSSVNPSSVNPSSVNPSSVNPSSKPVDPSPADPSS				517
Query 82	VGPQSVGLSVGPQSVG L S 103				
	V P SV P SV P SV P SV				
Sbjct 518	VNPSSVNPSSVNPSSVNPSSVN 539				

Fonte: Autor.

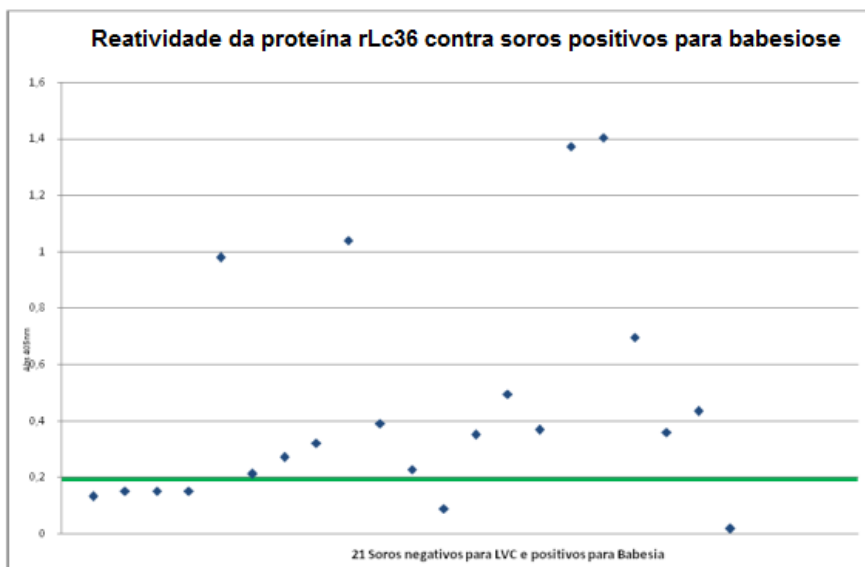
4.5. ANÁLISE DE POTENCIAL REATIVIDADE CRUZADA DO ANTÍGENO RLC36 COM SOROS DE CÃES PARASITADOS POR OUTROS ORGANISMOS.

Em análise *in silico* realizada em 2010, O gene Lc36 foi selecionado por ser específico da espécie *L. infantum*, assim seu produto, a proteína rLc36 mostrou-se rinteressante para compor um diagnóstico específico para LVC, evitando reações cruzadas com outras parasitoses que comumente afetam cães, como a babesiose, erliquiose, toxoplasmose e leptospirose. Assim, os soros foram testados frente a concentração de 1,0µg/mL da proteína rLc36, diluição dos mesmos 1/200 e tempo

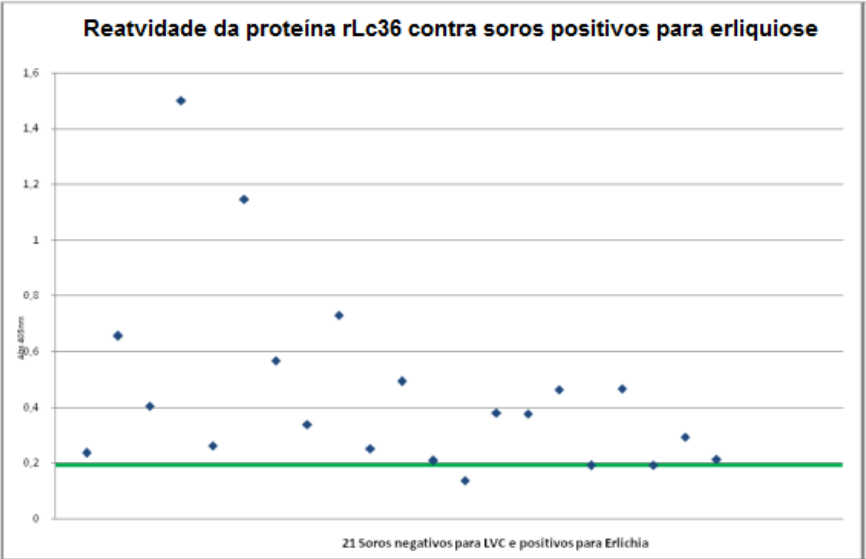
de incubação de 60 minutos, utilizando-se o mesmo protocolo descrito no item 3.18 da metodologia. Os resultados podem ser observados na figura 20.

Figura 20 - Reatividade dos soros negativos para LVC e positivos para *Babesia canis* (Painel A), *Ehrlichia canis* (Painel B), *Toxoplasma gondii* (Painel C) e *Leptospira interrogans* (Painel D), testados na diluição de 1/200, perante a concentração de 1,0µg/mL da proteína rLc36, com 60 minutos de incubação. Painel A: soros positivos para *B. canis* e negativos para LVC testados frente a proteína rLc36 na concentração 1,0µg/mL e diluição dos soros 1/200. Painel B: soros positivos para *E. canis* e negativos para LVC testados frente a proteína rLc36 na concentração 1,0µg/mL e diluição dos soros 1/200. Painel C: soros positivos para *T. gondii* e negativos para LVC testados frente a proteína rLc36 concentração 1,0µg/mL e diluição dos soros 1/200. Painel D: soros positivos para *L. interrogans* e negativos para LVC testados frente a proteína rLc36 concentração 1,0µg/mL e diluição dos soros 1/200. As linhas verdes na horizontal representam os valores do *cut off* para 95,0% de confiança (Frey, Di Canzio e Zurakowski, 1998) e cujo valor corresponde a 0,191.

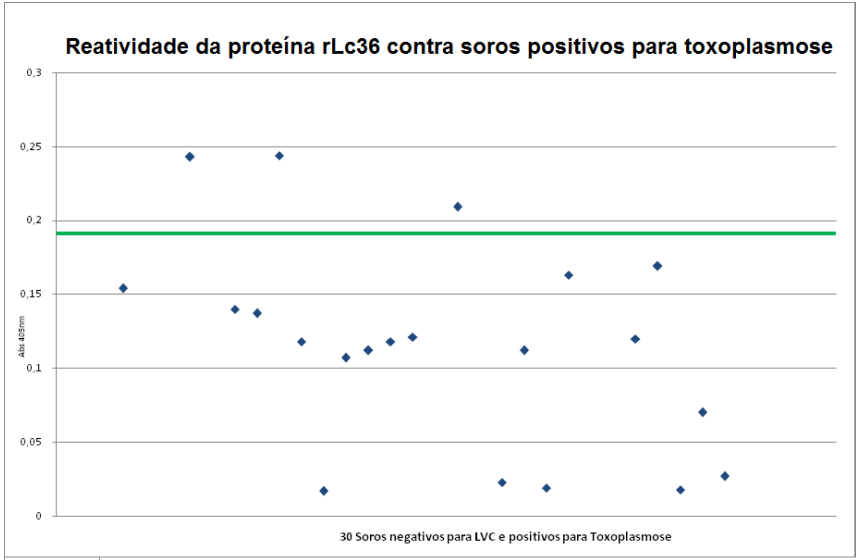
(A)



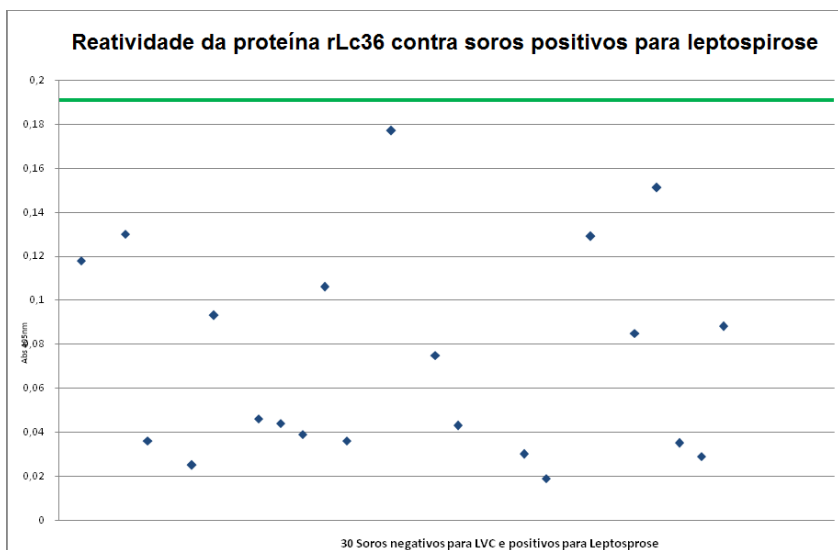
(B)



(C)



(D)



Fonte: Autor.

Nos resultados, é possível observar que nos painéis A e B houve forte reação cruzada com os soros positivos para babesiose e erliquiose. Já em C e D houve baixa ou nenhuma reatividade da proteína frente aos soros positivos para toxoplasmose e leptospirose.

Doenças como leishmaniose visceral, toxoplasmose e leptospirose são importantes antropozoonoses, o que faz com que o controle das mesmas através da correta identificação dos reservatórios animais seja de grande importância.

Sinais clínicos e hematológicos da LVC, babesiose e erliquiose são similares, e testes sorológicos podem ser essenciais para o diagnóstico diferencial. Alguns trabalhos reportaram que anticorpos contra *E. canis* e *B. canis* apresentam reações cruzadas com *Leishmania* sp. em testes sorológicos comuns utilizados para detectar cães com LV (MANCIANTI et al., 1996; GOMES; CORDEIRO, 2004), enquanto o trabalho de Oliveira e colaboradores (2008) reportou que tais reações cruzadas não ocorrem.

De acordo com a busca realizada em diferentes bancos de dados em 2010, a proteína rLc36 apresentava-se específica para a espécie *L. infantum* e, por isso, esperava-se que reações cruzadas não ocorressem em testes com soros de outras parasitoses. No entanto, diante dos resultados obtidos, deve-se considerar que muitos parasitos, por não se constituírem modelos biológicos amplamente estudados pela comunidade científica, apresentam-se pouco representados nos bancos de dados de sequencias. Isso posto, temos que a análise *in silico* aqui realizada não descarta a possibilidade de existência de homólogos em outros organismos que não os tripanossomatídeos. Além disso, considerando o pequeno número de soros testados em ensaios preliminares, para verificar a reprodutibilidade dos resultados, novos testes deverão ser realizados com um número maior de soros.

5. CONCLUSÕES

1. As ferramentas de bioinformática empregadas foram capazes de identificar uma proteína específica de *L. infantum* (rLc36) na ocasião da análise pelos programas Blast realizada no início deste projeto, indicando parâmetros importantes como hidrofobicidade, presença de domínios transmembrana e ausência de similaridade com outros parasitos.
2. A proteína rLc36 foi clonada com sucesso no vetor de expressão pET28a e expressa em bactéria *E. coli* linhagem BL21 (DE3). A proteína apresentou comportamento antigênico, pois foi capaz de diferenciar soros de cães infectados com leishmaniose visceral de soros de cães saudáveis.
3. A proteína rLc36, em associação com a proteína A2, foi analisada quanto ao potencial emprego no desenvolvimento de um teste diagnóstico; como resultado, obteve-se um teste mais sensível que os kits comerciais atualmente utilizados porém, com menor especificidade.
4. Em testes preliminares, a proteína rLc36 foi testada frente a soros positivos para outras parasitoses (babesiose, erliquiose, toxoplasmose e leptospirose) e negativos para LVC, para verificar a ausência ou não de reações cruzadas. Os resultados mostraram baixa ou nenhuma reatividade da proteína em presença de soros positivos para toxoplasmose e leptospirose, e alta reatividade em presença de soros positivos para babesiose e erliquiose. Ensaios adicionais são necessários com maior número de soros para resultados mais acurados.

PERSPECTIVAS

Estudos de reatividade cruzada deverão ser realizados com um painel de soros maior das parasitoses já avaliadas (babesiose, erliquiose, toxoplasmose e leptospirose), além de testes com soros de cães chagásicos e, aqueles vacinados com a vacina Leishmune. Além disso, pelo fato de Lc36 constituir-se uma proteína de função desconhecida em *L. infantum*, estudos de localização celular, superexpressão gênica e padrão de expressão ao longo das diferentes fases de desenvolvimento do parasito (amastigota / promastigota) estão sendo conduzidos pela estudante de mestrado Mayara Lucia Del Cistia do programa de Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia (FCF-UNESP), a qual participou ativamente da realização deste trabalho durante período de iniciação científica (Processo Fapesp número 2011/15508-4).

REFERÊNCIAS

- AKHUNDI, B. et al. Rapid detection of human and canine visceral leishmaniasis: assessment of a latex agglutination test based on the A2 antigen from amastigote forms of *Leishmania infantum*. **Experimental Parasitology**, v. 133, n. 3, p. 307-313, 2013.
- ALENCAR, J. E. **Calazar canino**: contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil. 1959. 342 f. Tese (Livre Docência) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1959.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ANDRADE, S. L. et al. Leishmaniose tegumentar americana em área de ocupação recente na periferia da cidade de Manaus, estado do Amazonas, Brasil - avaliação entomológica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, p. 11-12, 1999.
- ASHFORD, D. A. et al. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 1, p. 53-57, 1998.
- ASLETT, M. et al. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic Acids Research**, 2010. doi:10.1093/nar/gkp851.
- BADARÓ, R. Progress of research in visceral leishmaniasis in the endemic area of Jacobina-Bahia 1934-1989. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 21, p. 159-164, 1988.
- BERGMANN-LEITNER, E. S. et al. Computational and experimental validation of B and T-cell epitopes of the in vivo immune response to a novel malarial antigen. **PLoS One**, v. 8, n. 8, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0071610.
- BHATIA, A. et al. Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 102, n. 2, p. 249-261, 1999.
- BIOEDIT: biological sequence alignment editor for WIN 95/98/NT/2K/XP. 2013. Disponível em: <<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>>. Acesso em: 30 set. 2013.
- BRADFORD, K. et al. Candida peritonitis in dogs: report of 5 cases. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 42, n. 2, p. 227-233, 2013.

BRAGA, M. D. 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. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, p. 419-424, 1998.

CARVALHO, F. A. et al. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 43, n. 4, p. 289-295, 2002.

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

CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Records**, v. 141, n. 21, p. 539-543, 1997.

COELHO, E. A. et al. Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 7, p. 3988-3994, 2003.

CORTES, S. 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. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 1, p. 12-17, 2004.

COSTA, R. T. da et al. Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens K39 and K26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 6, p. 678-682, 2003.

COSTA, M. M. et al. Improved canine and human visceral leishmaniasis immunodiagnosis using combinations of synthetic peptides in enzyme-linked immunosorbent assay. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 6, n. 5, 2012. doi:10.1371/journal.pntd.0001622.

COURTENAY, O. et al. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 9, p. 1314-1320, 2002.

CRUZ, A. M. da; AZEREDO-COUTINHO, K. B. **Medicina tropical: abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias. Leishmaniose tegumentar Americana**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2001. 610 p.

DANTAS-TORRES, F. Final comments on an interesting taxonomic dilemma: *Leishmania infantum* versus *Leishmania infantum chagasi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 8, p. 929-930, 2006.

EXPASY BIOINFORMATICS RESOURCE PORTAL. **Computer pl/Mw**. Disponível em: <<http://web.expasy.org/tagident/>>. Acesso em: 30 set. 2013.

FARIA, A. R. et al. High-throughput analysis of synthetic peptides for the immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 9, 2011. doi:10.1371/journal.pndt.0001310

FEITOSA, M. M. D. Avaliação clínica de animais naturalmente infectados. FORUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 1., 2006, Jaboticabal. **Anais ...** Jaboticabal: [s.n.] 2006. p. 9-13.

FERNANDES, A. P. et al. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, v. 26, n. 46, p. 5888-5895, 2008.

FONSECA, A. M. et al. Evaluation of three recombinant *Leishmania infantum* antigens in human and canine visceral leishmaniasis diagnosis. **Acta Tropica**, v. 137, p. 25-30, 2014.

FREY, A. et al. A statistically defined endpoint titer determination method for Immunoassays. **Journal of Immunological Methods**, v. 221, n. 1/2, p. 35-41, 1998.

GOMES, A. P. S. et al. Reação cruzada no diagnóstico sorológico de leishmaniose canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 238, 2004. Suplemento 1.

GREVELINK, S. A. et al. Leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 34, n. 2, p. 257-272, 1996.

IEDB ANALYSIS RESOURCE. **Antibody epitope prediction**. Disponível em: <<http://tools.immuneepitope.org/bcell/>>. Acesso em: 30 set. 2013.

ISABEL, T. F. **Leishmaniose visceral canina: clonagem e expressão das proteínas Lc24 e Lc36 de *L. chagasi* com potencial aplicação no diagnóstico e desenvolvimento de vacina**. 2010. 108 f. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

IVES, A. et al. Leishmania RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. **Science**, v. 331, n. 6018, p. 775-778, 2011.

JENSEN, A. T. R. 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. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 2, p. 157-160, 1999.

KRAUSPENHAR, C. et al. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. Santa Maria. **Ciência Rural**, v. 37, p. 907-910, 2007.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T-4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETER, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.). **The leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press, 1987. v. 1, p. 1-120.

LAINSON, R. et al. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p.811-827, 2005.

LARSEN, J. E. P. et al. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome Research**, 2006. doi:10.1186/1745-7580-2-2

LEVINE, N. D. et al. A newly revised classification of the protozoa. **Journal of Protozoology**, v. 27, n. 1, p. 37-58, 1980.

LINDOSO, J. A. L.; GOTO, H. Leishmaniose visceral: situação atual e perspectivas futuras. **Boletim Epidemiológico Paulista**, n. 26, p. 7-11, 2006.

LIRA, R. A. et al. Canine visceral leishmaniosis: a comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1/2, p. 11-16, 2006.

LUKES, J. et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 22, p. 9375-9380, 2007.

MACHADO, R. Z. et al. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 71, n. 1, p. 17-26, 1997.

MANCIANTI, F.; PEDONESE, F.; POLI, A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay. **Veterinary Parasitology**, v. 65, n. 1, p. 1-9, 1996.

MANCIANTI, F. et al. Studies on canine leishmaniasis control: evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 4, p. 566-567, 1988.

MARZOCHI, M. C. A. et al. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. **Parasitology Today**, v. 10, n. 1, p. 37-40, 1994.

MENDES, T. A. O. et al. Identification of strain-specific B-cell epitopes in *Trypanosoma cruzi* using genome-scale epitope prediction and high-throughput immunoscreening with peptide arrays. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 10, 2013. doi:10.1371/journal.pntd.0002524.

MOLINA, R. et al. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 4, p. 491-493, 1994.

MONTEIRO, E. M. et al. Visceral leishmaniasis: a study on phlebotomine sand flies and canine infection in Montes Claros, State of Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 147-152, 2005.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 30 set. 2013.

OLIVEIRA, F. S. 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. **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 3/4, p. 219-227, 2005.

OTRANTO, D. P. et al. Rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of canine leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 2769-2770, 2004.

PATTABHI, S. et al. Design, development and evaluation of rK-28-based point-of-care tests for improving rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, p. 1-11, 2010.

PEACOCK, C. S. et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature Genetics**, v. 39, n. 7, p. 839-847, 2007.

PETERSEN, C. A.; BARR, S. C. Canine leishmaniasis in North America: emerging or newly recognized? **Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice**, v. 39, n. 6, p. 1065-1074, 2009.

PORROZZI, R. et al. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 5, p. 544-548, 2007.

PRETTE, N. **Avaliação da patogenicidade de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, sobre os diferentes estádios de *Rhipicephalus sanguineus* no cão e no ambiente**. 2007. 87 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

RAJ, V. S. et al. Serodiagnosis of leishmaniasis with recombinant ORFF antigen. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 3, p. 482-487, 1999.

REED, S. G. Diagnosis of leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v. 14, n. 5, p. 471-478, 1996.

SAKIB, M. S. et al. Prediction of epitope-based peptides for the utility of vaccine development from fusion and glycoprotein of nipah virus using in silico approach. **Advances in Bioinformatics**, 2014. doi: 10.1155/2014/402492.

SALOTRA, P. 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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 849-854, 2001.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. v. 3.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde. Comitê de Leishmaniose Visceral Americana. Classificação epidemiológica dos municípios segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo, atualizado em novembro de 2011. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 8, n. 96, p. 32-36, 2011. Disponível em: <<http://www.saude.sp.gov.br/resources/sucen/programas/leishmanioses-tegumentar-e-americana/bepa9611.pdf>>. Acesso em: 20 jul. 2013.

SARAVIA, N. G. et al. The relationship of *Leishmania brasiliensis* subspecies and immune response to disease expression in new world leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 159, n. 4, p. 725-735, 1989.

SILVA, E. S. 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 Biology and Disease**, v. 4, 2005. doi:10.1186/1475-9292-4-4.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 49, p. 55-60, 2003.

SIVAKUMAR, R. et al. Cloning, expression, and purification of a novel recombinant antigen from *Leishmania donovani*. **Protein Expression and Purification**, v. 46, n. 1, p. 156-165, 2006.

SLAPPENDEL, R. J.; GREENE, C. E. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E.; SAUNDERS, W. B. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W. B. SAUNDERS, 1990, p. 769-777.

SOUSA-GOMES, M. L. et al. Coinfecção *Leishmania*-HIV no Brasil: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 4, p. 519-526, 2011.

SUNDAR, S. Diagnosis of kala-azar: an important stride. **Journal of the Association of Physicians of India**, v. 51, p. 759-761, 2003.

TRONCARELLI, M. Z. et al. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, n. 164, n. 2/4, p. 118-123, 2009.

VAISH, M. et al. Evaluation of rK28 antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis in India. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 1, p. 81-85, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Essential leishmaniasis**. 2013. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps>. Acesso em: 20 jul. 2013.

CAPÍTULO 2



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
AGÊNCIA UNESP DE INOVAÇÃO



Ofício nº 080/2014 AUIN

São Paulo, 27 de junho de 2014.

DECLARAÇÃO DE SUBMISSÃO DE COMUNICAÇÃO DE INVENÇÃO

1. A Agência Unesp de Inovação – AUIN é o órgão desta Universidade responsável por sua política de inovação, pela proteção à propriedade industrial gerada por seus pesquisadores e pela transferência do conhecimento tecnológico para o setor produtivo.
2. Nesse sentido, declaramos que foi submetida a este órgão a Comunicação de Invenção 14CI038, na data de 13.06.2014, por parte da doutoranda Camila Tita Nogueira, orientanda da Profa. Dra. Marcia Aparecida Silva Graminha, lotada junto ao Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do câmpus da Unesp em Araraquara. A Comunicação de Invenção é pertinente a um novo antígeno para diagnóstico da leishmaniose visceral canina.
3. A Comunicação de Invenção encontra-se atualmente em processamento junto a esta Agência para busca de anterioridades e avaliação dos requisitos de patenteabilidade, sendo a novidade um dos requisitos legais, conforme previsto na Lei de Propriedade Industrial (Lei nº 9.279/96).
4. Isso posto, e sendo a novidade um dos requisitos legais, conforme previsto na Lei de Propriedade Industrial, requer-se dos órgãos aos quais a tecnologia consubstanciada na Comunicação de Invenção supra será submetida a verificação de medidas cabíveis para a preservação da novidade até seu efetivo depósito junto ao INPI.

Fabíola de Moraes Spiandorello
Gerente de Propriedade Intelectual



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
AGÊNCIA UNESP DE INOVAÇÃO



Processo de Patenteamento	Comunicação de Invenção 14CI038	Form. 1.5
Pesquisador: Márcia Graminha		
Unidade: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara		
Departamento: Análises Clínicas		
Tecnologia a ser avaliada: Lc36, um novo antígeno para diagnóstico da leishmaniose visceral canina		

Palavras-chave

Listar as palavras-chave, fornecidas pelo Pesquisador ou identificadas pelo analista, em português e inglês.

Aspectos técnicos da tecnologia		Palavras-chave	
		POR	ENG
Problema		leishmania	leishmania
		imuno	immuno
Solução	O que é (estrutura)	rLc36	rLc36
		antígeno	antigen
	O que faz (função)	-	-
		-	-

Classificação Internacional de Patentes (IPC)

Determinar, com base em patentes relacionadas e em manual de classificação, seção, classe, subclasse e grupo principal aos quais pertence o invento.

A61K 39/008 – leishmania antigens
G01N 33/53 – materials for immunoassay

Busca de anterioridades

Buscar nas bases de patentes do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), do Escritório de Patentes Europeu (esp@cenet - EPO), e Derwent Innovation Index, utilizando-se das palavras-chave e da Classificação Internacional de Patentes, tecnologias já patenteadas que formam o estado da técnica.

#	Base	Estratégia de busca	Resultados obtidos / retidos
1	EPO	ipc: A61K39/008 AND G01N33/53 AND lc36	0 / 0
2	EPO	ipc: A61K39/008 AND G01N33/53	19 / 19

Resultados obtidos de bases de patente

Obter o número do processo, título, resumo (se estiver disponível) e número de Classificação Internacional de Patentes das referências provenientes da literatura patentária.

D1 a D19

Disponíveis em:

http://worldwide.espacenet.com/searchResults?compact=false&ST=advanced&locale=en_EP&C=A61K39%2F008+AND+G01N33%2F53&DB=EPDOC

Resultados obtidos de outras fontes

Listar os resultados obtidos em fontes de literatura não-patentária, como [illumin8](#), [Plataforma Lattes](#), [Google Scholar](#), etc.

D20

Resumo de Trabalho.

"BUSCA DE ANTÍGENOS PARA DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA".
 Lima, E.C.; Isabel, T. F.; Costa, P.I.; Graminha, M.A.S.

Disponível em:

<https://uspdigital.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalhoVisualizarResumo?numeroInscricaoTrabalho=4424&numeroEdicao=18>

D21

Qualificação de Doutorado

Graminha, M.A.S.; SILVA, F. H.; MACHADO, R. Z. "Busca de antígenos para leishmaniose visceral canina: caracterização das proteínas rLc06.14 e rLc36". 2013. Exame de qualificação (Doutorando em Biotecnologia) - Instituto de Química - UNESP.

D22

Resumo publicado em anais de congressos

Nogueira, C. T. ; Lima, E. C. ; CISTIA, M. L. ; FERREIRA, H. ; CICARELI, R.M.B. ; MACHADO, R. Z. ; GRAMINHA, M A S . "Study of rLc36 gene as new antigen for canine visceral leishmaniasis serodiagnosis". In: British Society for parasitology/ Spring meeting and trypanosomiasis & leishmaniasis seminar, 2012, Glasgow. British Society for parasitology/ Spring meeting and trypanosomiasis & leishmaniasis seminar, 2012. p. 211-212.

D23

Resumo publicado em anais de congressos

CISTIA, M. L. ; Nogueira, C. T. ; FERREIRA, H. ; MACHADO, R. Z. ; COLEPICOLA NETO, P. ; GRAMINHA, M A S . "Expression, purification and immunogenic characterization of rLc36 as new antigen for canine visceral leishmaniasis". In: 43 Reunião Anual da SBBQ, 2014, Foz do Iguaçu. 43 Reunião Anual da SBBQ, 2014.

Parecer

Trata-se de solicitação de avaliação de patenteabilidade de tecnologia intitulada "Lc36, um novo antígeno para diagnóstico da leishmaniose visceral canina", desenvolvida pela Profa. Dra. Márcia Graminha, lotada junto ao Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do câmpus da Unesp em Araraquara.

Avaliou-se a tecnologia frente aos requisitos legais de patenteabilidade, quais sejam: novidade, atividade inventiva, aplicação industrial e não compreensão nas proibições legais, a partir das informações disponibilizadas na Comunicação de Invenção 14C1038.

A tecnologia compreende o processo de diagnóstico de leishmaniose canina por imunoenensaio baseado na detecção do antígeno rLc36. Os imunoenensaio baseiam-se na detecção do antígeno no soro de cães infectados e visam suprir a demanda de testes com maior sensibilidade e especificidade para esta finalidade. A tecnologia apresenta o critério de aplicação industrial, por estar apta a ser produzida ou utilizada no setor industrial, no caso, na fabricação de kit diagnóstico para leishmania.

Quanto aos critérios de novidade e atividade inventiva, foi realizada busca de anterioridades e foram encontrados vinte documentos relevantes. D1 a D19 são documentos que descrevem inúmeros imunoenensaio para detecção de várias formas de leishmania. No entanto, nenhum dos documentos descreve a utilização do antígeno rLc36 para tal. Os documentos D20, D21 e D22 compreendem divulgações do trabalho do próprio grupo de pesquisa a respeito do possível uso do antígeno rLc36 como base para detecção de leishmania. Entende-se que o conteúdo destes

documentos não é suficiente para anular a novidade da proposta. No entanto, o documento D23, de 2014, descreve a expressão, purificação e caracterização imunogênica do antígeno rLc36 e pode prejudicar a novidade do invento.

Quanto às proibições legais, a tecnologia não se enquadra em nenhuma delas.

Pelo exposto, constata-se que o invento atende a todos os critérios legais de patenteabilidade, quais sejam: novidade, atividade inventiva, aplicação industrial e não compreensão nas proibições legais. Assim, entende-se que a tecnologia deverá prosseguir aos procedimentos de depósito do pedido de patente. Cientes de que o documento D23 pode prejudicar a novidade do invento, o depósito do pedido de patente deve ser realizado em até um ano após a data de divulgação deste documento, utilizando-se do Período de Graça.

Recomendações:

Os aspectos passíveis de proteção da tecnologia são:

- Processo: de diagnóstico de leishmania pela detecção do antígeno rLc36
- Processo: de realização de imunoensaio (ELISA, imunocromatografia, imunofluorescência, dot blot, western blot, biosensor) baseado no antígeno rLc36 para detecção de leishmania
- Produto: Kit diagnóstico de leishmania baseado no processo descrito acima
- Uso: do kit para identificação de leishmania em soro canino

São Paulo, 18 de julho de 2014.



Renan Padron Almeida
Analista de Tecnologia



Fabíola M. Spiandorello
Gerente de Propriedade Intelectual

Responsável pela documentação: Spiandorello, Fabíola
Atualização: Spiandorello, Fabíola

Versão 1.6
Data: 01.02.2013

APÊNDICE

APÊNDICE A - Sequências nucleotídica e protéica do gene Lc36

Sequência nucleotídica completa do gene Lc36 (LinJ.36.4190). A parte grifada corresponde ao fragmento selecionado para clonagem e expressão da proteína rLc36.

```

ATGGGGCGAA TCGACTCCTC TTGTGTCGCT GCCACGGTGA CGCCTAGCAA GGTGCGCGCA
TCGTCGTCTT GTCCCGGCAC GGCACAAAGC ACTGGCAAGA TAGACGAGCC TGCTTCTCGC
GCCGCTGCC CGCAGGGCCG GGCACAGCGA TGTGGCCGAG CGCGACCCGC CCAGATGCAC
AACAGCCTCA GTGCGGGGAT GTGTGATAAC CAACAGCAGC ACGCCGAGG CGTTTGAAG
TTGATTGCAG GGCCGCAGAG CGCCTCCACG ACTCCGCCGC CGCTCGTGAT GGGTGACGGC
ACAGGCGGCG AGGATCATGC GCAGGCTGCC CACACCGGCG TCCGGTGGAC TAAGCACGCG
TGGGAAAAGG GCAACGACTG CCCTGCGGGT AGCGCGTACG GGTCTTTTGT AGGCGCGCCG
CTGCGCAGGC TGCCGCCAAC GCCTCCGTTT CCTGGTGTGC GTCTTCCCGC CTGGTGTGCG
TCCGCGTCGG CGACGGCGTA TCCGCTCTCC GAGGATGGCC TCACAAACGA GCTGCTGGAC
TTCTTCTATT ATCTGCAGTT GACCTCCCAT GAGGAAGCGG CACGGGAGCG GCTGCTTGGC
TACGTGCAGG CGTGCGTGGC GAAGTTGTGG GGCCCTGTA AACCAGGGAG CGAAGCCGAG
GGAACAGCAC AGGTGATGCT GTACGGCAGC TACGCTCTAG GGCTTTCTCT TCCAAGCAGC
GACATTGATC TTGCCCTGAC TTTCCCGGCC GAGGAGCAGG TGGACGTCGC GACCATTGCA
GTTGAGGAAA GGAGTGGGGA TCGCGCTCTC CTGGCGCCGG CGGTCTCGAA GAAACGCCAG
GCGCTGCACC TTGAGCGGCT CCACGATCTT GCCGAGCAGC TGCGGAATC TGCACGTTT
CCCGAGTTGG AGGTAGAGGT GTATGATCAG TGCCGTGTGC CGCGCATTCA TCTACGAGAC
AGGACTTGTG GTGGCGTGTG GTGTGACATC AACAGCTCCT TCGCCTCAGC ACGCATCGCC
CGCATCGTGG CGCGGCAGCG GCTATGGCTA CAGGACTCCC CGCTCGCGCG GTTCTCTGTG
CGCGTCACCA AGGCAGCCGT GAAGCAGTGG GGCCTCCACG AAGTGTTCTG GGGCGGCGTC
GCCTCCACTG CGCTGTACTG CCTAGTGCTC CGCTTCCTCG CCCAGATGGA ACAGCTTTGC
CGACACGCGC AGGTGGAGGA GAATTTGTCT CCACCGCGCT ACGCGGAGGC CGCCGCCGCG
CATGTCGCAA CGCAGCTCTC TTCGTTGGCT TGTTCTGTCAC CGTTGTCTTC ACCACAACCTC
TCCATGCCAC ACCCAGCCAA CGAGTCTTTC GCAGCGTTTA CCCCAGTTCC AGCCGGCACG
GCTTCCACTG CTCGCGGCCT CAACAGGCTA AGCGCGGCGG CAGCCGTTCC TTCATATGTA
CCCAGCTGGG TTGTGAATAG CAGGAAGCAC GACTTGAACA AGTCGTCGTC CTTGTGCGAT
ATGGACAAGA ACAGCGCGCT GTGCCCTGTC AGTTTGACCG CTTGCTCCCT TTCCGATTGG
AGCAGGATGA GCAGCAGTG CGACGAGGAT AGGGAGGCGG ACGACGAGGT GGATGGCTAC
ACGCAAGCGG GTCTCACGCG CACCTCCGGC GCCACCACCA CTGCGACTAC GCCGATCTCT
CGCACCGCGG CGAGCACACC GATGCCGGCT GCAAGCGAAG CGCATGAGGG AGGCACAGCG
ACCGCATCGA GTGCCTTGGC ACCACCAAGT AGCGTCAATT CTGCTGCGCT TCGCGAGGGC
GTGTTTCCCA GTGCGGATGG ACTTACTCAG ATCGCGCGAT CACGGTATGG CGCGTCGCCA
GCGCGTCTAC TGCTGAAGCT GTGGAAGTTT CTTTCTGCCG ACGCTTTTGC GAACGGGTAT
CAGGTAGCAG ATGCCTTTGG AGATGACGCG GTGTGGTGGC ACTGCGGCGA GGCGGGCGAC
TCGGCCGCGC TACCAAAGCA GCTTCCGCTC ATGGCGTCGC TTGAAGTGGC CACGATTGCG
GGCATGAGCA GCGCCGACCT CTCCGCTGCA TCTTTTCGGC TTCCTGAGCT ACTGGCACTC
TTTCGCCACT CGAGCACGTC ACTGGAGAGC ATGCTCCGGT ATCAGCGCTA CCCGCGGCGC
ACCGTGCCAA CGATGCTCTC TACCATCTTT GTCGACCCTC GGCTGCCGAC TAACTCTTGA

```

Sequência proteica completa do Lc36 (LinJ.36.0630)

```

MRRCRMQEWHT HAAAGARQA HRGFHRMPRH DYLTDFGTHH VAMVDELSRC VVSASDKSLI
ECFATSVSET PLSSLTTSCS AVHSNPPSTH FDLQAPLCLS EGSLARASVV DLGGRSSRSF
PQGMSSCSAT SSSCKARRFQ SYSLHPCNCG HAHRAKLVLF AAQADILLSC STKDRHMTAY
HIALGVEVGR LVGHDDLILG GAVSPDDTLV ATTSCDCTAI LWDLPSCQQR RSLTHPQFVH
ACRFSSSGTE LATACADGLC RIWTWSASAI VNILVPSDTG FNGALSSLAY SLGDKVLLAG
GSARNVYVWD CESFSPPAAV FRQHRSVLS VDASRAHQDI VMTAEEATLL VWNCATLEVL
QRIDVSFCDA QSPWRRGGAL TASETSVKRT TFPHELYWTA ARLMDSRFGL VLVAATSDKR
LYLFDVFATY KRRSADDIQT QLTGTAAQVQ PSALSEMLSL SLRSPVSSMD SGPPNRVVF
DSCGNRYILE LN*

```

**APÊNDICE B - Valores de absorbância das análises de reatividade da proteína
rLc36**

Tabela 11 – Absorbância dos soros positivos e negativos em diluição de 1/200 para concentração de 1,0µg/mL de antígeno rL36, com 60 minutos de incubação para cálculo de sensibilidade e especificidade.

Soros	Absorbância*	Soros	Absorbância*
P518	1,435	N16	0,161
P520	0,243	N22	0,289
P501	0,066	N1	0,501
P503	0,106	N2	0,081
P504	0,146	N3	0,268
P508	0,476	N5	0,146
P509	0,268	N7	0,139
P510	2,78	N8	-0,027
P511	0,198	N9	0,271
P512	0,251	N10	0,108
P513	0,175	N17	0,147
P514	0,219	N18	0,294
P515	0,335	N19	0,105
P516	-0,026	N21	0,17
P517	0,126	N23	0,114
P71	0,544	N26	0,048
P519	0,259	N27	0,26
P76	0,624	N29	0,156
P521	0,142	N30	0,102
P522	0,187	N32	0,207
P82	1,273	N33	-0,02
P135	0,186	N34	0,899
BR1	0,117	-	-
BR2	0,138	-	-
Cut off (95% de confiança)	0,185	-	-

*Absorbância em 405nm subtraída da média dos brancos. Soros em azul são negativos (N) para leishmaniose visceral canina, enquanto os soros em vermelho são positivos (P) para a enfermidade.

Fonte: Autor.

Tabela 12 – Absorbância dos soros positivos (n=74) e negativos (n=50) em diluição de 1/200 para concentração de 1,0µg/mL da proteína rL36, com 60 minutos de incubação para cálculo de sensibilidade e especificidade.

Soros Positivos	Absorbância*	Soros Negativos	Absorbância*
Pos1	0,396	Neg1	0,178
Pos2	0,613	Neg2	0,375
Pos3	0,849	Neg3	0,328
Pos4	0,368	Neg4	0,362
Pos5	0,347	Neg5	0,26
Pos6	0,334	Neg6	0,199
Pos7	0,327	Neg7	0,193
Pos8	0,438	Neg8	0,175
Pos9	0,863	Neg9	0,181
Pos10	0,45	Neg10	0,229
Pos11	0,38	Neg11	0,358
Pos12	0,479	Neg12	0,374
Pos13	0,433	Neg13	0,164
Pos14	0,438	Neg14	0,354
Pos15	0,383	Neg15	0,205
Pos16	0,738	Neg16	0,263
Pos17	0,485	Neg17	0,218
Pos18	0,565	Neg18	0,186
Pos19	0,659	Neg19	0,176
Pos20	0,584	Neg20	0,166
Pos21	1,012	Neg21	0,262
Pos22	0,514	Neg22	0,307
Pos23	0,401	Neg23	0,458
Pos24	0,326	Neg24	0,197
Pos25	0,441	Neg25	0,252
Pos26	0,976	Neg26	0,232
Pos27	0,581	Neg27	0,563
Pos28	0,361	Neg28	0,338
Pos29	0,382	Neg29	0,291
Pos30	0,359	Neg30	0,278
Pos31	0,566	Neg31	0,431
Pos32	0,81	Neg32	0,392
Pos33	0,381	Neg33	0,513
Pos34	0,392	Neg34	0,131
Pos35	0,534	Neg35	0,23
Pos36	0,65	Neg36	0,388
Pos37	0,665	Neg37	0,478
Pos38	0,489	Neg38	0,2
Pos39	0,936	Neg39	0,203
Pos40	0,365	Neg40	0,183
Pos41	0,329	Neg41	0,155
Pos42	0,407	Neg42	0,396
Pos43	0,383	Neg43	0,282
Pos44	0,33	Neg44	0,226
Pos45	0,359	Neg45	0,257
Pos46	3,136	Neg46	0,27
Pos47	0,62	Neg47	0,369
Pos48	0,401	Neg48	0,187
Pos49	0,346	Neg49	0,158
Pos50	0,423	Neg50	0,265

Pos51	0,594	Neg51	0,225
Pos52	0,435	Neg52	0,276
Pos53	0,334	Neg53	0,387
Pos54	0,627	Neg54	0,413
Pos55	0,765	Neg55	0,424
Pos56	0,354	Neg56	0,27
Pos57	1,093	Neg57	0,186
Pos58	0,483	Neg58	0,294
Pos59	0,334	Neg59	0,169
Pos60	0,347	Neg60	0,149
Pos61	0,344		
Pos62	0,788		
Pos63	0,627		
Pos64	0,98		
Pos65	0,366		
Pos66	0,345		
Pos67	0,507		
Pos68	0,438		
Pos69	0,339		
Pos70	0,395		
BR1	0,117	-	-
BR2	0,138	-	-
Cut off (95% de confiança)	0,185	-	-

*Absorbância em 405nm subtraída da média dos brancos. Soros em azul são negativos (N) para leishmaniose visceral canina, enquanto os soros em vermelho são positivos (P) para a enfermidade.

Fonte: Autor