

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Parasitologia

**Identificação de novos antígenos de espécies do gênero
Leishmania com potencial uso no diagnóstico sorológico da
leishmaniose visceral**

Ana Luiza Teixeira Silva

Belo Horizonte - MG

Março – 2017

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Parasitologia

**Identificação de novos antígenos de espécies do gênero
Leishmania com potencial uso no diagnóstico sorológico da
leishmaniose visceral**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas

Ana Luiza T. Silva

Orientadora: Prof. Dra. Lilian Lacerda Bueno – Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos, UFMG

Coorientadora: Dra. Mariana Santos Cardoso – Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos, UFMG

Belo Horizonte - MG
Março – 2017

Colaboradores:

Dr. Ricardo Toshio Fujiwara (UFMG)

Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu (UFMG)

Me. João Luís Reis Cunha (UFMG/MG)

Suporte Financeiro:

CAPES: Bolsa de Doutorado

FAPEMIG

CNPq

*“Tudo tem seu tempo determinado, e há tempo
para todo propósito debaixo do céu.”*

Eclesiastes 3:1

AGRADECIMENTOS

A Deus, toda honra e toda glória, por ter me conduzido até aqui. Por ter me amparado e jamais me deixado desistir nos momentos de desânimo.

Aos meus pais, Ana e Laércio, e meu irmão, Wágner, que nunca mediram esforços. Por acreditaram e confiaram em mim; pelo apoio incondicional, amor e carinho.

Aos meus orientadores, Lilian e Ricardo, porque fica impossível separá-los nesta missão. Primeiro por abrirem as portas do laboratório para mim. Pela confiança, oportunidade e por acreditarem que eu era capaz. Pelo incentivo, orientação e disponibilidade. E mais que isto, pela amizade e carinho construídos nos últimos anos. Em segundo por terem indicado a Mari como minha coorientadora. Ah, Mari! Como eu tenho que agradecer-lá pela enorme paciência e dedicação. A convivência com vocês me proporcionou conhecimento e aprendizado científico, profissional e pessoal que levarei sempre comigo.

À professora Daniella Bartholomeu não só pela colaboração, mas por me receber tão bem no LIGP e pela agradável convivência.

Ao João Luis, pela colaboração e disponibilidade a todo o momento.

A Michele, pela prontidão para resolver os problemas a qualquer momento e ainda me ajudar na bancada.

Aos amigos do LIGP, por terem me recebido de forma tão amistosa. Pelo agradável convívio, carinho e amizade. Foi maravilhoso conviver com vocês. Em especial à Ana Clara, Ana Leão e Denise pela convivência prazerosa.

Ao Pedro Gazzinelli que de colega de laboratório se tornou um grande amigo que eu levei para a vida. Que mesmo na distância sempre teve um ombro amigo e paciente. Pelo incentivo, conselhos e boas risadas.

À Patrícia Silveira, pela amizade, momentos de descontração, disponibilidade e pelas sugestões.

Christina Monerat, pelos ensinamentos e ajuda.

À Fernanda e Natália pela acolhida, pelo apoio nos momentos difíceis e inquietantes decisões. Por terem me recebido, e me feito sentir, como irmã. Minhas *soul sisters*!

Aos amigos das células por compartilharem comigo um pouco do sobrenatural de Deus nos momentos mais desafiadores.

Aos meus, incontáveis, amigos, seria impossível citar cada um. Pela torcida, incentivo, por fazerem questão da minha amizade e por saber que posso sempre contar com vocês.

Aos amigos do Departamento de Parasitologia da UFMG, em especial aos Pepinos, pelas agradáveis trocas e conversas que nossa amizade se prolongue por muitos anos. Em especial a Thaisa por quem tenho um carinho especial.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, pela oportunidade para o desenvolvimento deste trabalho.

A Capes pela concessão da bolsa de Doutorado.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente na execução e conclusão desta etapa, muito obrigado.

SUMÁRIO

6LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELA	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1.INTRODUÇÃO	14
1.1 Leishmaniose.....	14
1.2 Ciclo	16
1.3 Manifestações clínicas e resposta imune.....	18
1.4 Controle e tratamento da LV	21
1.5 Diagnóstico da leishmaniose	23
1.6 Proteínas de <i>Leishmania</i> spp. como potenciais alvos para o diagnóstico das leishmanioses	28
1.6.1 ATP difosfohidrolase	30
1.6.2 Proteína de ligação ao GTP	31
1.6.3 Proteína tirosina fosfatase	33
2.JUSTIFICATIVA.....	36
3.OBJETIVO GERAL	38
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4.MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Parasitos	39
4.2 Ferramentas de bioinformática para seleção das proteínas de <i>Leishmania</i>	39
4.3 Extração de DNA de parasitos	40
4.4 Desenho de <i>primers</i> para a amplificação dos genes utilizados na expressão heteróloga ..	40
4.5 Amplificação por PCR e purificação dos amplicons.....	41
4.6 Ligação dos amplicons ao vetor de clonagem pGEM-T Easy	41
4.7 Transformação de bactérias por eletroporação.....	42
4.8 Obtenção dos plasmídeos recombinantes.....	43
4.9 Digestão dos vetores de clonagem e expressão com enzimas de restrição	43
4.10 Clonagem dos genes codificadores das proteínas selecionadas no vetor pET28a-TEV .	43
4.11 Sequenciamento e análise das sequências clonadas no vetor pET28a-TEV	44
4.12 Expressão Heteróloga.....	44
4.12.1 Indução da expressão das proteínas recombinantes	44
4.12.2 Lise das bactérias e teste de solubilidade das proteínas recombinantes	44
4.12.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)	45
4.12.4 Purificação de proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade.....	45
4.12.5 Ensaio de dosagem das proteínas recombinantes	46
4.13 Peptídeos	46

4.13.1 Seleção dos peptídeos.....	46
4.14 Preparação do antígeno bruto.....	48
4.15 Ensaio de ELISA no diagnóstico da leishmaniose visceral.....	49
4.16 Análise estatística dos dados.....	50
4.16.1 Avaliação do desempenho do teste diagnóstico.....	50
5.RESULTADOS.....	52
5.1 Análise das proteínas de <i>Leishmania</i> homólogas a <i>Homo sapiens</i>	52
5.2 Desenho de <i>primers</i> e amplificação dos genes de <i>Leishmania</i> para clonagem no vetor de expressão.....	53
5.3 Digestão, clonagem e subclonagem dos genes de <i>Leishmania</i> para a expressão heteróloga.....	54
5.4 Sequenciamento dos genes clonados em pET28a-TEV.....	57
5.5 Expressão heteróloga em bactéria das proteínas recombinantes.....	68
5.6 Purificação das proteínas recombinantes.....	70
5.7 ELISA das proteínas recombinantes.....	72
5.7.1 Avaliação das proteínas recombinantes como antígeno no ELISA para LVC.....	72
5.7.2 Avaliação as proteínas recombinantes como antígeno no ELISA para LVH.....	76
5.8 Seleção de peptídeos antigênicos das proteínas recombinantes.....	82
5.8.1 <i>Immunoblotting</i>	93
6.DISSCUSSÃO.....	95
7.CONCLUSÃO.....	109
8.PERSPECTIVAS.....	110
9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
10.ANEXOS.....	131
Anexo I - Purificação por cromatografia de afinidade das proteínas recombinantes.....	131
Anexo II: Patentes geradas no projeto depositadas pelo CTIT junto ao INPI.....	133
Anexo III: Patentes geradas em trabalhos de colaboração durante o doutorado.....	134
Anexo IV: Artigos publicados durante o projeto de doutorado em colaborações.....	137

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema do ciclo de vida do gênero <i>Leishmania</i> nos seus hospedeiros vertebrados e invertebrados.	17
Figura 2: Mapa do vetor pGEM-T Easy (Promega).....	42
Figura 3: Pipeline para identificação de peptídeos <i>Leishmania</i> específicos.	47
Figura 4: Predição de epítomos lineares de célula B e de desordem estrutural das proteínas:	53
Figura 5: Análise eletroforética em gel de agarose 0,7% dos produtos de amplificação dos genes candidatos à expressão heteróloga.....	54
Figura 6: Análise eletroforética em gel de agarose 1,0% dos produtos amplificados a partir da PCR de colônia, utilizando os primers M13 Fwd e Rev para confirmação da clonagem dos amplicons no vetor pGEM-T Easy.....	55
Figura 7: Digestão com enzimas de restrição dos plasmídeos contendo os genes de interesse para subclonagem no vetor de expressão pET-TEV.	56
Figura 8: Análise eletroforética em gel de agarose 1,0% dos produtos amplificados a partir da PCR de colônia, utilizando os primers T7 Fwd e Rev para confirmação da clonagem dos amplicons no vetor pET28a-TEV.....	57
Figura 9: Alinhamentos gerados no programa BLASTn entre as sequências nucleotídicas obtidas do sequenciamento dos insertos presentes no plasmídeo pET28a-TEV e as respectivas sequências depositadas no banco de dados do NCBI, relativas às proteínas: ATP difosfohidrolase de <i>L. infantum</i> (EctoLi), proteína de ligação ao GTP de <i>L. infantum</i> (MyxoLi) e de <i>L. mexicana</i> (MyxoLm), completas e truncadas, e a proteína tirosina fosfatase de <i>L. braziliensis</i> (TyroLb).....	68
Figura 10: SDS-PAGE das expressões em bactérias das proteínas recombinantes.....	69
Figura 11: SDS-PAGE do teste de solubilidade das proteínas recombinantes. As bactérias que expressaram as proteínas recombinantes foram lisadas, separadas em fração solúvel e insolúvel e submetidas ao SDS-PAGE.	70
Figura 12: SDS-PAGE das frações purificadas por cromatografia de afinidade das proteínas recombinantes.	71
Figura 13: Gráfico da absorvância dos soros caninos do grupo infectado com <i>L. infantum</i> (LVC) e dos grupos controles, negativo (não infectado) e infectado com <i>Babesia</i> sp. (babesiose), contra os antígenos recombinantes e suas respectivas curvas ROC.....	74

Figura 14: Comparação da reatividade das proteínas recombinantes e do antígeno bruto de <i>L. infantum</i> nos testes de ELISA com soros humanos e suas respectivas curvas ROC.	78
Figura 15: Comparação da reatividade da proteína MyxoTLm e do antígeno bruto de <i>L. infantum</i> e suas respectivas curvas ROC no teste de ELISA com soros humanos.....	81
Figura 16: Predição de epítomos polimórficos lineares de linfócitos B na proteína ATP difosfohidrolase de <i>L. infantum</i>	85
Figura 17: Predição de epítomos polimórficos lineares de linfócitos B na proteína de ligação ao GTP de <i>L. infantum</i>	88
Figura 18: Predição de epítomos polimórficos lineares de linfócitos B na proteína de ligação ao GTP de <i>L. mexicana</i>	90
Figura 19: Predição de epítomos polimórficos lineares de linfócitos B na proteína tirosina fosfatase de <i>L. braziliensis</i>	92
Figura 20: Immunoblotting da membrana contendo os peptídeos de Myxo Lm com maior score de predição de epítomos de célula B.....	93

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Sequência de <i>primers forward e reverse</i> , sítio para enzima de restrição e tamanho do amplicon referente aos genes avaliados para expressão de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	41
Tabela 2: Categorias de resultados de um teste diagnóstico em uma população de infectados e não infectados.....	50
Tabela 3: Resultado do ELISA para cães utilizando o antígeno MyxoLi.	74
Tabela 4: Resultado do ELISA para cães utilizando o antígeno EctoLi.	75
Tabela 5: Comparação do desempenho do ELISA para soros de cães com LVC realizado com os antígenos recombinantes e o kit EIE-LVC.....	76
Tabela 6: Resultado do ELISA para humanos utilizando o antígeno EctoLi.....	79
Tabela 7: Comparação do desempenho do ELISA para soros de humanos com LVH realizado com as proteínas recombinantes e o antígeno bruto de <i>L. infantum</i>	79
Tabela 8: Resultado do ELISA para humanos infectados com tripanossomatídeos utilizando o antígeno MyxoTLm.....	81
Tabela 9: Resultado do ELISA para humanos infectados com tripanossomatídeos utilizando o antígeno bruto de <i>L. infantum</i>	82
Tabela 10: Comparação do desempenho do ELISA para soros de humanos infectados com tripanossomatídeos realizado com a proteína recombinante MyxoTLm e o antígeno bruto de <i>Leishmania</i>	82

RESUMO

Avanços para um diagnóstico mais eficiente da leishmaniose visceral faz-se necessário, pois essa doença pode ser fatal, se não tratada. Apesar do contínuo desenvolvimento de testes de imunodiagnóstico, limitações intrínsecas de cada técnica resultam em um diagnóstico incerto. Durante os últimos anos, nosso grupo vem desenvolvendo estudos de imunogenômica para a busca de novos antígenos que sejam mais sensíveis e específicos. Utilizando metodologias de mineração de dados, é possível identificar proteínas ou peptídeos presentes nos parasitos que exibem certa homologia a moléculas do hospedeiro que estão associadas à resposta imunológica, que podem ser o diferencial na tentativa de melhoria de testes diagnósticos. Neste contexto, o presente estudo identificou e testou três proteínas de *Leishmania* que apresentam similaridade com proteínas presentes no banco de dados ImmunomeBase, o qual dispõe de proteínas de *Homo sapiens* com função biológica associada a processos de defesa do hospedeiro previamente caracterizadas. Foram selecionados para esse trabalho os genes que codificam a proteína ATP difosfohidrolase de *L. infantum* (EctoLi), a proteína de ligação ao GTP de *L. infantum* (MyxoLi) e de *L. mexicana* (MyxoLm) e a proteína tirosina fosfatase de *L. braziliensis* (TyroLb). Esses alvos foram expressos em um sistema heterólogo, utilizando como vetor o plasmídeo pET28a-TEV e como sistema de expressão *Escherichia coli* da cepa BL21 e Arctic Express. Após a purificação por cromatografia de afinidade, as proteínas foram utilizadas como antígenos no teste sorológico por ELISA para leishmaniose visceral humana (LVH) e canina (LVC). As propriedades antigênicas das proteínas foram avaliadas e epítomos lineares de célula B foram identificados. Na validação com soros de cães, a eficiência do teste foi capaz de discriminar as amostras positivas de negativas e a qualidade dos testes com os antígenos recombinantes, baseada na área sob a curva ROC, foi entre bom e excelente, sugerindo que estas proteínas constituem bons candidatos para uma triagem inicial dos animais e/ou teste confirmatório de LVC. Em destaque, os testes com EctoLi e MyxoLi apresentaram alta especificidade, sendo úteis não só para determinar os verdadeiros positivos e verdadeiros negativos, como também para distinguir reações cruzadas. O valor preditivo positivo e a acurácia para esses testes foram superiores ao observado para o kit EIE-LVC – Bio-Manguinhos, sugerindo que os antígenos testados no trabalho são melhores candidatos para o diagnóstico de LVC. Na validação com soros de pacientes humanos, a proteína recombinante EctoLi demonstrou um bom desempenho no teste diagnóstico e destacou-se pela alta especificidade, sendo capaz de separar significativamente pacientes infectados de não infectados e com doença de Chagas, sugerindo ser um bom candidato para teste confirmatório de LVH. Em adição, a proteína truncada MyxoTLm mostrou ser uma boa candidata para o sorodiagnóstico de tripanossomatídeos (*Leishmania* e *Trypanosoma cruzi*) com 100% de especificidade e 90% sensibilidade, sendo seu uso sugerido para triagem em bancos de sangue. A partir dos dados obtidos, nosso trabalho sugere que a estratégia do ELISA baseado em proteínas recombinantes, homólogas ao sistema imune do hospedeiro, pode ser útil para o desenvolvimento de um teste sensível e altamente específico para o sorodiagnóstico desta parasitose.

ABSTRACT

Advances seeking a more efficient diagnosis of visceral leishmaniasis are still necessary, since this disease can be fatal if untreated. Despite the continuous development of immunodiagnostic tests, intrinsic limitations of each technique usually lead to an uncertain diagnosis. Over the last years, our group has been focused in immunogenomic studies for the search of new antigen candidates that would be more sensitive and specific. Using data mining methodologies, it is possible to identify proteins or peptides present in the parasites with homology to host molecules associated with the immune response, which may be the differential approach in an attempt to improve the performance diagnostic tests. In this context, the present study identified and tested three *Leishmania* proteins that present similarity to proteins present in the ImmunomeBase database, which comprises *Homo sapiens* proteins with biological function associated with previously characterized host defense processes. It was selected genes coding for ATP diphosphohydrolase protein of the *Leishmania. infantum* (EctoLi), GTP binding protein of the *L. infantum* (MyxoLi) and *L. mexicana* (MyxoLm), and tyrosine phosphatase protein of the *L. braziliensis* (TyroLb). These targets were expressed in a heterologous system using the plasmid pET28a-TEV as vector and *Escherichia coli* strain BL21 and Arctic Express as the expression system. After purification by affinity chromatography, the proteins were used as antigens in the ELISA test for human visceral leishmaniasis (HVL) and canine (CVL). The antigenic properties of the proteins were evaluated and the linear B-cell epitopes derived from these targets were identified. When proteins were tested with the dog sera, the efficiency of the test was able to discriminate the positive from the negative samples and the quality of the tests with the recombinant antigens, based on the area under the ROC curve, was between good and excellent, suggesting the use of these proteins for an initial screening of the animals and/or confirmatory test for CVL. In particular, EctoLi and MyxoLi showed high specificity, being useful not only to determine true positives and true negatives, but also to distinguish cross-reactions. The positive predictive value and the accuracy for the assays using these proteins were higher when compared to the EIE-LVC kit – Bio-Manguinhos, suggesting that the use of the antigens provides are better candidates for the diagnosis of LVC. When tested with human sera, the recombinant protein EctoLi demonstrated a good performance for diagnostic test screening and distinguished by the high specificity, being able to significantly separate infected from uninfected patients and with Chagas disease, suggesting to be a good candidate for HVL confirmatory test. In addition, the truncated protein MyxoTLm proved to be a good candidate for the serodiagnosis of trypanosomatids (*Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*) with 100% specificity and 90% sensitivity, and our results suggest the possible use in blood bank screening. Taken together, our work suggests that the ELISA strategy based on recombinant proteins, homologous to the host immune system, could be an useful approach for the development of a more sensitive and specific tests for the serodiagnosis of this parasitosis.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose

A leishmaniose é uma infecção parasitária causada por protozoários intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania* (ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae) (Ross, 1903). Estes protozoários são transmitidos ao hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo de flebotomíneos, através da picada das fêmeas infectadas (ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae) do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Young & Duncan, 1994; Bates, 2007). Atualmente, mais de 20 espécies de *Leishmania* foram identificadas, e cerca de 90 espécies de flebotomíneos foram descritas como prováveis vetores para os parasitos do gênero *Leishmania* (WHO, 2016).

O parasito apresenta ampla distribuição geográfica e conta com a participação de diversos hospedeiros suscetíveis a infecção, como o homem e várias espécies de animais silvestres e domésticos (Desjeux, 2004a). Com base na distribuição geográfica, a doença ocorre nos seguintes locais: no Velho Mundo, sendo endêmica na Ásia, África e Sul da Europa, e no Novo Mundo, estendendo-se do Centro-Sul do Texas à América do Sul (exceto Chile e Uruguai) (Gontijo & Carvalho, 2003; Lainson & Shaw, 2010). Até o momento, a doença humana não é encontrada na Austrália, Antártida e nas Ilhas do Pacífico. Nas Américas, a leishmaniose tem caráter zoonótico, podendo acometer o ser humano de forma acidental, quando este se insere no ciclo de transmissão do parasito. No Brasil, essa parasitose apresenta importância nos contextos sanitário, econômico e social, devido a sua ampla distribuição geográfica e gravidade de suas manifestações clínicas (Lainson, 1989; Marzochi, 1992)

Embora seja uma doença conhecida e estudada há muito tempo, ela continua entre as principais endemias no mundo (WHO, 2016). É difícil obter um número exato da incidência da leishmaniose, pois acredita-se que essa parasitose seja em muitas situações subnotificada. Essa doença pode ser subclínica e/ou afetar primariamente as partes rurais remotas e empobrecidas do mundo, além de estar associada à desnutrição, deslocamento da população, condições precárias de habitação e pacientes imunossuprimidos. Mais de 98 países são endêmicos para as leishmanioses, estima-se que haja 12 milhões de infectados e cerca de 1 bilhão de pessoas vivendo em áreas endêmicas sob o risco de contrair a infecção (<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>). Estima-se que 900 mil a 1,3 milhões de novos casos ocorram anualmente (WHO, 2016). Essa parasitose causa, aproximadamente, perda de 2,4 milhões de anos de vida

ajustados por incapacidade (DALYs), colocando a leishmaniose entre as dez doenças infecciosas de maior impacto para a saúde pública e como uma das principais doenças negligenciadas presente em países em desenvolvimento (Desjeux, 2004a). A leishmaniose é a segunda maior causa de mortes por parasito (após a malária), causando anualmente 20-30 mil mortes (WHO, 2016).

Inicialmente, as leishmanioses eram consideradas apenas zoonoses de animais silvestres, que acometiam ocasionalmente pessoas em contato com áreas de florestas, posteriormente, a doença começou a ocorrer em zonas rurais, já praticamente desmatadas, regiões periurbanas, até chegar aos grandes centros. Observa-se a existência de quatro perfis epidemiológicos: a) silvestre: em que ocorre a transmissão em áreas de vegetação primária (zoonose de animais silvestres); b) ocupacional ou lazer: em que a transmissão está associada à exploração desordenada da floresta e derrubada de matas para construção de estradas, extração de madeira, desenvolvimento de atividades agropecuárias e ecoturismo (antropozoonose); c) rural ou periurbana: em áreas de colonização (zoonose de matas residuais), ou periurbana, em que houve adaptação do vetor ao peridomicílio (zoonose de matas residuais e/ou antropozoonose) (Ministério da Saúde, 2006); e d) urbana: transformações ambientais associadas a movimentos migratórios e ao processo de urbanização podem explicar, em parte, a doença passou a ocorrer de forma endêmica e epidêmica em grandes cidades do nordeste brasileiro (Mendes et al., 2002). Este processo desordenado de ocupação urbana resultou em condições precárias de vida e destruição ambiental. Por um lado, o vetor *Lutzomyia longipalpis* se adapta facilmente às condições peridomésticas de áreas depauperadas, explorando o acúmulo de matéria orgânica gerada por animais domésticos e más-condições sanitárias (Aguiar et al., 1996). Por outro, cães abandonados vagando na periferia da cidade podem se infectar quando entram em contato direto com reservatórios selvagens e, ao retornarem para o interior da cidade, servirem de amplificadores da infecção para outros cães e humanos.

A transmissão vetorial é a principal forma de disseminação do parasito, no entanto, atualmente, casos de transmissão dos parasitos envolvidos na forma visceral da doença por meio de transplantes de órgãos (Basset et al., 2005), pelo compartilhamento de seringas entre usuários de drogas intravenosas (Alvar et al., 1996), pela via congênita (Maltezou, 2010) e transfusão sanguínea (Dey & Singh, 2006) têm merecido maior atenção dos pesquisadores.

Os fenômenos associados à globalização, com um número crescente de viajantes e populações migrantes, aumentam o risco de exposição a estes agentes infecciosos, levantando o problema da sua transmissão por via transfusional. A possibilidade de transmissão de infecções por transfusão sanguínea é reconhecida há vários anos. Qualquer infecção por um agente que passe por uma fase sanguínea assintomática tem o potencial de ser transmitido inadvertidamente por via transfusional. A legislação brasileira de hemoterapia, RDC nº 153 de 2004, preconiza como rotina nos bancos de sangue testes sorológicos para doença de Chagas, hepatites B e C, sífilis, HTLV 1 e 2, HIV 1 e 2, não sendo recomendada sorologia para leishmaniose visceral (LV) (Anvisa, 2004). É importante ressaltar que esta infecção foi notificada, em média, com 4.497 novos casos no ano de 2012 em nosso país e a incidência é de dois casos a cada 100 mil habitantes (Ministério da Saúde, 2013). A gravidade da infecção, pela via transfusional, dependente ainda de outros fatores, como as diferentes espécies de *Leishmania* e da imunidade do receptor do sangue. E são estas variáveis que determinarão a magnitude da doença.

1.2 Ciclo

Os parasitos do gênero *Leishmania* são digenéticos, tendo o seu ciclo de vida dividido entre hospedeiros vertebrados e invertebrados. O ciclo de vida do parasito é intracelular nos mamíferos e a transmissão tem início quando uma fêmea do flebotomíneo realiza o repasto sanguíneo em um animal infectado, que funciona como fonte de infecção para o inseto (Figura 1).

Durante o repasto sanguíneo, fêmeas de flebotomíneos ingerem juntamente com o sangue células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), e assim, macrófagos infectados com as formas amastigotas também são ingeridos, devido ao modo telmofágico de repasto sanguíneos destes insetos. Essa forma intracelular do parasito é normalmente ovóide e o flagelo não é exteriorizado, ficando contido na bolsa flagelar, estrutura formada pela invaginação da membrana externa do parasito. Dentro de 12 a 18 horas, no trato intestinal das fêmeas do flebotomíneo, envolvido por uma matriz peritrófica, que é secretada pelas células do epitélio intestinal, as amastigotas modificam-se em formas extracelulares, flageladas, alongadas e móveis, genericamente denominadas promastigotas procíclicas, que se multiplica intensamente por divisão binária. Em cerca de 30 a 60 horas, ocorre a diferenciação em formas alongadas denominadas procíclicas, que se aderem ao intestino médio do flebotomíneo. Nos parasitos do subgênero *Viannia*, acrescenta-se uma fase de divisão de paramastigotas

ovóides e promastigotas que se aderem às paredes do intestino posterior (Lainson & Shaw, 1987). Cerca 72 horas depois, quando se completa a digestão do sangue, estas formas migram para a região torácica do intestino, onde se diferenciam em promastigotas metacíclicas. Esses vetores, ao realizarem novo repasto sanguíneo, regurgitam as formas infectivas nos hospedeiros vertebrados, e, dessa forma, ocorre a transmissão da *Leishmania* (Bates, 2007).

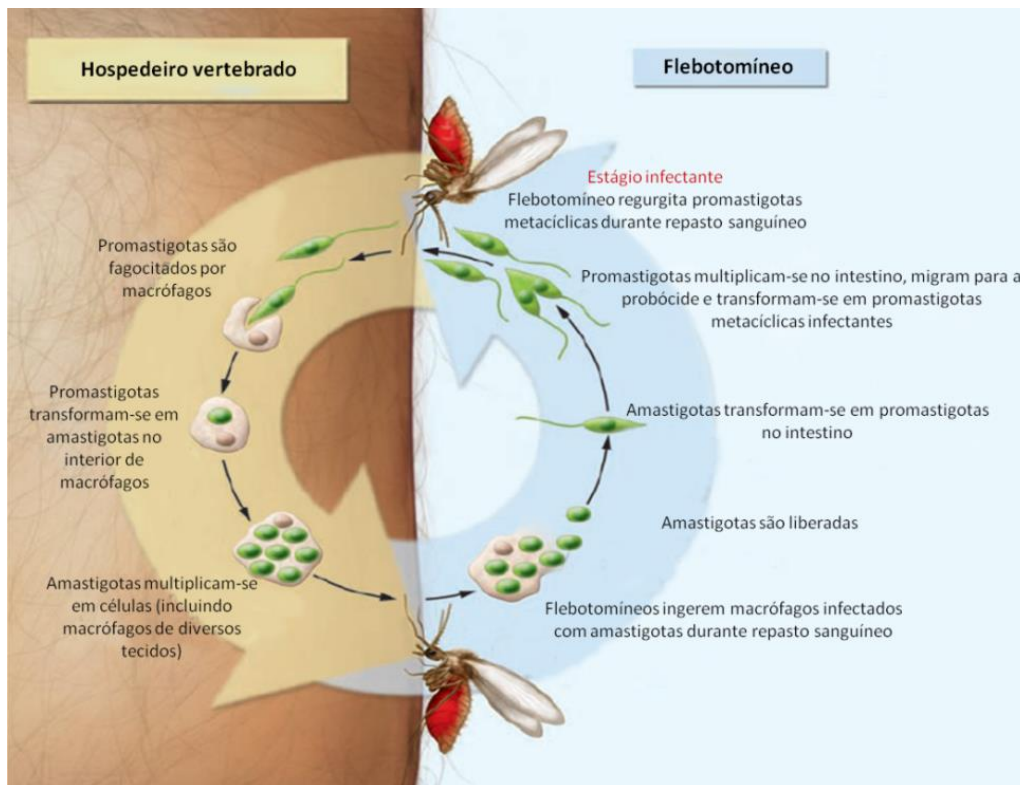


Figura 1: Esquema do ciclo de vida do gênero *Leishmania* nos seus hospedeiros vertebrados e invertebrados. FONTE: adaptado de Stuart et al. (2008).

No hospedeiro definitivo, as promastigotas são fagocitadas por macrófagos e, no interior dessas células, os parasitos internalizados ficam dentro de um vacúolo parasitóforo (fagolisossoma), envolvido na destruição de microrganismos. Apesar dos macrófagos consistirem na principal célula fagocítica a albergar o parasito, já foi demonstrado que neutrófilos são recrutados dentro das primeiras horas após a inoculação das formas infectantes, apresentando grande importância no processo da infecção. Os neutrófilos serão fagocitados pelos macrófagos, o que proporciona ao parasito acesso à principal célula que o alberga (Müller et al., 2001; Laufs et al., 2002; Peters et al., 2008). No entanto, o parasito apresenta mecanismos capazes de evadir da ação microbicida do macrófago, transformando-se em amastigotas. Inicia-se, então, o

processo de multiplicação, que se estende, até a ruptura da célula, quando as amastigotas são liberadas para infectar outros macrófagos, propagando a infecção. Durante este processo ocorre ainda a liberação de produtos antigênicos que serão apresentados ao sistema imune, gerando uma resposta imune específica. Os mecanismos de eliminação das amastigotas pelos macrófagos ativados pelo IFN- γ envolvem a síntese de radicais de oxigênio e nitrogênio, como o óxido nítrico (Sacks & Noben-Trauth, 2002; Peters & Sacks, 2006).

Além do ser humano, vertebrados, como canídeos silvestres (*Cerdocyon thous* e *Dusicyon vetulus*) e domésticos (*Canis lupus familiaris*), marsupiais (*Didelphis albiventris*) e roedores, principalmente dos gêneros *Rattus*, *Mus*, *Bolomys*, *Oryzomys*, *Akodon*, podem estar envolvidos no ciclo da *Leishmania* spp. (Reithinger & Davies, 1999; Cabrera et al., 2003; Garg & Dube, 2006). Recentemente, Oliveira e colaboradores mostrou que morcegos também podem ser hospedeiros de *L. infantum* (2012).

1.3 Manifestações clínicas e resposta imune

As leishmanioses podem levar, dependendo da espécie, a um caráter espectral de manifestações clínicas. Portanto, do ponto de vista clínico, e considerando ainda a diversidade e complexidade biológica do parasito, dos vetores e dos hospedeiros vertebrados, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica a leishmaniose em quatro grandes grupos de acordo com o caráter espectral das manifestações apresentadas como: cutânea, cutânea difusa, mucocutânea e visceral, também conhecida como calazar.

De todas as formas clínicas dessa parasitose, a leishmaniose cutânea (LC) é a mais comum. As principais espécies envolvidas na LC são: *L. tropica*, *L. aethiopica* e *L. major* no Velho Mundo; e *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. guyanensis*, *L. shawi*, *L. panamensis*, *L. naiffi* e *L. lainsoni* no Novo Mundo (chamada de leishmaniose tegumentar americana - LTA) (Mansueto et al., 2014). Em mais detalhes, as manifestações da LTA incluem leishmaniose cutânea localizada/aguda (LCL), leishmaniose cutânea difusa (LCD) ou anérgica, e leishmaniose mucocutânea (LM) (Gontijo & Carvalho 2003).

A LC é definida pela presença de lesões exclusivamente na pele, que se iniciam no ponto de inoculação das promastigotas infectantes pela picada do hospedeiro invertebrado, resultando na multiplicação da *Leishmania* em fagócitos presentes na pele (Berman, 1997).

Outra forma crônica/recorrente é a leishmaniose mucocutânea (LM). Caracterizada por uma lenta e progressiva destruição do tecido mucoso e submucoso, a LM é caracterizada por manifestações clínicas normalmente na superfície da mucosa do nariz, boca e faringe, e, na grande maioria dos casos, com importante comprometimento do septo, seguindo em ordem de frequência o envolvimento da mucosa oral e as vias aéreas superiores. Em todos estes casos, existe um considerável risco de deformidades permanentes (Grevelink& Lerner, 1996; Marsden, 1986; Pearson& Sousa, 1996).

Por fim, a leishmaniose visceral (LV) ou calazar é uma doença de notificação compulsória, assim como a leishmaniose tegumentar, e que pode ter evolução grave, devendo ser diagnosticada precocemente (Ministério da Saúde, 2006). A ausência de tratamento adequado do paciente pode levar à morte, podendo alcançar o índice de 10% de letalidade (Gontijo & Melo, 2004). O período ativo da leishmaniose visceral canina (LVC) é caracterizado pelo escurecimento desigual da pele, explicando a origem do nome calazar, que significa febre negra. A pele normalmente se torna seca e áspera e a alopecia nos cães é frequente.

Na LV, os parasitos apresentam tropismo pelas células do sistema fagocítico mononuclear. Após um período de incubação, os pacientes apresentam sintomas referentes a uma infecção sistêmica persistente (febre, fadiga, fraqueza, perda de apetite e de peso) e também sintomas referentes à invasão de parasitas em células do sistema fagocítico mononuclear, tais como aumento de tamanho de linfonodos, baço e fígado (Marinkelle, 1980). O período de incubação da doença é de normalmente dois a quatro meses, após o qual esta passa para um curso crônico. É possível observar um aumento de imunoglobulinas do tipo IgG e IgM no soro dos pacientes, no entanto, uma depressão da imunidade mediada por célula predispõe o hospedeiro a infecções secundárias (Dastidar et al., 1983; Haldar et al., 1983).

A LV ocorre na Ásia, Europa, Oriente Médio, África e Américas, sendo que, nesse último continente, 90% dos casos ocorrem no Brasil (Desjeux, 1996; Desjeux, 2004, Ministério da Saúde, 2006). Acredita-se que 90% dos casos concentram em seis países apenas - Índia, Nepal, Bangladesh, Etiópia, Sudão e Brasil (Alvar, et al. 2012). Clínica e epidemiologicamente, existem duas formas principais de LV: a LV zoonótica, em que o cão e/ou outros canídeos desempenham papel de reservatórios da doença, e a LV antroponótica, existente em Bangladesh, Índia e Nepal, que é transmitida entre humanos através da picada de flebotomíneos infectados. As principais espécies causadoras da LV são a *L. donovani* no subcontinente indiano, Ásia e África oriental, e

a *L. infantum* na América do Sul e na bacia do Mediterrâneo. Em países do Mediterrâneo e da América do Sul, onde a doença é zoonótica, a LV acomete, principalmente, crianças e jovens (Kafetzis & Maltezou, 2012), entretanto, isso não ocorre para a forma antroponótica, em que todas as faixas etárias são igualmente atingidas pela doença (Alvar et al., 1996). Foi observado, na bacia do Mediterrâneo, um aumento da taxa de infecção em indivíduos adultos imunocomprometidos e imunossuprimidos (Alvar, et al., 2008), tais como pacientes coinfectados com HIV e aqueles sob qualquer terapia de imunossupressores.

Ao longo da última década, houve um aumento de casos de LV importados em países não endêmicos, em associação com o aumento do turismo internacional, operações militares, influxo de imigrantes de países endêmicos e pacientes HIV-positivos (Antinori, et al., 2005). A pandemia da AIDS tornou-se um fator preocupante na epidemiologia da LV, sendo essa coinfeção considerada doença emergente de alta gravidade em várias regiões do mundo. Nesses pacientes imunocomprometidos, a doença apresenta curso clínico inespecífico com sintomas que podem ser mascarados por infecções oportunistas (Alvar et al., 1997). Considera-se que haja subnotificação dessa coinfeção, devido a problemas no diagnóstico de uma ou de ambas as patologias (Ezra et al., 2010).

Os cães desempenham papel fundamental na epidemiologia da LV zoonótica, sendo considerados os principais reservatórios do agente etiológico da doença humana (Deane & Deane, 1955). Isso se explica devido ao fato dos cães serem altamente susceptíveis à infecção, por possuírem intenso parasitismo cutâneo e principalmente pelo seu convívio junto aos humanos (Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006). Porém, no Brasil, o parasito foi encontrado, ainda, em gatos (*Felis catus*), marsupiais (*Didelphis marsupiali* e *D. albiventris*) e roedores (*Proechymis oris*) (Sherlock et al., 1984; Sherlock, 1996; Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006). Dependendo da fase da doença e das condições imunológicas, muitos cães infectados se apresentam assintomáticos. Em torno de 60% a 80% dos cães pertencentes a áreas endêmicas podem ter contato com o parasito e não desenvolver sinais clínicos da doença. Além disso, existem evidências de que a taxa de prevalência da infecção em cães assintomáticos pode ser mais alta do que as obtidas por estudos sorológicos (Evans et al., 1990; Queiroz et al., 2010). Já foi possível demonstrar que os cães infectados assintomáticos são fonte de infecção para os flebotomíneos e, conseqüentemente, têm

papel ativo na transmissão de *Leishmania* (Alvar et al., 1994; Molina et al., 1994; Abranches et al., 1998).

1.4 Controle e tratamento da LV

As estratégias de controle devem ser específicas, de acordo com a situação epidemiológica de cada localidade e região, sendo de fundamental importância o conhecimento do maior número de casos suspeitos, a identificação do agente etiológico circulante e do vetor predominante, o conhecimento das áreas onde está ocorrendo a transmissão e a redução do contato homem-vetor por meio de medidas específicas (Gontijo & Melo, 2004).

Nos casos de LV, as estratégias de controle até então utilizadas estavam centradas e dirigidas para o controle do reservatório canino (inquérito sorológico canino e eutanásia de cães sororreagentes), bem como para a aplicação de inseticidas, diagnóstico e tratamento adequado dos casos humanos registrados. Porém, a eliminação de cães infectados é bastante controversa. O processo de detecção de reservatórios infectados, uma vez que envolve questões de cunho afetivo pela grande maioria dos proprietários que não concordam com a perda do seu animal (Lainson & Rangel, 2005), requer métodos diagnósticos confiáveis. Nesse sentido, o cão assume uma importância muito grande para o controle da doença, pois a eutanásia do animal infectado irá envolver a delicada e polêmica relação homem-cão, criando resistência ao combate da LV canina (Bevilacqua, 1999).

Recentemente, final de agosto de 2016, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) autorizou o tratamento dos cães infectados com o medicamento Milteforan (Nota técnica nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA – Processo nº 21000.042544/2016-94). Este medicamento até então tinha comercialização proibida pela portaria nº 1426/2008 que impede o tratamento da LVC com produtos de uso humano ou não registrados no MAPA. A droga, que já é comercializada desde 2007 em alguns países europeus, como Espanha, Portugal e Grécia, estará disponível no Brasil a partir deste ano, de acordo com o MAPA (Lladro et al., 2017).

Em nota, o MAPA informou que será necessário que o dono do animal cumpra corretamente o tratamento e faça acompanhamentos constantes com um veterinário (Nota técnica nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA – Processo nº 21000.042544/2016-94). É importante ressaltar a necessidade de cumprimento do protocolo de tratamento descrito na rotulagem do produto, respeitando-se a necessidade de reavaliação clínica, laboratorial e parasitológica periódica pelo médico veterinário, a

necessidade de realização de novo ciclo de tratamento, quanto indicado, e a recomendação de utilização de produtos para repelência do flebotômíneo, inseto transmissor do agente causal da LVC.

Para o controle de vetores, o método químico por meio da utilização de inseticidas de ação residual é a medida de controle vetorial recomendada no âmbito da proteção coletiva. Essa medida é dirigida apenas para o inseto adulto e tem como objetivo evitar ou reduzir o contato entre o inseto transmissor e a população, diminuindo o risco de transmissão (Ministério da Saúde, 2006).

As opções de tratamento para a LV humana são limitadas. Todos os fármacos disponíveis devem ser administrados por via parenteral e durante um longo período de tempo (geralmente 20 dias), o que requer supervisão médica a cada aplicação, além de serem potencialmente tóxicos (Ministério da Saúde, 2006). Os derivados de antimônios pentavalentes (Sb+5), introduzidos na década de 40, têm sido considerados como drogas de primeira escolha até os dias de hoje. Existem no mercado atualmente duas formulações disponíveis: estibogluconato de sódio e o antimoniato-N-metil glucamina. No Brasil, a única formulação disponível é o antimoniato N-metil glucamina, que vem sendo distribuída pelo Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2006). Nos últimos anos, doses progressivamente maiores dos antimoniais têm sido recomendadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pelo Centro de Controle de Doenças (CDC) dos Estados Unidos da América devido ao aparecimento de resistência primária do parasito a essas drogas. Apesar da resistência aos antimoniatos ser menos relevante nas Américas se comparado à Índia, combinações de drogas são desejáveis e devem ser melhor estudadas, devido à potencial diminuição da duração dos esquemas terapêuticos e também da toxicidade (Romero & Boelaert, 2010).

Entre as drogas de segunda escolha, usados no Brasil, estão incluídos o desoxicolato sódico de anfotericina B e suas formulações lipossomais (anfotericina-B-lipossomal e anfotericina-B-dispersão coloidal), as pentamidinas (sulfato e mesilato) e os imunomoduladores (INF- γ e GM-CSF) (Ministério da Saúde, 2004). Anfotericina B é a droga leishmanicida mais potente disponível comercialmente, atuando nas formas promastigotas e amastigotas do parasito. Recentemente, essa droga tornou-se disponível comercialmente, mas em decorrência do elevado custo do tratamento, seu uso na rotina do serviço de saúde fica inviável (Filippin & Souza 2006).

1.5 Diagnóstico da leishmaniose

As dificuldades referentes ao diagnóstico, tratamento e controle das diversas formas da leishmaniose são fatores que devem ser considerados, pois interferem diretamente na epidemiologia da doença (Marzochi & Marzochi, 1994). Animais e o homem podem apresentar a forma assintomática da doença, dificultando assim o seu diagnóstico (Reithinger & Dujardin, 2007; Gramiccia, 2011). O tratamento efetivo da doença requer o diagnóstico correto e precoce, de maneira a evitar o desenvolvimento de doença crônica e/ou de lesões desfigurantes (Van der Meide et al., 2005).

Diferentes métodos de diagnóstico associados são usados para a confirmação da doença, dentre os quais pode-se citar: (1) parasitológico – classificado em direto e indireto, (2) molecular; e (3) imunológico – podendo apresentar abordagem celular e sorológica.

O diagnóstico parasitológico direto da LV é considerado um método invasivo e requer a coleta de aspirados de medula óssea, baço, linfonodo ou fígado. As formas amastigotas podem ser visualizadas em microscópio em preparações coradas com o corante Giemsa. Amostras do baço apresentam sensibilidade de 93-98% (Ho Ea et al., 1948; Siddig et al., 1988; Zijlstra et al., 1992), por sua vez, amostras de medula óssea e linfonodo apresentam baixa sensibilidade, variando de 52-85% (Ho Ea et al., 1948) e 52-58% (Siddig et al., 1988; Zijlstra et al., 1992), respectivamente. Em algumas situações, como de anemia grave, de tendência à hemorragia, ou em casos de gravidez, a técnica é contraindicada (Desjeux, 2004). De forma semelhante, para LTA o diagnóstico é realizado por aposição de fragmentos da lesão sobre uma lâmina, com posterior coloração com Giemsa, e visualização das amastigotas em microscópio óptico (Herwaldt, 1999). Este deve ser o primeiro diagnóstico de abordagem, embora a sua sensibilidade seja apenas de 14-18% (Navin et al., 1999). Dentre as vantagens, pode-se destacar: o curto prazo para conclusão, o baixo custo e a execução relativamente fácil, apesar da necessidade de treinamento dos técnicos envolvidos (Ashford, 2000; Van der Meide et al., 2005).

Outras metodologias usadas e caracterizadas como formas diretas de diagnóstico parasitológico, consideradas igualmente úteis, são as técnicas rotineiras de histologia e/ou imuno-histoquímica, que também se baseiam na detecção das amastigotas em fragmentos de tecidos (biópsias). Um fator importante e que pode interferir na sensibilidade desse tipo de teste é o sistema de detecção usado (Ramos-Vara et al.,

2008; Rocha et al., 2009), sendo o sistema de biotina-estreptoavidina peroxidase o mais comumente empregado nas técnicas de imuno-histoquímica (Ramos-Vara et al. 2008).

Como diagnóstico parasitológico indireto, tem-se o cultivo *in vitro* dos parasitos, realizado a partir do material aspirado ou de biópsia, podendo ser usado como forma de aumentar a sensibilidade do diagnóstico. A aspiração por agulha a partir da margem de uma lesão pode coletar fluido para cultura em meio especial (meio monofásicos, como Schneider, M199, RPMI e Grace, ou bifásico, como o Novy-McNeal-Nicolle (NNN) com LIT (Liver Infusion Triptose) em condições de temperatura variando entre 24-25°C durante até 3 semanas) para isolar o organismo e identificar a espécie, ficando os índices de positividade da cultura de aspirado medular entre 40-50%, enquanto que os de aspirado esplênico situa-se em torno de 70-98% (Singh & Sivakumar, 2003). A cultura é examinada semanalmente para a detecção de promastigotas. Apesar de ser 100% específica, atualmente é pouco utilizada em diagnóstico devido à demora em apresentar o resultado, à susceptibilidade de contaminação microbiológica, à dependência da carga parasitária e, algumas vezes, à dificuldade de adaptação do isolado ao meio (Maia, 2008).

Outra forma indireta de diagnóstico da doença é a inoculação do material de biópsia em hamsters (*Mesocricetus auratus*) e a posterior confirmação da presença do parasito, mas é uma técnica de longa duração não sendo utilizada na rotina laboratorial diagnóstica (Cuba et al., 1986; Sampaio *et al.*, 2002).

O xenodiagnóstico, também considerado um método diagnóstico parasitológico indireto, consiste em uma metodologia que necessita dos vetores para sua conclusão e é realizado em cães com suspeita de LV. Nessa técnica, flebotomíneos, sabidamente isentos de parasitos, são colocados para alimentarem-se em cães suspeitos, e dias após essa atividade, os insetos são dissecados e seu conteúdo intestinal avaliado em relação à presença das formas flageladas dos parasitos. Trata-se de um método sensível e específico, mas pouco usual, por se tratar de uma técnica muito dispendiosa (Gradoni & Gramiccia, 2008). Ainda precisa ser mencionado, que a realização dessa técnica depende de colônias de flebotomíneos e nem sempre é fácil ter disponível.

Outra forma de diagnóstico é a detecção do DNA do parasito por meio de métodos moleculares que são inovadores para o diagnóstico das leishmanioses e estão sendo cada vez mais aprimorados. A técnica mais utilizada é a PCR (*Polymerase Chain Reaction*), dentre elas pode-se destacar suas variantes, PCR multiplex, nested-PCR, RT-PCR (Britto et al., 2005; Cupolillo, 2005), que permitem a detecção do DNA de

Leishmania através da amplificação de alvos gênicos em diferentes tecidos, como sangue total, medula óssea, linfonodo, pele e raspado conjuntival. Este método é o mais confiável para determinar a presença e a identificação do parasito não apenas nos casos agudos da doença, mas também para monitorar a cura parasitológica após o tratamento (Fisa et al. 2001; Andrade et al. 2002; Strauss-Ayali et al. 2004; Maia et al. 2006; Ferreira et al. 2008; Srivastava et al. 2011; Odiwuor et al. 2011; Van der Auwera et al. 2014). As técnicas moleculares apresentam como vantagem a alta sensibilidade, sendo capazes de detectar o alvo mesmo que ele esteja em quantidade mínima nas amostras clínicas analisadas. Além desse, outros fatores positivos desse método é a possibilidade de coletar as amostras de maneira menos invasiva com a geração de um resultado seguro em um pequeno intervalo de tempo (Ikonomopoulos et al., 2003). Entretanto, trata-se de técnica ainda onerosa, que depende de pessoal laboratorialmente treinado e qualificado e, portanto, pouco empregadas na rotina do diagnóstico da doença. No entanto, a eficácia da PCR dependerá de diferentes fatores como: os iniciadores, a quantidade de cópias do gene alvo, o método de extração do DNA, o material biológico e o protocolo da PCR (Alvar et al. 2004; Cortes et al. 2004; Baneth and Aroch 2008). Um único resultado negativo da PCR para um cão com suspeita clínica não é suficiente para dizer que não há infecção. De modo geral, a PCR tem grande versatilidade, uma vez que, para sua realização, podem ser utilizadas pequenas quantidades de diversas amostras clínicas, porém, esta avaliação em diferentes tecidos mostraram resultados variáveis e, às vezes, conflitantes (Tavares et al. 2003).

Para o diagnóstico imunológico da LTA, o teste intradérmico ou intradermorreação de Montenegro, baseado na hipersensibilidade celular tardia a antígenos de *Leishmania*, é muito usado e apresenta especificidade e sensibilidade satisfatórias (Reithinger & Dujardin, 2007). É importante ressaltar que nos locais endêmicos, a reação positiva pode ser devido à doença ou à inoculação do antígeno anteriormente ministrado para detecção da infecção. Outro fator é a constante exposição ao parasito sem necessariamente desenvolvimento da doença, além de possibilidade de ocorrência de alergia ao diluente, ou ainda reação cruzada com outras doenças (Montenegro, 1926). Um obstáculo enfrentado pela técnica, é que ela não é capaz de distinguir infecção recente de passada.

Os métodos sorológicos são indicados, principalmente, para o diagnóstico da LV, tendo em vista os elevados níveis de anticorpos que podem ser observados em pacientes que apresentam essa forma da doença (Burns et al., 1993). Diferentes testes

empregados na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* têm sido desenvolvidos, entretanto, limitações como redução dos níveis de anticorpos após o tratamento (Kumar et al. 2001) e significativa proporção de indivíduos assintomáticos torna esta estratégia de controle um verdadeiro desafio (Schaefer et al. 1995). Dentre os métodos sorológicos para a LV podemos destacar: ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA), reação de imunofluorescência indireta (RIFI), teste de aglutinação direta (DAT) e o teste imunocromatográfico.

O ELISA foi introduzido na década de 70 e atualmente é o teste sorológico mais utilizado para o diagnóstico da LV (Alves & Bevilacqua, 2004). Possui a vantagem de ser utilizado em testes de triagem de estudos epidemiológicos, devido à capacidade de processar várias amostras ao mesmo tempo, é sensível, porém seu desempenho de especificidade é influenciado pelo tipo de antígeno utilizado no teste (Maia & Campino, 2008). Embora vários antígenos venham sendo testados (Singh & Sivakumar, 2003), o ELISA com antígenos brutos ou solúveis derivado do lisado de promastigotas de *Leishmania* spp. é o mais usado (Ryan et al., 2002; Singh 2006b). No entanto, a especificidade pode ser comprometida, pois estes testes podem apresentar reatividade cruzada com outros protozoários parasitos que possuem moléculas antigênicas semelhantes (Choudhry et al. 1990, Romero et al. 2009, Zanette et al., 2014). O rK39, pertencente à superfamília das cinesinas, que são proteínas motoras da *Leishmania* spp., também é usado para a realização da técnica e é predominantemente apontado pela literatura científica como o antígeno recombinante mais promissor para o diagnóstico sorológico da LV (Burns et al., 1993). Entretanto, esse antígeno tem sido menos eficiente em algumas regiões, como, por exemplo, no leste da África (Ritmeijer K, et al., 2006). De algum modo, pacientes residentes em áreas endêmicas do Sudão apresentam baixos títulos de anticorpos contra a rK39 quando comparados com pacientes indianos (Ritmeijer et al., 2006).

A imunofluorescência indireta (RIFI) é realizada por meio de uma diluição seriada do soro do hospedeiro suspeito, que por sua vez é colocado em contato com uma lâmina sensibilizada com as formas promastigotas do parasito. Essa técnica começou a ser utilizada a partir da década de 60 e até recentemente era considerada como o método sorológico padrão ouro no diagnóstico da LV, devido a sua alta sensibilidade (87-100%) e especificidade (77-100%) (el Amin et al. 1986). A ligação entre o parasito e o anticorpo é revelada após ser adicionado um anti-anticorpo conjugado com molécula emissora de fluorescência (Gradoni & Gramiccia, 2008). O teste utiliza o próprio

parasito como antígeno e é utilizado em estudos epidemiológicos, na prática clínica e no controle do tratamento (Gradoni 2002; Alvar et al. 2004). Entretanto, estes testes sorológicos apresentam limitações, como as reações cruzadas e alta variabilidade de sensibilidade e especificidade dependentes do antígeno utilizado (Da Costa et al., 1991; Cardoso & Cabral, 1998). Outros aspectos, como demanda de equipamentos sofisticados e de elevada experiência técnica para a realização desses testes, tornam estes métodos de diagnóstico laboriosos e caros, inviabilizando sua aplicabilidade em campo, bem como sua utilização em estudos de triagem em larga escala (Chappuis et al. 2007).

Outro método, o DAT, que se baseia na reação de aglutinação direta do parasito com o soro ou plasma do paciente ou cão com suspeita da doença, é de fácil execução, baixo custo e pode ser realizado em campo (Harith et al., 1986, 1987). Este teste utiliza promastigotas em suspensão ou liofilizadas, coradas com Coomassie. Vários estudos com o DAT em diferentes áreas endêmicas mostraram sensibilidade variando de 85% a 100% e especificidade de 91% a 100% (Oskam et al., 1999, Akhoundi et al., 2010). Apesar de dispensar equipamentos sofisticados para sua execução, este método apresenta limitações relacionadas ao elevado tempo de espera para se obter o resultado, além da dificuldade de padronização da concentração do antígeno a ser utilizado (Chappuis et al., 2006, 2007; Harith et al., 1989; Saul & Semião, 1996).

Por fim, outro método de sorodiagnóstico para aplicação em campo é o teste imunocromatográfico, que é considerado simples e baseia-se na interpretação visual das reações, apresentando valores de sensibilidade e especificidade que variam de 67 a 100% e de 59 a 100%, respectivamente (Ritmeijer et al., 2006). Na membrana de nitrocelulose da fita imunocromatográfica é adsorvido o antígeno, formando a linha teste, e o anticorpo anti-IgG humano constituindo a linha controle. O soro do paciente é colocado em contato com a fita e adsorvido pela membrana em fluxo ascendente. O teste é considerado positivo quando é possível visualizar as duas linhas, teste e controle; e negativo quando somente a linha controle é visualizada na membrana de nitrocelulose (Assis et al., 2008). Dentre os testes validados, podemos destacar o IT-Leish (DiaMed IT-LEISH®), para LV humana (Assis et al., 2008), e *DPP - dual path platform* (Bio-Manguinhos/Fiocruz – Brasil), para LV canina (Grimaldi et al., 2012). Pela sua simplicidade, rápido resultado, alta reprodutibilidade e baixo custo, este teste é considerado a melhor ferramenta para diagnóstico da LV em estudos de triagem em campo (Chappuis et al. 2007).

Um aspecto importante dos métodos aplicados ao sorodiagnóstico da leishmaniose é a escolha do antígeno, que ainda representa um obstáculo relevante, porque é comum encontrar um grande número de reações falso positivas em indivíduos infectados com outros tripanossomatídeos, principalmente quando se usa um antígeno bruto de *Leishmania* devido ao compartilhamento de múltiplos epítomos comuns (Barbosa-De-Deus, et al., 2002). Este tipo de problema reforça ainda mais a importância e o esforço científico para a busca de novos alvos para o desenvolvimento de novos testes diagnósticos mais reprodutíveis e, portanto, confiáveis. Proteínas recombinantes de *Leishmania* emergiram como alvos valiosos para diagnóstico sorológico devido a melhora no desempenho diagnóstico, demonstrando melhor sensibilidade, especificidade e maior potencial de padronização dos testes (Souza, et al., 2013). Neste contexto, várias proteínas recombinantes, entre elas K39, K26, K28, K9, K16, KMP11, peroxidoxinas, LACK, histonas nucleossomais e proteínas de choque térmico (famílias 60, 70 e 83) foram testadas no diagnóstico da leishmaniose e obtiveram resultados promissores para o desenvolvimento de kits de diagnóstico que utilizam estes antígenos (Souza, et al., 2013; Menezes-Souza, et al., 2014). Além disso, métodos experimentais para mapeamento de epítomos e síntese de peptídeos têm grande potencial para a descoberta de potenciais antígenos para a melhoria do desempenho dos testes diagnósticos (Kouzmitcheva et al., 2013). Tanto a proteína recombinante, quanto o peptídeo sintético apresentaram maior especificidade e sensibilidade do que as preparações brutas comumente utilizadas nos ensaios sorológicos (Souza, et al. 2013), e, portanto, os mesmos são alvos valiosos para compor um painel de antígenos que poderia melhorar significativamente o diagnóstico da LV.

1.6 Proteínas de *Leishmania* spp. como potenciais alvos para o diagnóstico das leishmanioses

A seleção de antígenos é essencial para melhorar a especificidade e sensibilidade das técnicas de diagnóstico. Com o sequenciamento de múltiplas espécies de *Leishmania*, sequências de proteínas do parasito podem ser comparadas com as dos seus hospedeiros e outros agentes patogênicos para identificar padrões associados à infecção (Mendes et al., 2013). Entre eles, inclui-se a escolha de novos alvos para diagnóstico, uma vez que no contexto da imunologia existem evidências de que a resposta de indivíduos infectados por distintas cepas de *Leishmania* seja variável. Assim, sugerindo que as características clínicas e imunológicas desenvolvidas ao longo da infecção

estejam associadas ao perfil genotípico da cepa do parasito (Indiani de Oliveira et al. 2004).

Um dos fatores intrigantes no estudo da leishmaniose envolve a compreensão dos mecanismos moleculares de interação entre o parasito e o hospedeiro. Esses fatos geraram uma necessidade de compreender melhor os aspectos biológicos desse parasito, através de análise comparativa dos genomas de diferentes espécies de *Leishmania* e de diversos outros organismos (Peacock et al., 2007). Diante desses dados, é possível identificar o conjunto complexo de proteínas potencialmente produzidas pelo parasito. Atualmente, há um número crescente de evidências descrevendo patógenos que produzem moléculas semelhantes aos seus hospedeiros como estratégia de ganhar vantagem nas interações parasito-hospedeiro (Elde & Malik, 2009). Essas moléculas assemelham-se a componentes do hospedeiro, tanto na estrutura como na função, e podem atuar sobre diversos processos celulares cruciais para manutenção do parasito no hospedeiro (Elde & Malik, 2009).

Apesar de desempenhar a mesma função e provavelmente possuir a mesma origem evolutiva em organismos distintos, estas proteínas homólogas do parasito apresentam diferenças estruturais, que podem ser reconhecidas imunologicamente pelo hospedeiro. A produção de anticorpos para essas proteínas seria direcionada para regiões específicas e polimórficas do parasito em relação ao hospedeiro. As sequências comuns entre ambos os organismos não apresentariam reatividade cruzada, devido à seleção negativa de clones de células B da resposta imune contra antígenos próprios (Van Lochem et al., 2004; Wen et al., 1994; Holtmeier 2005). Além do mais, os genes que codificam essas proteínas homólogas, com funções essenciais, geralmente são altamente conservados nos organismos, provavelmente sofrendo pouca pressão seletiva. Estudos anteriores demonstraram que genes *housekeeping* conservados e fatores de virulência têm um elevado potencial para o sorodiagnóstico das leishmanioses (Lakhal-Naouar et al., 2009; Menezes-Souza et al., 2014; 2015). Assim, a escolha de proteínas do parasito ortólogas ao hospedeiro humano para o diagnóstico das leishmanioses pode ser muito vantajosa.

Devido à importância dessas proteínas na interação parasito-hospedeiro, foi analisado neste trabalho o potencial de proteínas com função biológica associada a processos de defesa do hospedeiro, isoladas a partir de espécies do gênero *Leishmania*, para serem usadas como antígenos para o diagnóstico sorológico das leishmanioses. Desta forma, neste trabalho foram selecionadas três proteínas, ATP difosfohidrolase,

proteína de ligação ao GTP e proteína tirosina fosfatase, que se assemelham a componentes do hospedeiro, na busca por maior sensibilidade e especificidade no sorodiagnóstico dessa parasitose.

1.6.1 ATP difosfohidrolase

As ATP difosfohidrolases (ATPDases; EC 3.6.1.5), também conhecidas como apirases, ecto-enzimas, ecto-nucleotidases ou ecto-ATPDases são enzimas que hidrolisam ATP e ADP a AMP mais fosfato inorgânico (Pi). Nos seres humanos, elas têm sido chamadas de a família de genes CD39-like, que tem cinco isoformas diferentes (Levano-Garcia et al., 2007). Estas enzimas são ativadas por Ca^{2+} ou Mg^{2+} , têm um pH ótimo alcalino e encontram-se ligadas à membrana plasmática, com seu centro ativo voltado para o meio extracelular (Handa & Guidotti, 1996). Essas enzimas não sofrem com a ação de inibidores conhecidos de várias ATPases intracelulares, tais como tipo P, F e V (Plesner, 1995; Zimmermann, 1996; 1998).

A ATP difosfohidrolase é uma proteína altamente glicosilada com seis potenciais locais de glicosilação e dois potenciais domínios transmembranas encontrados em sequência (Maliszewski et al., 1994).

Uma atividade ecto-ATPDase foi detectada na superfície de *Schistosoma mansoni* e foi proposto que esta ecto-enzima poderia ajudar os parasitos a escapar da homeostasia do hospedeiro, impedindo ativação plaquetária ADP induzida (Vasconcelos, et al., 1993). A clonagem e a caracterização do gene SmATPDase2, que codifica a ATP difosfohidrolase em *S. mansoni*, foi descrito por Levano-Garcia et al. (2007). A análise da proteína SmATPDase2 prevê um único domínio transmembranar N-terminal semelhante ao descrito para isoformas CD39 de apirase humanas. A hipótese é que SmATPDase2 seja produzida por células subtegumentares, transportada através do tegumento, sendo finalmente segregado do exterior a partir do tegumento do meio. É possível que essa proteína execute uma função ATPDase2 semelhante ao CD39 solúvel humano, implicando na manutenção da homeostasia do sistema circulatório (Yeung et al., 2000; Hicks-Berger et al., 2000). A secreção de SmATPDase2 seria vantajosa ao parasito para evitar o recrutamento e a ativação plaquetária, que foi mostrado para mediar respostas citotóxicas a partir do hospedeiro (Boutet et al., 1986).

Nucleotídeos extracelulares agem como moléculas de sinalização na resposta imune de hospedeiros mamíferos e podem ser hidrolisados por ectonucleotidases (NTPDases) de parasitos. Foi observado que *T. cruzi* tem atividade ectonucleotidase na sua superfície e um gene de uma NTPDases foi identificado e clonado (TcNTPDase-1);

subsequentemente, a proteína recombinante foi expressa em uma célula bacteriana (Fietto et al., 2004). Nestes estudos, foi demonstrado uma correlação positiva entre hidrólise extracelular de ATP e a infectividade e virulência de *T. cruzi*, sugerindo que TcNTPDase-1 poderia ser um bom alvo para a produção de drogas anti-*T. cruzi*, principalmente porque anticorpos anti-TcNTPDase-1 diminui a taxa de infecção do parasito (Santos et al., 2009). Outros autores acreditam que a alta atividade ecto-ATPDase em patógenos é um comportamento adaptativo parasitário, que tem feito estes organismos mais virulentos, pois poderia interferir com sinais purinérgicos extracelular (Bisaggio et al., 2003;).

Recentemente, uma isoforma NTPDase ativa e antigênica, a NTPDase 1, foi caracterizada em promastigotas de *L. braziliensis* (Rezende-Soares et al., 2010), na primeira fase de interação hospedeiro-parasito, que inclui a modulação da resposta imune e a sinalização da célula hospedeira (Cuervo et al, 2009;. De Souza, 2008), e um domínio antigênico conservado (r82-121) de uma isoforma NTPDases específica foi identificado. Resultados apontam este domínio conservado da NTPDase como um alvo importante para a concepção de inibidores e possível aplicação dessas biomoléculas em protocolos experimentais de controle da doença (Vasconcelos et al. 2014).

1.6.2 Proteína de ligação ao GTP

As proteínas G, também conhecidas como proteínas de ligação a nucleotídeos de guanina, são uma família de proteínas que atuam como interruptores moleculares no interior das células e estão envolvidas na transmissão de sinais a partir de uma variedade de estímulos de fora da célula para o seu interior (Gerhard Krauss, 2008). A sua atividade é regulada por fatores que controlam a sua capacidade de se ligar e hidrolisar trifosfato de guanosina (GTP) em difosfato de guanosina (GDP) (Gerhard Krauss, 2008). As proteínas G pertencem ao maior grupo de enzimas, chamado GTPases (Gerhard Krauss, 2008). Dada a sua semelhança de sequência, de características bioquímicas e propriedades estruturais, as proteínas G assemelham-se fortemente à classe de *dinamina-like* GTPases, que medeiam processos celulares básicos que envolvem o remodelamento da membrana (Haller & Kochs, 2011). Além disso, estão intimamente associadas com membranas intracelulares, preferencialmente do compartimento intermediário do retículo endoplasmático e Golgi (Accola et al, 2002;. Stertz et al., 2006).

Várias subfamílias de pequenas GTPases são conhecidas nos eucariotos. De forma resumida, subfamílias Ras e Rho estão envolvidas nas vias de transdução de sinal

a partir da superfície da célula (Sprang, 1997). Ras está envolvida na divisão e diferenciação celular e Rho em organização do citoesqueleto e, provavelmente, motilidade celular (Hall, 1994). Por causa de seus inúmeros papéis na biologia celular, a compreensão das pequenas proteínas G em parasitos apresenta um grande potencial para aumentar nosso conhecimento na fisiologia celular do parasito, assim como fornecer importantes avanços nos processos vitais para a exploração do potencial terapêutico. A classe Rac da subfamília Rho também está envolvida na resposta ao estresse e transdução de sinal oxidativo (Field, 1999).

As proteínas G em *T. brucei* são 30% idênticas e 50% similares ao seu mais provável ortólogo funcional de mamífero (Bringaud et al., 1998; Field & Field, 1997). Elas contêm a sequência esperada para motivos GTPases e estão dispersas no genoma (Bringaud et al. 1998; Field & Field, 1997). Marcadores têm mostrado que a via endocítica dos tripanossomatídeos é de complexidade semelhante ao sistema dos eucariotos. Em *Leishmania*, dois Rab homólogos foram identificados. Um é altamente homólogo a YPT1 de *S. cerevisiae*, sugerindo um papel no transporte do complexo de Golgi, que é suportado por estudos de localização através de microscopia eletrônica, mostrando que a proteína está presente no complexo de Golgi do parasito (Cappai et al., 1993). Um segundo homólogo de Rab7, foi identificado por rastreamento aleatório de sequências principais expressas em *L. major* (Lewis et al., Abstract). A atividade GTPase presente na membrana de tripanosomas também foi aumentada quando as células foram expostas a soro fetal bovino, fator de crescimento epidérmico e bombesina (Hide 1998). Claramente, isto tem implicações importantes para sinalização e resposta do parasito para alterar as condições do hospedeiro.

A maioria das pequenas GTPases em eucariotos são modificadas pós-tradução pelo grupo prenilo para facilitar a sua ligação e localização específica nas membranas celulares. Protozoários parasitos não são exceção, por exemplo, *T. brucei* incorpora grupo prenilo em pelo menos 20 proteínas diferentes. A presença do sinal de prenilação (um motivo CAAX na extremidade C-terminal de uma proteína) está presente na maioria das pequenas GTPases sequenciadas até agora em protozoários parasitos. A inibição da farnesilação, tipo de prenilação na qual um grupo isoprenilo é adicionado a um resíduo de cisteína da proteína Ras, tem sido explorada como um meio de controlar e tratar células tumorais em sistemas de mamíferos (Leonard, 1997), e pelo menos um inibidor da farnesiltransferase está sendo testado em ensaios clínicos para o tratamento de vários cânceres em humano (Barinaga, 1997). Devido a alguns protozoários parasitos

entrarem rapidamente em divisão, em comparação com o hospedeiro, espera-se que estas estratégias possam ser estendidas para patógenos parasitos (Yokoyama et al., 1998). Alguns inibidores de farnesiltransferase inibiram o crescimento de *Giardia lamblia* (Lujan et al., 1995) e são tóxicos a uma baixa concentração para *T. brucei*, *T. cruzi*, *L. major* (Yokoyama et al., 1998) e *S. mansoni* (Loeffler & Bennett, 1997).

Claramente, ainda existe um grande número de genes de proteínas G a espera de ser descoberto em agentes etiológicos parasitos. O potencial uso destes nas vias de sinalização, no ciclo celular e tráfego de proteínas no citoesqueleto é muito grande, e a sua compreensão está apenas começando a ser vislumbrada e entendida, deixando muito espaço nas pesquisas científicas para o seu maior entendimento.

1.6.3 Proteína tirosina fosfatase

Um dos principais eventos que envolvem vias de transdução de sinais é a fosforilação de proteínas, reação regulada pela ação conjunta de proteínas quinases e fosfatases. Enquanto as proteínas quinases transferem fosfato do ATP para grupos hidroxila de resíduos de serina, treonina ou tirosina, as proteínas fosfatases hidrolisam o fosfato destes aminoácidos em proteínas sinalizadoras intracelulares específicas (Tonks, 1996).

O balanço entre a fosforilação e a desfosforilação de proteínas é a base para o controle de diversos eventos biológicos disparados por efetores extracelulares, como hormônios, mitógenos, carcinógenos, citocinas, neurotransmissores, substâncias ou metabólitos tóxicos (Jia, 1997). Muitas vias de sinalização celular são reguladas por fosforilação/desfosforilação de proteínas. A adição ou remoção do grupamento fosfato de uma proteína pode gerar um “motivo” de reconhecimento para interação proteína-proteína, controle da estabilidade proteica e, o mais importante, modular atividade de enzimas (Zhang, 2002).

Com base na função, estrutura, sequência, especificidade, ativadores e inibidores, as proteínas fosfatases podem ser agrupadas em dois grandes grupos: proteínas serina/treonina fosfatases e proteínas tirosina fosfatases (Harrison et al., 2002).

A fosforilação reversível de resíduos de tirosina desempenha papel crucial no controle de processos fundamentais, tais como proliferação, diferenciação e locomoção celular, além de regulação do metabolismo e expressão gênica. As proteínas tirosina fosfatases atuam como verdadeiros efetores negativos da transdução de sinal, desfosforilando proteínas-alvo específicas e, conseqüentemente, assegurando a curta

duração das fosforilações e o reduzido nível de tirosinas fosforiladas, o que as qualifica como possível alvo terapêutico em doenças em que ocorram alterações neste perfil de fosforilação (Hendriks et al., 2012; Ninfa & Dixon, 1994; Östman & Böhner, 2001).

Diversos estudos têm demonstrado que trofozoítos de *Entamoeba histolytica* secretam e apresentam em sua superfície proteínas do tipo tirosina fosfatases, as quais vem sendo descritas na literatura como importantes fatores de virulência em diversos microrganismos patogênicos (Andreeva & Kutuzov, 2008; Gomes et al., 2011; Whitmore & Lamont, 2012). A análise destas proteínas tem sido realizada em uma série de patógenos, porém pouco ainda se sabe acerca do papel fisiológico destas enzimas nestes parasitos. Uma das ferramentas utilizadas para a caracterização de fosfatases é a avaliação enzimática e funcional destas proteínas através de inibidores, quelantes de metal e/ou cátions divalentes, em diferentes condições de pH (Gomes et al., 2011). Em amebas, a proteína é expressa em níveis baixos, mas detectáveis. Um estudo com a proteína tirosina fosfatase recombinante de *E. histolytica* (rEhPRL) sugere fortemente que essa proteína pode desempenhar um papel importante na biologia e na resposta adaptativa do parasito para o meio ambiente do hospedeiro durante o desenvolvimento do abscesso hepático amebiano, participando assim do mecanismo patogênico (Ramírez-Tapia et al., 2015). Outros estudos demonstram uma rápida diminuição nos níveis de fosforilação de resíduos de tirosina em proteínas de células-alvo após o contato com *E. histolytica*. Estas fosfatases têm sido descritas como tendo importante papel na patogênese da amebíase (Fonseca, 2003).

Os agentes patogênicos frequentemente exploram vias de sinalização de acolhimento para propagar a sua infecção, pois estas vias regulam muitos processos de defesa celulares do hospedeiro (Alto & Orth, 2012). *Leishmania* ativa a proteína tirosina fosfatase SHP-1 em macrófagos do hospedeiro, que por sua vez inibem a ativação da resposta de defesa imune dos macrófagos. Estudos mostraram que para sobreviver e propagar dentro dos fagócitos, *L. infantum* subverte a ativação da sinalização de macrófagos através da ativação das proteínas tirosina fosfatases do hospedeiro (PTP1B, TC-PTP, e SHP-1) e de outras vias inibitórias, entre as quais SHP-1 é crítica (Lambertz et al., 2012). A ativação de SHP-1 inibe a MAPK, JAK-STAT, TLR, e vias IFN- γ , o que leva à redução da geração de espécies reativas de oxigênio e de óxido nítrico, inibindo assim as respostas imunes inatas (Shio et al., 2012).

Foi relatado também que a infecção por *Leishmania* induza rapidamente a atividade de proteínas tirosina fosfatases nas células dendríticas, levando a inativação de

MAPK (Contreras et al., 2014). A desfosforilação de moléculas associadas com a sinalização MAPK é acompanhada pela atividade aumentada da proteína tirosina fosfatase e alteração dos fatores de transcrição AP-1 e NF- κ B. Estes eventos foram também observados em macrófagos infectados com *L. mexicana*, em que ocorreu uma diminuição da translocação nuclear dos fatores de transcrição AP-1 e NF- κ B (Abu-Dayyeh et al., 2008).

Pelo fato de haver várias espécies de *Leishmania* que estão relacionadas às diferentes manifestações clínicas da doença, é difícil a obtenção de uma única estratégia capaz de diagnosticar, controlar e combater todas elas. Durante os últimos anos, nosso grupo vem desenvolvendo estudos com possíveis alvos para a identificação de novos antígenos com potencial uso na melhoria do diagnóstico das leishmanioses, através da produção de peptídeos e proteínas recombinantes. Sendo assim, esses genes foram selecionados como potenciais alvos considerando a na nossa hipótese de que proteínas do parasito homólogas as moléculas do hospedeiro seriam mais promissoras para a utilização em ensaios imunodiagnóstico.

2. JUSTIFICATIVA

O diagnóstico preciso das leishmanioses tem implicação em diversos aspectos clínicos e epidemiológicos, como, por exemplo, a avaliação das medidas de controle, eficácia de tratamento, diminuição da morbimortalidade, dentre outros. É importante ressaltar que essa parasitose tem uma base terapêutica de difícil acompanhamento, com efeitos colaterais, além da ocorrência de resistência aos fármacos utilizados, que é um fenômeno crescente em todas as formas da leishmaniose (Grogl et al., 1992). O diagnóstico rápido e acurado do agente etiológico é a chave para uma conduta de tratamento efetiva, evitando o uso de medicamentos que poderem resultar na seleção de cepas resistentes (Fernández-Robledo et al., 2010).

Outro ponto importante em um diagnóstico sensível e específico é o fato de poder evitar riscos de infecções durante a transfusão sanguínea, sendo este um desafio constante para os serviços de hemoterapia. Vários patógenos não pesquisados nas rotinas dos bancos de sangue (Proietti et al., 2007), além de doenças emergentes que podem afetar os receptores ou o aporte de doadores, precisam ser pesquisados quanto ao risco e impacto na segurança transfusional (Angulo, 2007). A LV compõe este grupo de doenças (Proietti et al., 2007). Outra consideração importante é o fato de que os testes utilizados para triagem de doadores possuem alta sensibilidade (Anvisa, 2004), produzindo, muitas vezes, resultados falsos positivos, ocasionando uma demanda reprimida, que, se corrigida, levaria a uma maior demanda de doadores aptos. Portanto, o investimento em pesquisas que desenvolvam melhores métodos diagnósticos a serem empregados nessas doenças é de grande importância, principalmente, testes capazes de identificar indivíduos assintomáticos. Mediante a situação atual de expansão da leishmaniose, cabe questionar e implementar testes que assegurem uma triagem adequada sem prejuízo ao banco, muito menos ao receptor.

Portanto, diante das dificuldades encontradas no controle dessa doença, e tendo em vista todas as informações referentes à escassez de testes diagnósticos que sejam 100% eficientes, torna-se importante o uso de novas estratégias no melhoramento das técnicas hoje disponíveis, como a busca por novos alvos diagnósticos. É preciso que estes alvos sejam mais sensíveis e específicos para detectar a infecção e sejam facilmente aplicados em larga escala. Adicionalmente, é desejável que os testes diagnósticos sejam de fácil produção e execução. O uso de peptídeos e proteínas recombinantes tem se mostrado vantajoso em relação aos extratos ou antígenos nativos

do parasito previamente usados, pois além de serem produzidos em larga escala e altamente purificados, eliminam a necessidade do cultivo do parasito, diminuindo a periculosidade de sua produção. Além disso, ensaios usando proteínas recombinantes ou peptídeos costumam ser mais específicos, e quando são utilizados em combinações de antígenos diferentes conseguem obter sensibilidade semelhante ou maior do que a dos testes realizados com frações do parasito, sendo também mais reprodutíveis.

Desta forma, o presente trabalho visa contribuir com o avanço no diagnóstico dessa parasitose por meio da produção e teste de novos antígenos.

3. OBJETIVO GERAL

Identificar e testar novos antígenos de *Leishmania* spp. com potencial uso no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral, baseado em proteínas do parasito com similaridade com moléculas do hospedeiro associadas à resposta imunológica.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar proteínas de *Leishmania* homólogas a proteínas de *Homo sapiens*, com função biológica associada a processos de defesa do hospedeiro;
- Obter proteínas recombinantes, através de expressão heteróloga em bactérias dos genes de *Leishmania*;
- Avaliar o potencial uso das proteínas selecionadas para o desenvolvimento de testes para diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral humana e canina.
- Identificar peptídeos, presentes nessas proteínas, com alto *score* de predição de epítomos de célula B, que sejam conservados entre espécies de *Leishmania* e que não possuam similaridade com o proteoma predito de *T. cruzi*, *H. sapiens* e *C. familiaris*.
- Validar por *immunoblotting* a reatividade dos peptídeos identificados com o soro de cães e humanos infectados com *L. infantum*, bem como a ausência de reconhecimento com soros de cães e humanos não infectados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Parasitos

No presente estudo, foram usados os parasitos *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904), *L. infantum* (MHOM/BR/1972/BH46) e *L. mexicana* (MNYC/BZ/62/M379) criopreservados, em nitrogênio, no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (UFMG). Promastigotas em fase logarítmica foram cultivadas em meio de cultura “Schneider Insect Medium” (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), com 10% de soro fetal bovino (Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). As culturas foram mantidas em estufa biológica BOD à temperatura de 23°C ± 1°C, sendo homogeneizadas constantemente por meio de agitador presente em seu interior.

4.2 Ferramentas de bioinformática para seleção das proteínas de *Leishmania*

Estudos prévios realizados em nosso laboratório demonstraram que fatores de virulência e genes *housekeeping* de *Leishmania* têm um elevado potencial para o sorodiagnóstico das leishmanioses (Menezes-Souza, et al., 2014; 2015). Para a seleção de possíveis alvos de *Leishmania* para uso no diagnóstico sorológico dessa parasitose, foram escolhidas proteínas do parasito com similaridade às proteínas de referência da espécie *H. sapiens*, depositadas no ImmunoneBase (<http://bioinf.uta.fi/ImmunomeBase/home.html>), o qual contém sequências de proteínas ou peptídeos intrinsecamente relacionadas ao sistema imunológico do hospedeiro e/ou a defesa contra patógenos (Rannikko et al., 2007), dentre um total de 1375 entradas presente neste banco.

Para tanto, as sequências das proteínas dos parasitos do gênero *Leishmania* usados neste trabalho foram previamente obtidas dos proteomas preditos disponíveis no banco de dados TriTrypDB (<http://tritrypdb.org>), a partir do qual foi gerado um sub-banco após a exclusão de pseudogenes e genes parciais. Posteriormente, as sequências de proteínas foram submetidas à análise de similaridade, utilizando o algoritmo BLASTp (*Basic Local Alignment Search Tool*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Altschul et al., 1997), contra sequências do banco de dados ImmunoneBase (<http://bioinf.uta.fi/ImmunomeBase/home.html>). A partir desta etapa, foram selecionadas três proteínas de *Leishmania* com similaridade de sequência com proteínas

de referência depositadas no ImmunoneBase das espécies *H. sapiens*, utilizando um *cutoff* de *e-value* menor do que $1e^{-50}$.

Para averiguar *in silico* a antigenicidade das proteínas selecionadas para avaliar o seu potencial uso no diagnóstico das leishmanioses, a sua sequência proteica completa foi submetida aos programas BepiPred (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>), para a predição de epítomos lineares de célula B (Larsen *et al.*, 2006), e IUPred (<http://iupred.enzim.hu/>), para a predição de desordem (ausência de estrutura secundária) (Dosztányi, 2005).

4.3 Extração de DNA de parasitos

Formas promastigotas de *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. mexicana* foram utilizadas para extração de DNA total para ser usado como *template* em reações de PCR para obtenção da região codificadora das proteínas de interesse. Nesta etapa, a extração de DNA total foi realizada utilizando 1×10^8 promastigotas e o kit “*Genomic DNA from tissue*” (Macherey-Nagel, Duren, Germany), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de DNA extraídas foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000 (Wilmington, EUA) e armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4 Desenho de primers para a amplificação dos genes utilizados na expressão heteróloga

Primers para a amplificação dos genes que codificam a ATP difosfohidrolase (Ecto) de *L. infantum* (LinJ.15.0030), a proteína de ligação ao GTP (Myxo) de *L. infantum* e *L. mexicana* (LinJ.29.2310 e LmxM.08_29.2200, respectivamente) e a proteína tirosina fosfatase (Tyro) de *L. braziliensis* (LbrM.35.5630) foram desenhados, de forma a amplificar toda a sua região codificadora, desde o ATG inicial até o seu códon de terminação. Os *primers* foram desenhados utilizando o software Gene Oligo Explorer (versão 1.5, 2010). As sequências de nucleotídeos referentes aos genes avaliados nesse estudo foram obtidas do banco de dados TriTrypDB (<http://tritrypdb.org>). Para facilitar a transferência dos amplicons entre os vetores de clonagem, pGEM-T Easy (Promega, Madison, EUA), e de expressão pET28a-TEV (CeBiME, Campinas, Brasil) foram adicionados sítios para enzimas de restrição nas extremidades 5' dos *primers* (Tabela 1).

Tabela 1: Sequência de *primers forward e reverse*, sítio para enzima de restrição e tamanho do amplicon referente aos genes avaliados para expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*.

Gene ID (TriTrypDB)	Amplicon (pb)	Orientação	Sequência do primer	Sítio da enzima de restrição
LinJ.15.0030 (EctoLi)	1278	Fwd	5'TTTCATATGCGACCGTACTCCTCAGTGCG 3'	<i>NdeI</i>
		Ver	5'CTCGAATTCTCATTCCATCTTGAGCACGAA 3'	<i>EcoRI</i>
LinJ.29.2310 (MyxoLi)	2103	Fwd	5'ACTCATATGGACCAGTTGATTGGTGTGATC 3'	<i>NdeI</i>
		Rev	5'GTTGTGCGACTTAGGTAGACGAGGGCGGTTC 3'	<i>SalI</i>
LmxM.08_29.2200 (MyxoLm)	2076	Fwd	5'ACTCATATGGACCAGTTGATTGGTGTGATC 3'	<i>NdeI</i>
		Ver	5'GTTGTGCGACTTAGGTAGACGAGGGCGGTTC 3'	<i>SalI</i>
LbrM.35.5630 (TyroLb)	1500	Fwd	5'ACACATATGCACAAAAGGCTACGCAAGGAG 3'	<i>NdeI</i>
		Ver	5'GATGAATTCCTAGCTGCCACCAATGCCG 3'	<i>EcoRI</i>

4.5 Amplificação por PCR e purificação dos amplicons

A amplificação dos amplicons que codificam as sequências de proteínas a serem expressas foi realizada utilizando 100 ng de DNA, 10 pmol dos *primers* e a enzima “*Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity*” (Invitrogen, São Paulo, Brasil), perfazendo um volume final de 50 µL e utilizando os reagentes e as condições de termociclagem recomendados pelo fabricante. Em seguida, aos amplicons obtidos foi adicionado o tampão de amostra “*6x DNA Loading Dye*” (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA). Posteriormente, os produtos de amplificação resultantes das PCRs foram submetidos à separação em gel de agarose 0,7% a 100 V em tampão TAE 1X (4,8 g/L Tris-base pH 8,0; 1,14 mL ácido acético glacial; 2 mL EDTA 0,5 M), contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL).

Após a separação em gel de agarose, as bandas de tamanho esperado foram excisadas do gel, utilizando uma lâmina de bisturi estéril. O bloco de agarose obtido foi submetido ao protocolo do QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), para obtenção do DNA purificado. As amostras de DNA purificadas foram dosadas utilizando o equipamento “*Nanodrop N2000*” (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA).

4.6 Ligação dos amplicons ao vetor de clonagem pGEM-T Easy

Os amplicons purificados foram clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega Madison, EUA), através de incubação por 16 horas a 4 °C com a enzima T4 DNA ligase, seguindo as instruções do fabricante. Este vetor possui gene de resistência à

ampicilina, que permite a seleção de transformantes positivos. Além disso, a escolha deste como vetor de clonagem se deve a sua estrutura, que possui uma timina não pareada em suas extremidades 5', permitindo a ligação coesiva da adenina não pareada adicionada pela *Taq* DNA polimerase na extremidade 3' do amplicon (Figura 2).

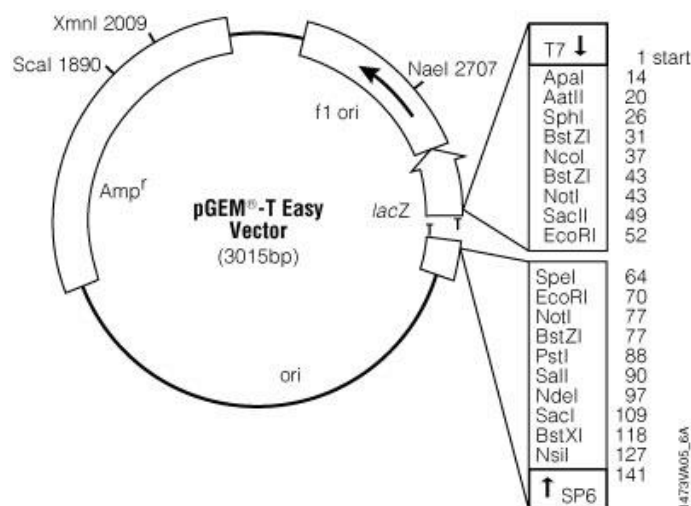


Figura 2: Mapa do vetor pGEM-T Easy (Promega). Neste mapa estão evidenciados o gene de resistência à ampicilina (Amp^r), a origem de replicação do vetor (*ori*), duas timina não pareadas e a região do sítio múltiplo de clonagem com seus sítios de clivagem de endonucleases.

4.7 Transformação de bactérias por eletroporação

Cerca de 5 μ L dos sistemas de ligação foram incubados por 5 minutos no gelo com 50 μ L de bactérias eletrocompetentes de *E. coli*, da cepa XL1-Blue (Phoneutria, Belo Horizonte, Brasil) para clonagem dos genes, ou das cepas BL-21 Star (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) ou Arctic Express (DE3) (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA) para expressão dos alvos. Após este período, as amostras foram transferidas para Micro Pulser Cuvettes (Bio-Rad, Califórnia, EUA) de 0,1 cm, e submetidas a um pulso (1,8 kV) em um eletroporador Micro Pulser (Bio-Rad, Califórnia, EUA) permitindo a interiorização do plasmídeo. Após a eletroporação, foram adicionados 300 μ L do meio de cultura 2xYT líquido, seguido por incubação durante uma hora a 37 $^{\circ}$ C em agitação a 180 rpm em *shaker* de bancada. Após este período, as amostras foram plaqueadas em meio sólido 2xYT-ágar 1,5% com ampicilina (100 μ g/mL) para o vetor pGEM ou kanamicina (50 μ g/mL) para o vetor pET28a-TEV. As placas foram colocadas em estufa durante 12-16 horas, para obtenção de colônias isoladas.

Para a identificação dos transformantes positivos, estas colônias foram submetidas à PCR de colônia utilizando *primers* universais M13, quando o vetor utilizado era o pGEM-T Easy, ou T7, quando o vetor era o pET28a-TEV.

4.8 Obtenção dos plasmídeos recombinantes

Os clones positivos obtidos nas PCRs de colônia foram inoculados em 5 mL de meio 2xYT, contendo o antibiótico específico para cada vetor, e cultivados durante 12-16 horas à 37 °C em agitação de 180 rpm. A extração dos plasmídeos foi realizada utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha).

4.9 Digestão dos vetores de clonagem e expressão com enzimas de restrição

Os plasmídeos pGEM-T Easy contendo os insertos, assim como o vetor de expressão pET28a-TEV, foram submetidos à dupla digestão, durante 16 horas à 37 °C, com as enzimas de restrição específicas para cada amplicon. Para a obtenção das proteínas MyxoLi e MyxoLm truncadas, foi feita a digestão das respectivas proteínas completas com as enzimas *NdeI* e *EcoRI*. Após a digestão, as amostras foram submetidas à eletroforese e purificação em gel de agarose, como previamente descrito.

4.10 Clonagem dos genes codificadores das proteínas selecionadas no vetor pET28a-TEV

O vetor pET28a-TEV foi produzido pelo centro de Biologia Molecular e Estrutural (CeBiME, Campinas, Brasil) e é derivado do vetor pET28a (Novagen, Darmstadt, Alemanha). Este vetor contém o sítio de clivagem para trombina substituído pelo da protease do vírus *etch* do tabaco (*tobacco etch virus* - TEV), além de uma cauda de 6 resíduos de histidina N-terminal como fusão, que será posteriormente utilizada na purificação da proteína recombinante (Carneiro et al., 2006).

A ligação entre os fragmentos obtidos do vetor pGEM-T Easy por digestão enzimática e o vetor pET28a-TEV, também digerido com as mesmas enzimas de restrição, foi realizada através de suas extremidades coesivas, por incubação a 4 °C durante 16 horas com a enzima T4 Ligase (Promega, Wisconsin, EUA), em tampão específico (Tris-HCl 30 mM (pH 7,8 a 25 °C), MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM e ATP 10 mM). Após a incubação, o produto de ligação foi utilizado na transformação de bactéria BL-21 Star ou Arctic Express através de eletroporação. A identificação de transformantes positivos foi realizada por PCR de colônia.

4.11 Sequenciamento e análise das sequências clonadas no vetor pET28a-TEV

Três clones derivados da clonagem de cada gene foram sequenciados para confirmação da identidade do gene clonado e verificação da correta fase de leitura. O sequenciamento dos clones foi realizado pela empresa Macrogen (Seoul, Coréia do Sul) em sequenciador automático “ABI Prism[®] 3730xl DNA Analyser” (PE Applied Biosystems, Foster City, EUA), utilizando os *primers* M13 *forward* e *reverse* para o vetor pGEM-T Easy ou T7 *forward* e *reverse* para o vetor pET28a-TEV. As sequências obtidas foram analisadas utilizando o software Sequencher (Gene CodesAnn Arbor, EUA), no qual sequências de baixa qualidade e sequências do vetor foram retiradas. Após o processamento, as sequências foram submetidas à pesquisa de homologia usando o programa BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) contra o banco de dados do genoma de *Leishmania* disponível no banco de dados TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/>) (Aslett et al., 2010) para confirmação da identidade dos genes clonados.

4.12 Expressão Heteróloga

4.12.1 Indução da expressão das proteínas recombinantes

Para indução da expressão das proteínas recombinantes, colônias isoladas em cada sistema de clonagem foram inoculadas em 10 mL de meio de cultura 2xYT/kanamicina 50 µg/mL e gentamicina 20 µg/mL, para bactérias da cepa Arctic Express, e incubadas *overnight* a 37 °C sob agitação a 200 rpm. Em seguida, as culturas foram inoculadas em erlenmeyer contendo 500 mL de meio 2xYT/kanamicina 50 µg/mL e cultivadas até a densidade óptica (DO₆₀₀) de 0,6-0,8, quando então a expressão foi induzida com a adição de 1 mM de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) (Invitrogen, São Paulo, Brasil) por 3 horas a 37°C, cepa BL-21 Star, ou 24 horas a 12 °C, cepa Arctic Express, sob agitação a 200 rpm. Após o período de indução, a cultura foi centrifugada por 6000 x g, por 30 minutos a 4 °C em centrífuga “5804R” (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) e, em seguida, congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80 °C. Alíquotas da cultura imediatamente antes da adição de IPTG, e após o período de indução da expressão, foram também congeladas para serem utilizadas como controle de expressão.

4.12.2 Lise das bactérias e teste de solubilidade das proteínas recombinantes

Para avaliar a solubilidade das proteínas recombinantes, uma alíquota de cada cultura mantida a -80 °C foi descongelada e ressuspensa em 5 mL de PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 1,8 mM; pH 7,4) para cada 50 mL de

cultura, na presença de Lisozima (100 µg/mL), sendo, então, homogeneizados e deixados em repouso por 15 minutos. Após o repouso, as alíquotas foram submetidas a 5 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria à 37 °C e passadas exaustivamente em seringas de insulina (1mL/cc,261/2 G, 13x0,45) para fragmentação de seu DNA genômico. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 14000 x g a 4°C, para separação das frações solúvel (sobrenadante) e insolúvel (*pellet*). Amostras destas duas frações foram analisadas em eletroforese gel de poliacrilamida SDS-PAGE para avaliar em qual fração a proteína recombinante se encontra. Quando a proteína se apresentou insolúvel, foi adicionado ao tampão de ressuspensão 8 M de ureia para torná-la solúvel.

4.12.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

As amostras obtidas nas expressões e purificações foram submetidas à separação por eletroforese em gel de poliacrilamida, utilizando bis-acrilamida 40%. O gel de separação 12,5% foi preparado utilizando Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 e SDS 0,01%; persulfato de amônio 0,5 v/v e TEMED 0,05 v/v. O gel de concentração foi preparado de modo semelhante ao de separação, mas utilizando o tampão Tris-HCl 0,5M pH 6,8. Às amostras obtidas da indução e do teste de solubilidade, foi adicionado o tampão de amostra (SDS 10%; Tris-HCl 0,5 mM pH 6,8; azul de Bromofenol 1%; 2-β-mercaptoetanol 5%; glicerol 10%). Em seguida, as amostras foram fervidas durante 5 minutos para desnaturação das proteínas e aplicadas no gel para separação eletroforética. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1% e pH 8,3) submetida à voltagem constante de 200 V. Após a corrida, os géis foram corados por incubação por 2-16 horas com a solução de *Coomassie Blue* (Coomassie Brilliant Blue G-250 0,25%; metanol 50%; ácido acético 10%), e então, descorados em solução metanol 30% e ácido acético 10%.

4.12.4 Purificação de proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade

A purificação das proteínas recombinantes foi realizada por cromatografia de afinidade, em colunas HisTrap HP de 5 mL (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, EUA), no sistema ÄKTAprime plus (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, EUA). Estas colunas HisTrap possuem em seu interior uma matriz de níquel-sefarose, que consiste em esferas de agarose contendo em sua superfície íons Ni⁺² imobilizados. As proteínas recombinantes expressas no vetor pET28a-TEV apresentam uma cauda de histidina em sua região N-terminal, e como o aminoácido histidina possui grande

afinidade pelo íon Ni^{+2} , estas proteínas ficam retidas, por afinidade, na coluna de purificação. Os extratos proteicos do lisado bacteriano contendo as proteínas recombinantes foram aplicados em uma coluna HisTrap HP de 5 mL (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, EUA) para a captura das proteínas recombinantes. Para a remoção de proteínas endógenas da bactéria, a coluna foi primeiramente lavada com 5 volumes de coluna do tampão A (fosfato de sódio 20 mM; NaCl 500 mM; imidazol 30 mM), com baixa concentração de imidazol. A eluição foi realizada através de gradiente crescente de tampão B (fosfato de sódio 20 mM; NaCl 500 mM; imidazol 500 mM), partindo de 0% de concentração e atingindo 100% em 20 mL de corrida. O imidazol compete com a cauda de histidina pela ligação ao níquel na coluna, liberando a proteína recombinante da matriz e permitindo sua obtenção na fração eluída. Todas as frações obtidas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 12,5%.

4.12.5 Ensaio de dosagem das proteínas recombinantes

As amostras das proteínas recombinantes purificadas foram dosadas pelo método colorimétrico do ácido bicinconínico (BCA) utilizando o kit “*BCA Protein Assay Reagent*” (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA), de acordo com recomendações do fabricante.

4.13 Peptídeos

4.13.1 Seleção dos peptídeos

Para a seleção de peptídeos conservados entre as diversas espécies de *Leishmania* para o sorodiagnóstico da leishmaniose visceral, inicialmente as sequências das três proteínas utilizadas neste trabalho das espécies *L. amazonenses*, *L. braziliensis*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. major*, *L. mexicana* e *T. cruzi* clone CL Brener e cepa Sylvio foram recuperadas do banco de dados TriTrypDB (<http://tritrypdb.org>) versão 9.0 e as sequências ortólogas de *H. sapiens* e *C. familiaris* foram recuperados do GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). As sequências foram alinhadas pelo programa Clustal 2.1 (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) e submetidas à predição de epítomos de célula B pelo programa BepiPred (Larsen et al., 2006). Foram considerados potenciais epítomos as sequências contínuas de pelo menos 11 aminoácidos com valor de predição de cada aminoácido acima de 1,3, valor que representa 96% de sensibilidade na identificação de epítomos (Larsen et al., 2006). Potenciais epítomos conservados entre as proteínas homólogas de parasitos do gênero de *Leishmania* e polimórficas entre o clone de CL Brener e a cepa Sylvio de *T. cruzi*, *H.*

sapiens e *C. familiaris* foram selecionados como alvos para o sorodiagnóstico (Figura 3). A especificidade dos peptídeos para *Leishmania* foi confirmada utilizando o programa BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Altschul et al., 1997) para a busca destas sequências no proteoma predito baseado no genoma das diferentes cepas de *T. cruzi*, *H. sapiens* e *C. familiaris*.

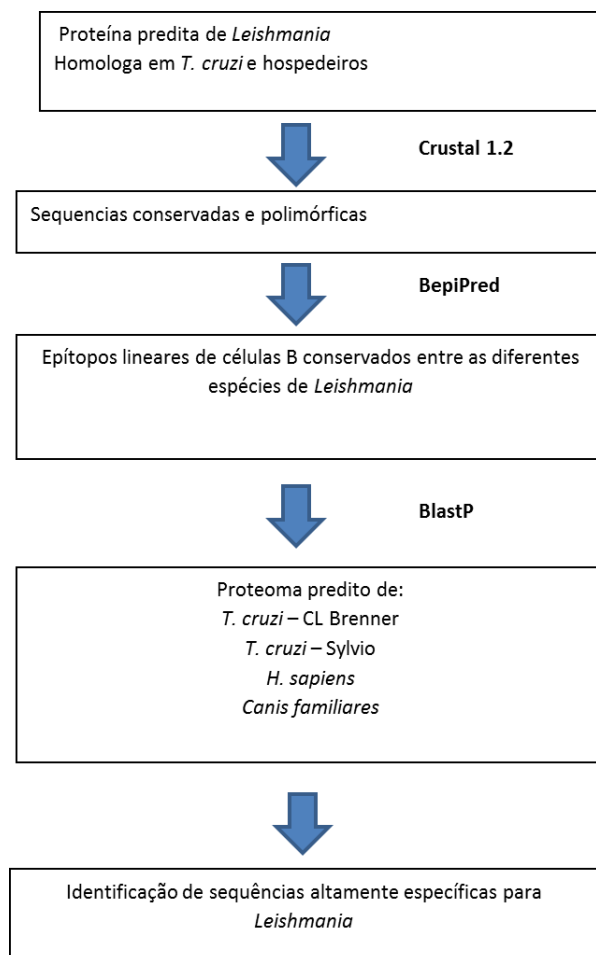


Figura 3: Pipeline para identificação de peptídeos *Leishmania* específicos.

4.13.2 Spot síntese

Para a confirmação *in vitro* da especificidade e sensibilidade dos peptídeos selecionados na triagem por bioinformática, foram sintetizadas membranas de celulose pré-ativadas e derivatizadas, contendo os peptídeos com maior *score* de predição de epítipo de célula B provenientes das análises de bioinformática. Os peptídeos foram sintetizados nas membranas de celulose pré-ativadas de acordo com a técnica de *spot* síntese (Frank, 2002). As membranas foram sintetizadas em colaboração pelo Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – PPGCS da UNESC.

4.13.3 Immunoblotting

Para averiguar a capacidade de discriminação dos peptídeos entre o soro de cães e humanos infectados com *L. infantum* e não infectados, as membranas de peptídeos foram submetidas a experimentos de reatividade contra o *pool* de soro dos mesmos. Para isto, a membrana foi bloqueada com solução de PBS pH 7,2-7,4 contendo 5% de BSA e 4% de sacarose, durante 12-16 horas sob agitação. Em seguida, a mesma foi lavada 3 vezes com a solução de lavagem (PBS pH 7,2-7,4 + 0,1% de tween20) por 10 minutos e incubada por duas horas com o *pool* de soro infectados de cão ou humano diluídos 1:500 na solução de lavagem (PBS pH 7,2-7,4 + 0,1% de tween20). Após a incubação foram realizadas mais 3 lavagens de 10 minutos com a solução de lavagem seguida por incubação por uma hora com o anticorpo secundário anti-IgG de cão ou de humano conjugado a peroxidase em diluições de 1:10.000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). A membrana foi novamente lavada 3 vezes com a solução de lavagem e finalmente revelada por quimiluminescência, através da adição de ECL Plus Western blotting Detection System (GE-Healthcare, Fairfield, Connecticut, EUA) utilizando o foto documentador ImageQuant LAS 4.000 (GE-Healthcare, Fairfield, Connecticut, EUA), com exposição por 1 minuto.

Como controles negativos, os *pools* de soros de não infectados passaram pelos mesmos processos previamente descritos. Após a revelação, a membrana foi regenerada (remoção de todos os anticorpos ligados a ela) para que pudesse ser novamente utilizada com outro *pool* de soros. Para isso, a membrana foi inicialmente lavada três vezes com N,N-dimetilformamida (DMF) por 10 minutos, seguida por incubação por 12-16 horas com a solução desnaturante (ureia 8M e SDS 10%) e mais duas lavagens com a solução desnaturante por 30 minutos cada. A membrana foi, então, lavada por 2 minutos com água deionizada seguida por três lavagens com a solução ácida, contendo 55% de etanol, 35% de água deionizada e 10% de ácido acético. Finalmente, a membrana foi lavada por 2 minutos com água deionizada, seguida por 2 lavagens de 5 minutos com etanol para retirar a umidade, secada a temperatura ambiente e armazenada seca a 4 °C ou prontamente reutilizada.

4.14 Preparação do antígeno bruto

O antígeno bruto de promastigotas de *L. infantum* foi preparado para comparar o resultado do diagnóstico sorológico da LVH com as proteínas recombinantes utilizadas neste estudo. Os parasitos foram lisados com 5 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 37°C, e posteriormente centrifugado por 6000 x g, 4°C por

15 min. O sobrenadante foi coletado e o conteúdo de proteína foi quantificado pelo método colorimétrico do BCA, utilizando o kit “*BCA Protein Assay Reagent*” (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA).

4.15 Ensaio de ELISA no diagnóstico da leishmaniose visceral

Os ensaios de ELISA foram realizados utilizando as proteínas recombinantes produzidas neste estudo ou o extrato bruto do parasito, como antígeno para diagnóstico sorológico. Placas de ELISA de 96 poços foram sensibilizadas por 12-16 horas a 2-8 °C com 50 ng de proteína recombinante ou 2000 ng de extrato bruto diluído em tampão carbonato (Na_2CO_3 0,16%, NaHCO_3 0,24% e pH 9,6). Após a sensibilização, a placa foi bloqueada com PBS acrescido de 1,0% de BSA (Invitrogen, São Paulo, Brasil) durante 1 hora a 37°C. Após o bloqueio, toda a solução dos poços foi removida e em seguida foram adicionados aos poços 100 µL dos soros diluídos 1:100 em PBS com 1,0 % de BSA e incubados a 37 °C por 1 hora. As placas foram lavadas 5 vezes com a solução de lavagem (PBS-0,05% Tween20) e, em seguida, foi adicionado aos poços 100 µL do anticorpo anti-IgG canino ou humano diluído 1:5000 em PBS-BSA 1,0%. Após incubação a 37°C por 1 hora, as placas foram novamente lavadas por 5 vezes com a solução de lavagem, e posteriormente foi adicionado 50 µL da solução reveladora (ácido cítrico 0,1 M, Na_2PO_4 0,2 M, OPD 0,05% e H_2O_2 0,1%). As placas foram incubadas a temperatura ambiente ao abrigo de luz por 15 minutos com a solução reveladora, quando a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de H_2SO_4 2 M. A absorbância resultante foi obtida em leitor de ELISA a 490 nm.

Os soros humanos foram obtidos a partir do banco de soros do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasito (ICB/UFMG) e do Hospital Universitário de Montes Claros (Minas Gerais, Brasil). O painel consistiu em: 44 amostras de pacientes com LVH, 8 amostras de pacientes com doença de Chagas (DC) na fase crônica, para avaliação de reatividade cruzada com *T. cruzi*, e 24 amostras de humanos não infectados que foram utilizados com controle negativo (CN) neste estudo.

O painel de soros caninos consistiu de 62 amostras, provenientes de cães naturalmente infectados com *L. infantum*. Os cães infectados com *Leishmania* são de áreas endêmicas para LVC no Estado de Minas Gerais. O principal critério de inclusão para amostras de soro LVC utilizados neste estudo foi a positividade parasitológica para a espécie *L. infantum*, por análise microscópica de aspirados de medula óssea confirmada de qPCR. Cães machos e fêmeas residentes em área não endêmica para LVC e com resultados negativos para *Leishmania* em esfregaços de tecido (medula

óssea) foram considerados não-infectados e, portanto, foram utilizados como controle negativo CN (n = 39). As amostras de cães naturalmente infectados com *Babesia* sp. foram incluídas para avaliar possível reatividade cruzada. Os soros de *Babesia* sp. Positivos utilizados no experimento tiveram origens diferentes devido a dificuldade em conseguir amostras em que o cão tenha sido diagnosticado apenas com *Babesia* sp. e que este seja um diagnóstico de certeza. Os soros utilizados nos testes com os antígenos (proteínas recombinantes e extrato bruto) (n = 11) foram doados pelo Centro Diagnóstico Veterinário sediado em Vitória-ES. Os soros utilizados no teste com o kit EIE-LVC (Bio-Manguinhos) (n = 15) foram doados pelo Prof. Dr. Rodolfo Giunchetti, do Departamento de Morfologia da UFMG.

4.16 Análise estatística dos dados

Para a análise estatística dos dados gerados neste trabalho foi utilizado o *software* GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Inc, EUA) e o programa Microsoft Excel 2010 para o processamento e organização dos dados de absorbância gerados pelo ELISA. Todas as amostras de soros deste trabalho foram testadas em duplicata.

Para a comparação entre os resultados positivos e negativos, primeiramente foi realizado um teste de Kolmogorov-Smirnov para a determinação da normalidade da amostra. Caso a distribuição dos dados apresentasse distribuição normal, a comparação entre os grupos foi realizada através do teste T de Student não-pareado para comparação entre 2 testes e ANOVA quando foram comparados mais de 2 grupos experimentais, utilizando como pós teste para a comparação entre todas as variáveis o teste de Tukey. Quando a distribuição dos resultados apresentou distribuição não normal, foi utilizado o teste de Mann-Whitney para a comparação entre 2 valores ou o Kruskal-Walis, com o pós teste de Dunns, quando foram comparados mais de 2 valores. Valores de “p” inferiores a 0,05 foram considerados como significativos.

4.16.1 Avaliação do desempenho do teste diagnóstico

Para avaliar o desempenho das proteínas recombinantes no ELISA para diagnóstico, foram calculados os parâmetros sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia (ACC), a partir da Tabela 2 seguinte:

Tabela 2: Categorias de resultados de um teste diagnóstico em uma população de infectados e não infectados.

	Presença da infecção	

		Presente	Ausente	Total
Resultado do ELISA	Positivo	Verdadeiro positivo (A)	Falso positivo (B)	(A+B)
	Negativo	Falso negativo (C)	Verdadeiro negativo (D)	(C+D)
Total		(A+C)	(B+D)	(A+B+C+D)

Especificidade: $E=D/(B+D)$

Sensibilidade: $S=A/(A+C)$

Valor Preditivo Positivo: $VPP=A/(A+B)$

Valor Preditivo Negativo: $VPN=D/(C+D)$

Acurácia: $ACC=(A+D)/(A+B+C+D)$

O valor de *cutoff* definido neste trabalho foi obtido com base na melhor relação de sensibilidade e especificidade utilizando a curva ROC (*Receiver Operator Curve*). A eficiência do teste é dada com base na área sob o gráfico, onde o valor de 1 corresponde a sensibilidade e especificidade de 100% e o valor de 0,5 corresponde a um teste incapaz de discriminar as amostras positivas das negativas. As qualidades de um teste com base na área sob o gráfico da curva ROC são:

1,0 – 0,9 = Teste excelente

0,9 – 0,8 = Teste bom

0,8 – 0,7 = Teste razoável

0,7 – 0,6 = Teste ruim

0,6 – 0,5 = Teste falho

5. RESULTADOS

5.1 Análise das proteínas de *Leishmania* homólogas a *Homo sapiens*

Para a seleção de alvos de *Leishmania* com potencial uso no diagnóstico sorológico das leishmanioses, foram escolhidas proteínas do parasito com similaridade às proteínas de referência da espécie *H. sapiens*, depositadas no banco de dados ImmunoneBase, que contém sequências de proteínas relacionadas ao sistema imunológico do hospedeiro. Dentro do critério de seleção utilizado, foi encontrado um total de 57 proteínas de *H. sapiens* que apresentaram homologia com 33 proteínas do proteoma predito de *Leishmania*.

A partir de então, inicialmente foi realizado uma busca de domínios conservados entre as proteínas homólogas utilizando o programa Pfam, seguido de uma revisão bibliográfica a respeito do papel biológico dessas proteínas sobre o sistema imunológico. Assim sendo, foram incluídos no estudo três proteínas de *Leishmania*: ATP difosfohidrolase (neste trabalho referida como Ecto), proteína de ligação ao GTP (Myxo) e proteína tirosina fosfatase (Tyro).

Após a seleção das proteínas que seriam expressas de forma recombinante, foi realizada a determinação *in silico* de sua antigenicidade. Para isso, a sequência completa de cada proteína selecionada foi submetida aos programas BepiPred, para a predição de epítomos lineares de célula B, e IUPred, para a predição de desordem estrutural (Figura 4). Todas as proteínas apresentaram diversos epítomos lineares de célula B, assim como muitas regiões desordenadas. Como a predição de epítomos de célula B é baseada na sequência linear da proteína (sequência primária), a sobreposição de regiões desordenadas e com alto *score* de predição de epítomo de célula B aumenta a acurácia do resultado de predição de epítomos.

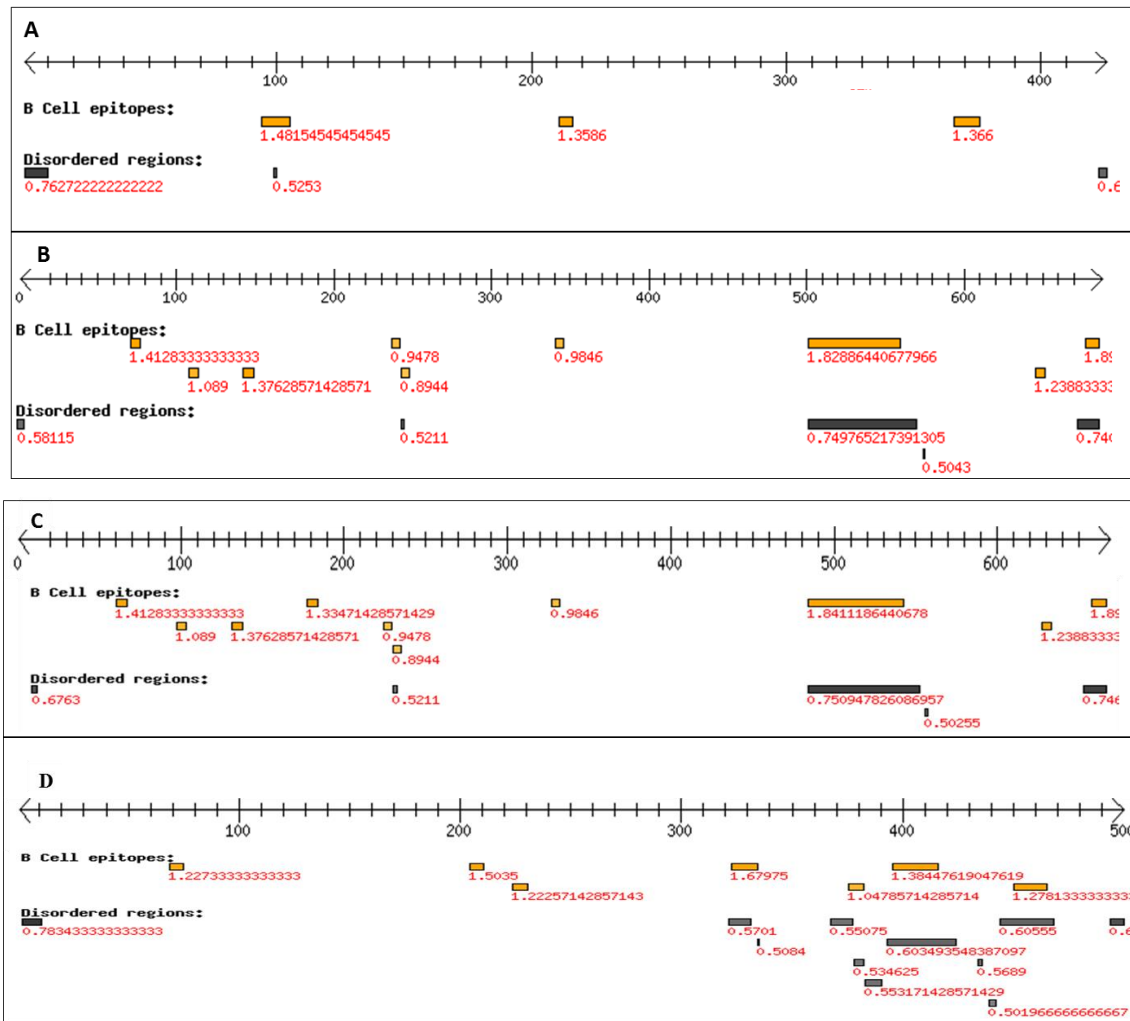


Figura 4: Predição de epítomos lineares de célula B e de desordem estrutural das proteínas: (A) ATP difosfohidrolase (LinJ.15.0030) de *L. infantum*; (B) proteína de ligação ao GTP (LinJ.29.2310) de *L. infantum*; (C) proteína de ligação ao GTP (LmxM.08_29.2200) de *L. mexicana*; e (D) proteína tirosina fosfatase (LbrM.35.5630) de *L. braziliensis*. Os blocos em laranja representam os epítomos lineares de células B e em preto as regiões de desordem.

5.2 Desenho de primers e amplificação dos genes de *Leishmania* para clonagem no vetor de expressão

Após a seleção dos alvos com potencial uso no sorodiagnóstico da leishmaniose, foram desenhados primers para amplificação da região codificadora desses genes. Foram adicionados às extremidades 5' dos primers os sítios de restrição para as enzimas *NdeI* (primer F) e *EcoRI* ou *SalI* (primer R) para facilitar a transferência dos amplicons entre os vetores de clonagem, pGEM-T Easy (Promega), e de expressão, pET28a-TEV (CeBiME, Campinas/SP).

Os genes foram inicialmente amplificados por PCR, a partir dos primers específicos capazes de flanquear a região codificadora, utilizando a enzima *Taq High-Fidelity* e o DNA genômico de *L. infantum* (MHOM/BR/1972/BH46), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904), e *L. mexicana* (MNYC/BZ/62/M379), como molde.

Após separação eletroforética em gel de agarose, foi possível verificar que todos os produtos de PCR amplificados apresentaram bandas de tamanho concordante com a anotação destes genes no banco de dados do TriTrypDB, sendo: 1278 pb para ATP difosfohidrolase de *L. infantum*; 2103 pb em *L. infantum* e 2076 pb em *L. mexicana* para o gene que codifica a proteína de ligação ao GTP; e 1500 pb para a proteína tirosina fosfatase de *L. braziliensis* (Figura 5). A presença da banda mais forte com tamanho concordante com o esperado indica boa especificidade dos *primers* quanto ao anelamento nas regiões de interesse. Em seguida, as bandas de tamanhos esperados foram excisadas do gel de agarose e os amplicons purificados foram utilizados para a reação de ligação com o vetor de clonagem, pGEM-T Easy.

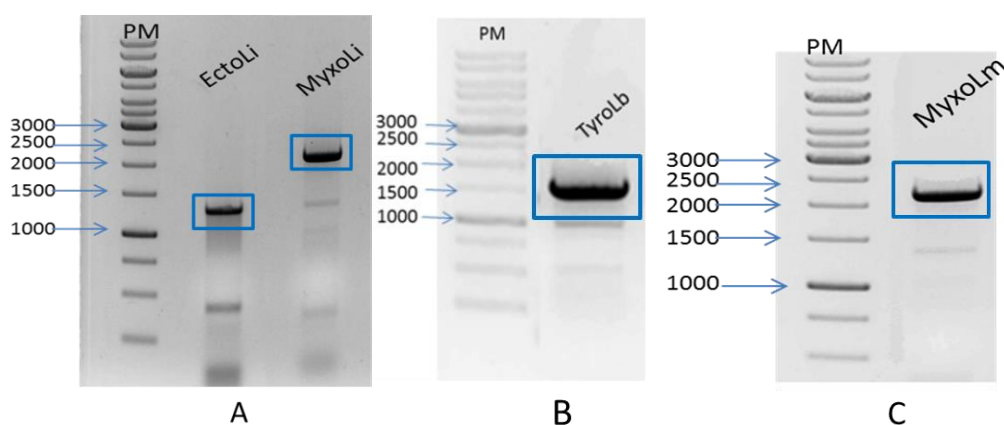


Figura 5: Análise eletroforética em gel de agarose 0,7% dos produtos de amplificação dos genes candidatos à expressão heteróloga. As bandas de tamanhos esperados foram amplificadas por PCR: (A) EctoLi (1278 pb) e MyxoLi (2103 pb) a partir do DNA genômico de *L. infantum*; (B) TyroLb (1500 pb) a partir do DNA de *L. braziliensis*; e (C) MyxoLm (2076 pb) a partir de DNA de *L. mexicana*. As bandas indicadas foram excisadas do gel e purificadas para posterior clonagem no vetor pGEM-T Easy.

5.3 Digestão, clonagem e subclonagem dos genes de *Leishmania* para a expressão heteróloga

Os produtos de PCR obtidos para os genes de interesse foram purificados do gel de agarose, ligados ao vetor pGEM-T Easy (Promega) e utilizados na transformação de *E. coli*, da cepa XL1-Blue. Para verificar quais clones tinham recebido o inserto de interesse, foram realizadas PCRs de colônia, utilizando os *primers* M13 *forward* e *reverse*, que anelam próximo ao sítio múltiplo de clonagem do vetor pGEM-T Easy e acrescentam aproximadamente 200 pb ao tamanho de cada amplicon (Figura 6).

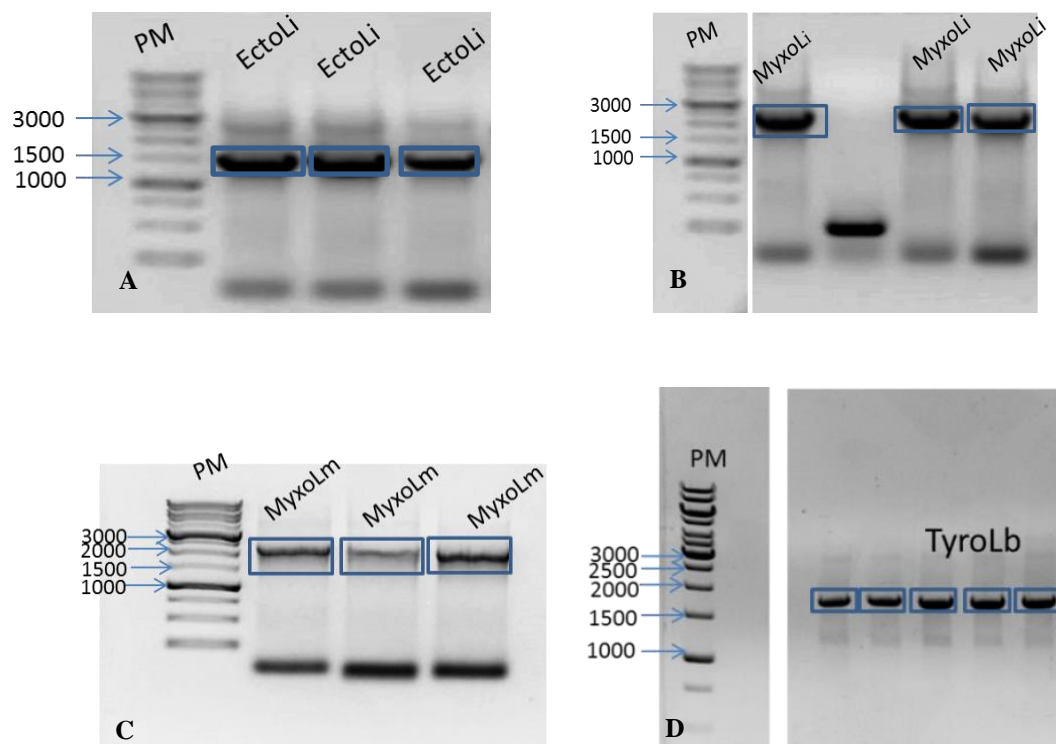


Figura 6: Análise eletroforética em gel de agarose 1,0% dos produtos amplificados a partir da PCR de colônia, utilizando os primers M13 Fwd e Rev para confirmação da clonagem dos amplicons no vetor pGEM-T Easy. As bandas observadas correspondem aos genes de: (A) EctoLi (~1500 pb), (B) MyxoLi (~2300 pb), ambos de *L. infantum*; (C) MyxoLm (~2300 pb) de *L. mexicana*; e (D) TyroLb (~1700 pb) de *L. braziliensis*. Todas as colônias analisadas foram positivas para a clonagem dos genes de interesse, exceto um clone do gene de Myxo de *L. infantum* (B), que apresentou resultado negativo. As bandas visualizadas na parte inferior dos géis correspondem aos primers M13 não anelados durante a amplificação dos insertos.

Os clones positivos foram selecionados e os plasmídeos contendo os amplicons de interesse foram purificados através de miniprep e digeridos com as enzimas *NdeI* e *EcoRI* ou *NdeI* e *SalI* para a liberação dos insertos com as extremidades coesivas destas enzimas de restrição (Figura7). Os clones positivos de MyxoLi e MyxoLm foram digeridos com os dois pares de enzimas: *NdeI* e *SalI*, para a liberação do inserto contendo toda sequência gênica (~2100 pb), e *NdeI* e *EcoRI*, para a liberação dos ~1500 pb iniciais do gene, levando à obtenção das proteínas truncadas MyxoTLi e MyxoTLm. Essa estratégia foi utilizada para averiguar o desempenho de epítopos presentes nas diferentes regiões da proteína Myxo nos teste de ELISA para sorodiagnóstico de LV. As bandas resultantes das digestões foram excisadas do gel de agarose, purificadas e subclonadas no vetor de expressão em bactéria pET28a-TEV (CeBiME, Campinas/SP). Este vetor também foi digerido com as mesmas combinações de enzimas (Figura 7C). Estas preparações foram utilizadas na transformação de *E. coli* das cepas BL-21 Star ou Arctic Express, que são cepas específicas para a expressão heteróloga.

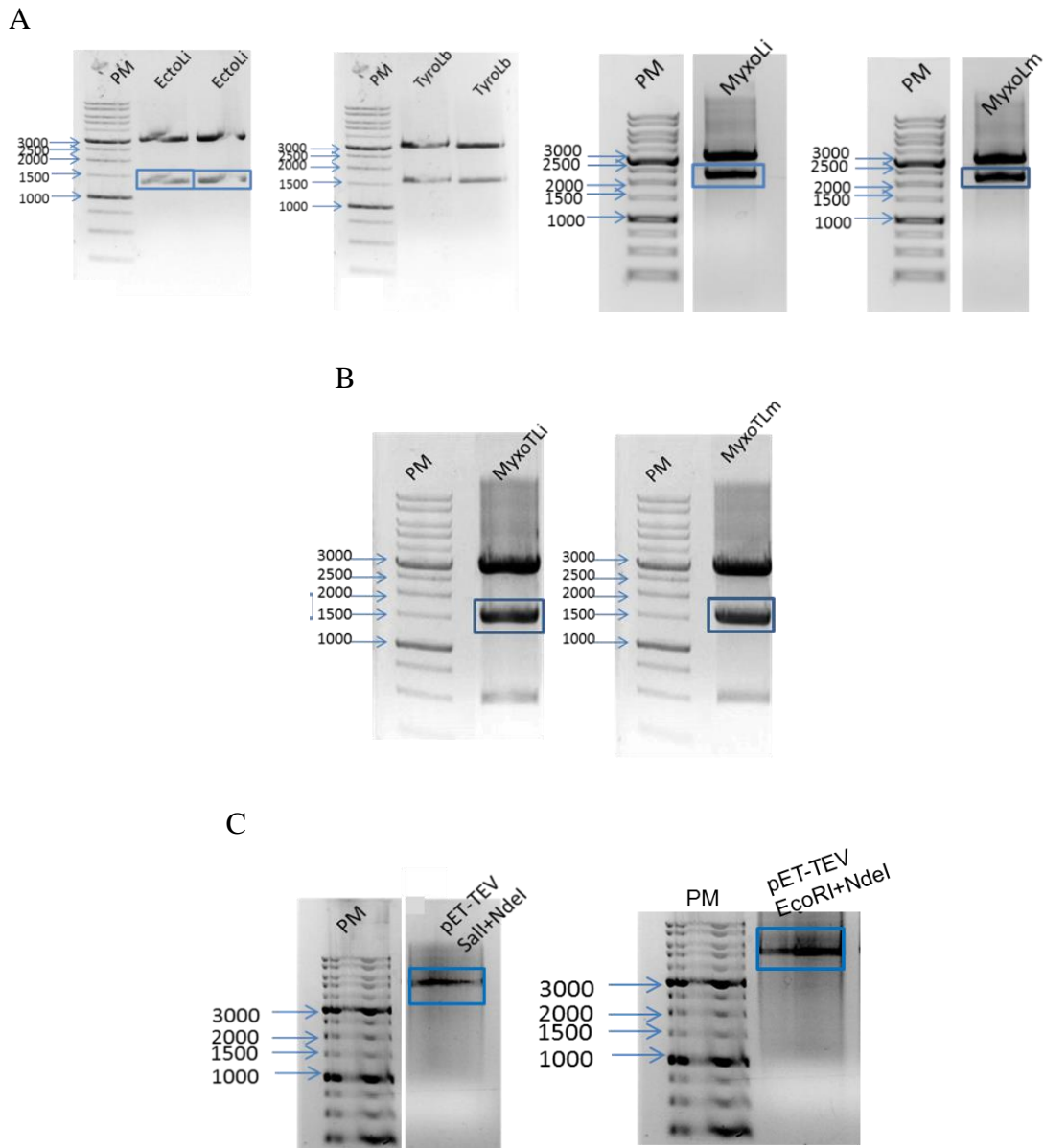


Figura 7: Digestão com enzimas de restrição dos plasmídeos contendo os genes de interesse para subclonagem no vetor de expressão pET-TEV. Em (A), as bandas resultantes das digestões do vetor pGEM-T Easy contendo os genes: LinJ.15.0030 (EctoLi) e LbrM.35.5630 (TyroLb), clivados com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NdeI*; LinJ.29.2310 (MyxoLi) e LmxM.08_29.2200 (MyxoLm), clivados com as enzimas de restrição *SalI* e *NdeI*. Em (B), as bandas resultantes das digestões do vetor pGEM-T Easy contendo os genes truncados LinJ.29.2310 (MyxoTLi) e LmxM.08_29.2200 (MyxoTlm) de *Leishmania* com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NdeI*. Em (C), o vetor pET28a-TEV clivado com as enzimas *EcoRI* e *NdeI* e com as enzimas *SalI* e *NdeI* podem ser visualizadas no gel de agarose 1%. A banda de 3000 pb presente em todas as canaletas, em (A) e (B), corresponde ao vetor pGEM-T Easy linearizado.

As clonagens dos insertos no vetor pET28a-TEV foram confirmadas por PCR de colônia, utilizando os *primers* T7 *foward* e *reverse*, que se anelam próximo ao sítio múltiplo de clonagem do vetor (Figura 8).

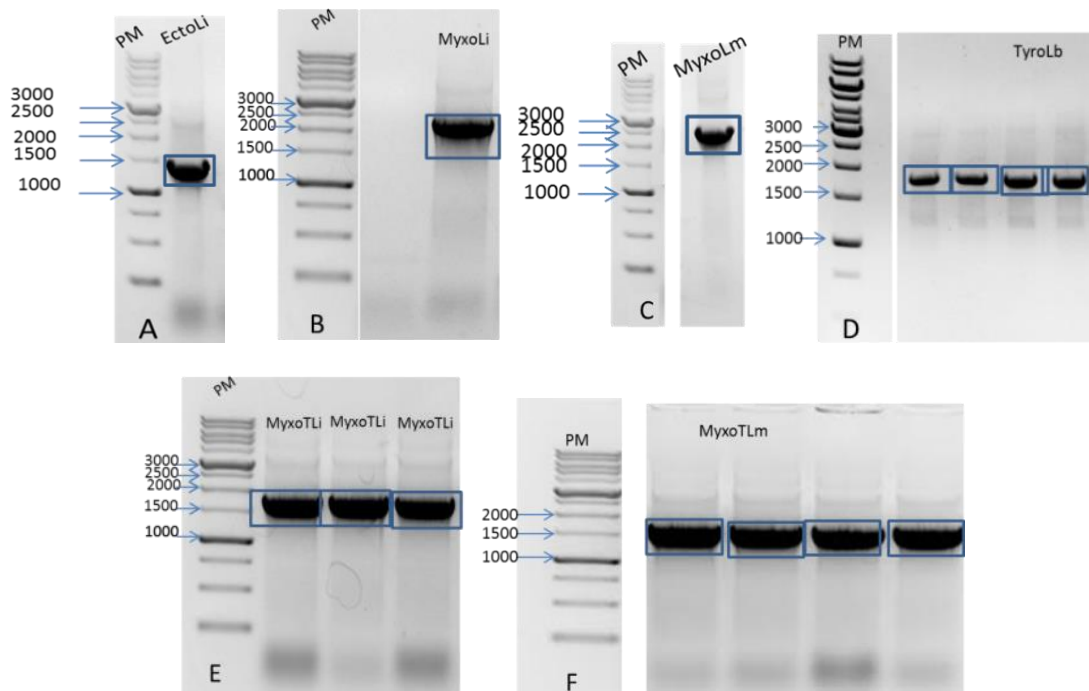


Figura 8: Análise eletroforética em gel de agarose 1,0% dos produtos amplificados a partir da PCR de colônia, utilizando os primers T7 Fwd e Rev para confirmação da clonagem dos amplicons no vetor pET28a-TEV. As bandas observadas correspondem aos genes de (A) EctoLi (LinJ.15.0030) de *L. infantum*; (B) MyxoLi (LinJ.29.2310) de *L. infantum*; (C) MyxoLm (LmxM.08_29.2200) de *L. mexicana*; (D) TyroLb (LbrM.35.5630) de *L. braziliensis*; (E) MyxoTLi (LinJ.29.2310) e (F) MyxoTLm (LmxM.08_29.2200) de *L. infantum* e *L. mexicana*, respectivamente. Todas as colônias analisadas foram positivas para a clonagem dos genes de interesse.

5.4 Sequenciamento dos genes clonados em pET28a-TEV

Para confirmar a identidade dos genes clonados, os plasmídeos, contendo os genes que codificam a ATP difosfohidrolase de *L. infantum* (LinJ.15.0030), a proteína de ligação ao GTP de *L. infantum* e *L. mexicana* (LinJ.29.2310 e LmxM.08_29.2200, respectivamente), e a proteína tirosina fosfatase de *L. braziliensis* (LbrM.35.5630), foram enviados para sequenciamento pela empresa Macrogen (Seul, Coreia do Sul) em sequenciador automático ABI Prism 3730xl DNA Analyser (Applied Biosystems), utilizando os primers T7 forward e reverse para o vetor pET28a-TEV. Após o processamento dos dados por ferramentas de bioinformática, as sequências obtidas foram submetidas à pesquisa de homologia usando o programa BLASTn contra o banco de dados de nucleotídeos do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (Figura 9).

Alinhamento do resultado do sequenciamento de ATP difosfohidrolase (EctoLi) no plasmídeo pET28a-TEV com a proteína codificada pelo gene LinJ.15.0030 de *L. infantum*

Mismatches: 8

Identidade: 99%

EctoLi	88	ATGCGACCGTACTCCTCAGTGC	GGCGCATGACTCAACAGTCGAAGCGACTGCGCATCGCC	147
Sbjct	1	ATGCGACCGTACTCCTCGGTGC	GGCGCATGACTCAACAGTCGAAGCGACTGCGCATCGCC	60
EctoLi	148	GGCACCTTGTGCTTAGCGCGCTTGT	TATCTTCGGTTTCCTCGTTTACTATCAAAGCCCT	207
Sbjct	61	GGCACCTTGTGCTTAGCGCGCTTGT	TATCTTCGGTTTCCTCGTTTACTATCAAAGCCCT	120
EctoLi	208	CTGCTCTCCCATGTGACTCGGCGTAC	CGGAATGTATACGACGTCGTCATCGACGCCGGC	267
Sbjct	121	CTGCTCTCCCATGTGACTCGGCGTAC	CGGAATGTATACGACGTCGTCATCGACGCCGGC	180
EctoLi	268	AGCACTGGCTCACGTGTGCATGTGTT	CCAATACGAGCGCGGCCGCACCGGTCTCGTACTT	327
Sbjct	181	AGCACTGGCTCACGTGTGCATGTGTT	CCAATACGAGCGCGGCCGCACCGGTCTCGTACTT	240
EctoLi	328	CTGAGAGAGCGCTTCAAACGAGTAG	AGCCGGTCTATCCTCTTTTGCCACCGACCCAGAC	387
Sbjct	241	CTGAGAGAGCGCTTCAAACGAGTAG	AGCCGGTCTATCCTCTTTTGCCACCGACCCAGAC	300
EctoLi	388	GGCGCCAAGGAGTCGCTTGC	GGGGCTGCTGCGCTTCGCGGATAAAGGTGGTCCCGCAAAGC	447
Sbjct	301	GGCGCCAAGGAGTCGCTTGC	GGGGCTGCTGCGCTTCGCGGATAAAGGTGGTCCCGCAAAGC	360
EctoLi	448	TACCAGAAGTGCACCTTCGT	CACCCCTCAAGGCCACCGCCGGCCTTCGGCTCCTACCTGAG	507
Sbjct	361	TACCAGAAGTGCACCTTCGT	CACCCCTCAAGGCCACCGCCGGCCTTCGGCTCCTACCTGAG	420
EctoLi	508	TCCGTCCAGCAGGTGCTGCT	TGGACGCTGCCAGCACACACTCAACGCATCTCCATTTTCAG	567
Sbjct	421	TCCGTCCAGCAGGTGCTGCT	TGGACGCTGCCAGCACACACTCAACGCATCTCCATTTTCAG	480
EctoLi	568	TCTCGTGGTGCCTCCATCAT	TCTCTGGCGCTCAAGAGGGCGTCTACGGGTGGCTGACGGTG	627
Sbjct	481	TCTCGTGGTGCCTCCATCAT	TCTCTGGCGCTCAAGAGGGCGTCTACGGGTGGCTGACGGTG	540
EctoLi	628	AACTACCTGCTGAACAGGCT	CGACACGGACGTTGCCACCGTCGCGACCATCGACATGGGA	687
Sbjct	541	AACTACCTGCTGAACAGGCT	CGACACGGACGTTGCCACCGTCGCGACCATCGACATGGGA	600
EctoLi	688	GGTGCCTCGACACAGGTCGT	CTTCGAGACGACGCCACGCTCTGGAGAATGGCTGCCCTTC	747
Sbjct	601	GGTGCCTCGACACAGGTCGT	CTTCGAGACGACGCCACGCTCTGGAGAATGGCTGCCCTTC	660
EctoLi	748	AACTATGCCACCAGCTGCG	CACACCAAAGCGCACGATCACCATGTATCAGCACAGCTAT	807
Sbjct	661	AACTATGCCACCAGCTGCG	CACACCAAAGCGCACGATCACCATGTATCAGCACAGCTAT	720
EctoLi	808	CTCGGCCTTGGGATGAAC	GAGGCGAAGAAGAAGCTTATGATGTCATTCGCCGAAGCGAAC	867
Sbjct	721	CTCGGCCTTGGGATGAAC	GAGGCGAAGAAGAAGCTTATGATGTCATTCGCCGAAGCGAAC	780
EctoLi	868	GGGACGTCGTCTTTCCCGT	GCTTCCCAGAGGGTATGCGAAGCGCCTGAACGATGTGGAA	927
Sbjct	781	GGGACGTCGTCTTTCCCGT	GCTTCCCAGAGGGTATGCGAAGCGCCTGAACGATGTGGAA	840
EctoLi	928	CTTCGAAACAGTGACGCC	CACGGACTTTGACGCGTGTGCAGGACTATTTTCGCGAACATGTC	987
Sbjct	841	CTTCGAAACAGTGACGCC	CACGGACTTTGACGCGTGTGCAGGACTATTTTCGCGAACATGTC	900

Sbjct	241	GAGTTCCTACACATCCCCAAAAGAAGTTTTATGACTTCAACGAGATCCAAAATGAAATC	300
MyxoLm	304	ACACGCCGCACGATCGAAATGGCCGGCCCGTCCGCGATCACGGATAAGCCGATCAGCCTC	363
Sbjct	301	ACACGCCGCACGATCGAAATGGCCGGCCCGTCCGCGATCACGGATAAGCCGATCAGCCTC	360
MyxoLm	364	AAGGTTTACTCGAAGACGGTGCTGAACCTGACTCTCGTGGACTTACCTGGTCTGGTGATG	423
Sbjct	361	AAGGTTTACTCGAAGACGGTGCTGAACCTGACTCTCGTGGACTTGCCTGGTCTGGTGATG	420
MyxoLm	424	AACGCCGTTGGCGATCAGCCAAAGGACATTGACCGCCAGATCAAGGATATGGTGACGCGC	483
Sbjct	421	AACGCCGTTGGCGATCAGCCAAAGGACATTGACCGCCAGATCAAGGATATGGTGACGCGC	480
MyxoLm	484	TACGTGTCGCCAAGAACACAATCATTCTGGCTATTTCTCCTGCCAACACCGATCTTGCC	543
Sbjct	481	TACGTGTCGCCAAGAACACAATCATTCTGGCTATTTCTCCTGCCAACACCGATCTTGCC	540
MyxoLm	544	ACGAGCCAGTCGCTGCGCCTGGCAAAGCAGCTGGACCCCGACGGTTTGCACGCGTTCGGT	603
Sbjct	541	ACAGCCAGTCGCTGCGCCTGGCAAAGCAGCTGGACCCCGACGGTTTGCACGCGTTCGGT	600
MyxoLm	604	GTGCTCACAAGATTGACTTGATGGACAAGGGCACGGACTGTCTTGACATACTGCAGAAC	663
Sbjct	601	GTGCTCACAAGATTGACTTGATGGACAAGGGCACGGACTGTCTTGACATACTGCAGAAC	660
MyxoLm	664	AGGGTCCTACAGCTCCGCCACGGCTTCATCGGCGTTGTGTGCCGTAGTCAGCAGGATATC	723
Sbjct	661	AGGGTCCTACAGCTCCGCCACGGCTTCATCGGCGTTGTGTGCCGTAGTCAGCAGGATATC	720
MyxoLm	724	AACGATCGCAAGTCAATGGAGGGTGCCCGCGGAGCGAGTACGAGTTTGTGCAAACCTCG	783
Sbjct	721	AACGATCGCAAGTCAATGGAGGGTGCCCGCGGAGCGAGTACGAGTTCTTTGCAAACCTCG	780
MyxoLm	784	CCCATCTACTCCCCATCGCGGAGGAGGCTGGTACCACCTACCTTAGCAAGAAGCTGAAC	843
Sbjct	781	CCCATCTACTCCCCATCGCGGAGGAGGCTGGTACCACCTACCTTAGCAAGAAGCTGAAC	840
MyxoLm	844	TTTTTGCTGCTGGAGCACATCAAAGCCGTTATTCCAGACCTGAAGCGCCACGTGGACCAA	903
Sbjct	841	TTTTTGCTGCTGGAGCACATCAAAGCCGTTATTCCAGACCTGAAGCGCCACGTGGACCAA	900
MyxoLm	904	CTGATGGAAGCCACCAAGAAGCAGATGGAGAACTGGGCATGTTTGATCAGGACATCACC	963
Sbjct	901	CTGATGGAAGCCACCAAGAAGCAGATGGAGAACTGGGCATGTTTGATCAGGACATCACC	960
MyxoLm	964	GAACCCACTGCACAGCTGCTGTACCTTATCAAGCTGTTTACGCGACACGCTGAATCAGACG	1023
Sbjct	961	GAGCCCACTGCACAGCTGCTGTACCTTATCAAGCTGTTTACGCGACACGCTGAATCAGACG	1020
MyxoLm	1024	ATCGATGGTGGTATCACGGATGCCACGAAGGAGCTGCTTGGTGGGGCGCGTCTGGACTAC	1083
Sbjct	1021	ATCGATGGTGGTATCACGGATGCCACGAAGGAGCTGCTTGGTGGGGCGCGTCTGGACTAC	1080
MyxoLm	1084	ATCTTCCACGAGTGCTTCGCCACCTACGTGACCAGCCTGAGCGCCACGAAAGATCTCACA	1143
Sbjct	1081	ATCTTCCACGAGTGCTTCGCCACCTACGTGACCAGCCTGAGCGCCACGAAAGATCTCACA	1140
MyxoLm	1144	GACGACTACATCCGCATCAACACGCGCAACATGGCCGGTATGCACGCCACTCTGTTCCCC	1203
Sbjct	1141	GACGATACATCCGCATCAACACGCGCAACATGGCCGGTATGCACGCCACTCTGTTCCCC	1200
MyxoLm	1204	TCCGACCAGGTGTTTGTGCGCTTGTCAAAGCAGCAGATCACCCGTCTCGAGGAGCCGTGC	1263
Sbjct	1201	TCCGACCAGGTGTTTGTGCGCTTGTCAAAGCAGCAGATCACCCGTCTCGAGGAGCCGTGC	1260
MyxoLm	1264	ATCAAGTGCCTCACCTTCGTCTACGAGGAGCTGAGCAAGATCGTTGAAGTCTGCGCTGGC	1323


```

TyroLb 1141 GAGGCCGATGTGGCTGCCATGGAGAACTACCTGCAACGCGCAGGATCGTCGCCCTGCTCG 1200
          |
Sbjct  1141 GAGGCCGATGTGGCTGCCATGGAGAACTACCTGCAACGCGCAGGATCGTCGCCCTGCTCG 1200

TyroLb 1201 GGACGTAGCCCAAACATGAGCCATACGGGCGATCGCTCCTCTCCTATGGAGGCCCTTACAT 1260
          |
Sbjct  1201 GGACGTAGCCCAAACATGAGCCATACGGGCGATCGCTCCTCTCCTATGGAGGCCCTTACAT 1260

TyroLb 1261 CACGCATGTGCGCAAACCTCATTCTCATCAAATCACTCTTCATCCCAGTGCCGCATGAA 1320
          |
Sbjct  1261 CACGCATGTGCGCAAACCTCATTCTCATCAAATCACTCTTCATCCCAGTGCCGCATGAA 1320

TyroLb 1321 CCGAACATGCACTGCCGTGAGGTTGGTACCTCTCGATCAAGCACGAGCCACACGTCCGAG 1380
          |
Sbjct  1321 CCGAACATGCACTGCCGTGAGGTTGGTACCTCTCGATCAAGCACGAGCCACACGTCCGAG 1380

TyroLb 1381 ACCACAACACCAGTGTTTCGGTCCACGTCACTTCTGCAAGAGGAGCTCGCGCGACTGCAG 1440
          |
Sbjct  1381 ACCACAACACCAGTGTTTCGGTCCACGTCACTTCTGCAAGAGGAGCTCGCGCGACTGCAG 1440

TyroLb 1441 CAGGTCAATCGCGTGAAGCGCTTCTCTCCGTGCTTGGCCTGCGGCATTGGTGGCAGCTAG 1500
          |
Sbjct  1441 CAGGTCAATCGCGTGAAGCGCTTCTCTCCGTGCTTGGCCTGCGGCATTGGTGGCAGCTAG 1500

```

Alinhamento do resultado do sequenciamento da proteína truncada de ligação ao GTP (MyxoTLi) no plasmídeo pET28a-TEV com a proteína codificada pelo gene LinJ.29.2310 de *L. infantum*

Mismatches: 24
 Identidade: 98%

```

MyxoTLi 1   ATGGACCAGTTGATCAGCGTGATCAATGAGCTTCATGACGCCCTTCGCCGGCGTCAAGATG 60
          |
Sbjct  1   ATGGACCAGTTGATCAGCGTGATCAATGAGCTTCATGACGCCCTTCGCCGGCGTCAAGATG 60

MyxoTLi 61   AACATCAAACCTCAACCTCCCTCAGATCGCTGTCGTCGGTAGTCAGAGTTGTGGCAAGAGC 120
          |
Sbjct  61   AACATCAAACCTCAACCTCCCTCAGATCGCTGTCGTCGGTAGTCAGAGTTGTGGCAAGAGC 120

MyxoTLi 121  TCTGTGCTGGAGTCGATCGTCGGCAAGGACTTTTTGCCGCGCGGATCCGGCATTGTCACA 180
          |
Sbjct  121  TCTGTGCTGGAGTCGATCGTCGGCAAGGACTTTTTGCCGCGCGGATCCGGCATTGTCACA 180

MyxoTLi 181  CGCTGCCCTCGTGCTGCAGCTCGTTCAGCTGCCCAAGTCAAACGAGGAGGAGTGGGGC 240
          |
Sbjct  181  CGCTGCCCTCGTGCTGCAGCTCGTTCAGCTGCCCAAGTCAAACGAGGAGGAGTGGGGC 240

MyxoTLi 241  GAGTTCCTGCACATCCCCAACAAGAAGTTCTATGACTTCAACGAGATCCAAAACGAAATC 300
          |
Sbjct  241  GAGTTCCTGCACATCCCCAACAAGAAGTTCTATGACTTCAACGAGATCCAAAACGAAATC 300

MyxoTLi 301  ACACGCCGCACGATCGAAATGGCCGGCCCGTCCGCGATCACGGATAAGCCGATCAGCCTC 360
          |
Sbjct  301  ACACGCCGCACGATCGAAATGGCCGGCCCGTCCGCGATCACGGATAAGCCGATCAGCCTC 360

MyxoTLi 361  AAGGTTTACTCGAACACGGTGTGAACCTGACTCTCGTGGACTTGCCTGGTCTGGTGATG 420
          |
Sbjct  361  AAGGTTTACTCGAACACGGTGTGAACCTGACTCTCGTGGACTTGCCTGGTCTGGTGATG 420

MyxoTLi 421  AACGCTTTGGCGATCAGCCAAAGGACATTGACCGCCAGATCAAGGATATCGTGACCCAC 480
          |
Sbjct  421  AACGCTTTGGCGATCAGCCAAAGGACATTGACCGCCAGATCAAGGATATGGTGACCGCG 480

MyxoTLi 481  TACGTGTCGCCAAGAACACGATCATTCTGGCTATTTCTCCTGCCAACACCGATCTTGCC 540
          |
Sbjct  481  TACGTGTCGCCAAGAACACGATCATTCTGGCTATTTCTCCTGCCAACACCGATCTTGCC 540

```



```

MyxoTLi 1560 TCAGCCGCACTCGGCACACA 1579
          ||||| ||  ||  |||||
Sbjct   1561 TCAGCGGCTGGCGGTACACA 1580

```

Alinhamento do resultado do sequenciamento da proteína truncada de ligação ao GTP (MyxoTLm) no plasmídeo pET28a-TEV com a proteína codificada pelo gene LmxM.08_29.2200 de *L. mexicana*

Mismatches: 12

Identidade: 99%

```

MyxoTLm  1  ATGGACCAGTTGATGGTGTGATCAACGAGCTTCATGACGCCTTCGCCGGCGTCAAGATG  60
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct    1  ATGGACCAGTTGATCAGCGTGATAAACGAGCTTCATGACGCCTTCGCCGGCGTCAAGATG  60

MyxoTLm  61  AACATCAAGCTCAACCTCCCCAGATCGCTGTCGTCGGTAGTCAGAGTTGTGGCAAGAGC  120
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct   61  AACATCAAGCTCAACCTCCCCAGATCGCTGTCGTCGGTAGTCAGAGTTGTGGCAAGAGC  120

MyxoTLm  121 TCTGTGCTGGAGTCGATCGTCGGCAAGGACTTTTTGCCGCGCGGATCCGGCATTGTCACA  180
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct   121 TCTGTGCTGGAGTCGATCGTCGGAAGGACTTTTTGCCGCGCGGATCCGGCATTGTCACA  180

MyxoTLm  181  CGCTGTCCCTCGTGTGCAGCTCGTGCAGCTGCCAAGTCAAACGATGAGGAGTGGGGC  240
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct   181  CGCTGTCCCTCGTGTGCAGCTCGTGCAGCTGCCAAGTCAAACATGAGGAGTGGGGC  240

MyxoTLm  241  GAGTTCCTACACATCCCCAAAAGAAGTTTTATGACTTCAACGAGATCCAAAATGAAATC  300
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct   241  GAGTTCCTACACATCCCCAAAAGAAGTTTTATGACTTCAACGAGATCCAAAATGAAATC  300

MyxoTLm  301  ACACGCCGCACGATCGAAATGGCCGGCCGTCGCGATCACGGATAAGCCGATCAGCCTC  360
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct   301  ACACGCCGCACGATCGAAATGGCCGGCCGTCGCGATCACGGATAAGCCGATCAGCCTC  360

MyxoTLm  361  AAGGTTTACTCGAAGACGGTGCTGAACCTGACTCTCGTGGACTTACCTGGTCTGGTGATG  420
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct   361  AAGGTTTACTCGAAGACGGTGCTGAACCTGACTCTCGTGGACTTGCTGGTCTGGTGATG  420

MyxoTLm  421  AACGCCGTTGGCGATCAGCCAAAGGACATTGACCGCCAGATCAAGGATATGGTGACGCGC  480
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct   421  AACGCCGTTGGCGATCAGCCAAAGGACATTGACCGCCAGATCAAGGATATGGTGACGCGC  480

MyxoTLm  481  TACGTGTCGCCAAGAACAACAATCATTCTGGCTATTTCTCTGCCAACACCGATCTTGCC  540
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct   481  TACGTGTCGCCAAGAACAACAATCATTCTGGCTATTTCTCTGCCAACACCGATCTTGCC  540

MyxoTLm  541  ACAGCCAGTCGCTGCGCCTGGCAAAGCAGCTGGACCCCGACGGTTTGGCAGCGGTCGGT  600
          ||  ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct   541  ACAAGCCAGTCGCTGCGCCTGGCAAAGCAGCTGGACCCCGACGGTTTGGCAGCGGTCGGT  600

MyxoTLm  601  GTGCTCACAAGATTGACTTGATGGACAAGGGCACGGACTGTCTTGACATACTGCAGAAC  660
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct   601  GTGCTCACAAGATTGACTTGATGGACAAGGGCACGGACTGTCTTGACATACTGCAGAAC  660

MyxoTLm  661  AGGGTCTTACAGCTCCGCCACGGCTTCATCGGCGTTGTGTGCCGTAGTCAGCAGGATATC  720
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct   661  AGGGTCTTACAGCTCCGCCACGGCTTCATCGGCGTTGTGTGCCGTAGTCAGCAGGATATC  720

MyxoTLm  721  AACGATCGCAAGTCAATGGAGGGTGCCCGCGGAGCGAGTACGAGTTTTTGCAAACCTCG  780
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct   721  AACGATCGCAAGTCAATGGAGGGTGCCCGCGGAGCGAGTACGAGTTCTTTGCAAACCTCG  780

MyxoTLm  781  CCCATCTACTCCCCATCGCGGAGGAGGCTGGTACCACCTACCTTAGCAAGAAGCTGAAC  840
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct   781  CCCATCTACTCCCCATCGCGGAGGAGGCTGGTACCACCTACCTTAGCAAGAAGCTGAAC  840

```

```

MyxoTLm 841 TTTTGTGCTGCTGGAGCACATCAAAGCCGTTATTCCAGACCTGAAGCGCCACGTGGACCAA 900
      |
Sbjct 841 TTTTGTGCTGCTGGAGCACATCAAAGCCGTTATTCCAGACCTGAAGCGCCACGTGGACCAA 900

MyxoTLm 901 CTGATGGAAGCCACCAAGAAGCAGATGGAGAACTGGGCATGTTTGATCAGGACATCACC 960
      |
Sbjct 901 CTGATGGAAGCCACCAAGAAGCAGATGGAGAACTGGGCATGTTTGATCAGGACATCACC 960

MyxoTLm 961 GAACCCACTGCACAGCTGCTGTACCTTATCAAGCTGTTGAGCGACACGCTGAATCAGACG 1020
      |
Sbjct 961 GAGCCCACTGCACAGCTGCTGTACCTTATCAAGCTGTTGAGCGACACGCTGAATCAGACG 1020

MyxoTLm 1021ATCGATGGTGGTATCACGGATGCCACGAAGGAGCTGCTTGGTGGGGCGCGTCTGGACTAC 1080
      |
Sbjct 1021 ATCGATGGTGGTATCACGGATGCCACGAAGGAGCTGCTTGGTGGGGCGCGTCTGGACTAC 1080

MyxoTLm 1081ATCTTCCACGAGTGCTTCGCCACCTACGTGACCAGCCTGAGCGCCACGAAAGATCTCACA 1140
      |
Sbjct 1081 ATCTTCCACGAGTGCTTCGCCACCTACGTGACCAGCCTGAGCGCCACGAAAGATCTCACA 1140

MyxoTLm 1141GACGACTACATCCGCATCAACACGCGCAACATGGCCGGTATGCACGCCACTCTGTTCCCC 1200
      |
Sbjct 1141 GACGAAATACATCCGCATCAACACGCGCAACATGGCCGGTATGCACGCCACTCTGTTCCCC 1200

MyxoTLm 1201TCCGACCAGGTGTTTGTGCGCTTGTCAAAGCAGCAGATCACCCGTCTCGAGGAGCCGTGC 1260
      |
Sbjct 1201 TCCGACCAGGTGTTTGTGCGCTTGTCAAAGCAGCAGATCACCCGTCTCGAGGAGCCGTGC 1260

MyxoTLm 1261ATCAAGTGCCTCACCTTCGTCTACGAGGAGCTGAGCAAGATCGTTGAAAGTCTGCGCTGGC 1320
      |
Sbjct 1261 ATCAAGTGCCTCACCTTCGTCTACGAGGAGCTGAGCAAGATCGTTGAAACCTGCGCTGGC 1320

MyxoTLm 1321AAGGTGGACCGCTATCCGAACCTGAAGGAGGCTATCATTTTCGATTTGCAAGAAGATGCTG 1380
      |
Sbjct 1321 AAGGTGGACCGCTATCCGAACCTGAAGGAGGCTATCATTTTCGATTTGCAAGAAGATGCTG 1380

MyxoTLm 1381CTCGACTACCGCAAACCAACCTCAACGCACGTGCGCACCATCATCCAAGCCGAGCGCGGC 1440
      |
Sbjct 1381 CTCGACTACCGCAAACCAACCTCAACGCACGTGCGCACCATCATCCAAGCCGAGCGCGGC 1440

MyxoTLm 1441TTCATTAACGTGAAGCATCCTATGATGGACGAGTTAGCGCAGCGCGGTTTCGCGAATATC 1500
      |
Sbjct 1441 TTCATTAACGTGAAGCATCCTATGATGGACGAGTTAGCGCAGCGCGGTTTCGCGAATATC 1500

MyxoTLm 1501 TACGGCACCGCGAACGGAGAGTCGTCCTCGCCGGA 1535
      |
Sbjct 1501 TACGGCACCGCGAACGGAGAGTCGTCCTCGCCGGA 1535

```

Figura 9: Alinhamentos gerados no programa BLASTn entre as sequências nucleotídicas obtidas do sequenciamento dos insertos presentes no plasmídeo pET28a-TEV e as respectivas sequências depositadas no banco de dados do NCBI, relativas às proteínas: ATP difosfohidrolase de *L. infantum* (EctoLi), proteína de ligação ao GTP de *L. infantum* (MyxoLi) e de *L. mexicana* (MyxoLm), completas e truncadas, e a proteína tirosina fosfatase de *L. braziliensis* (TyroLb). As linhas contendo o nome da proteína recombinante correspondem à sequência clonada no vetor pET28a-TEV, enquanto as linhas identificadas como “Sbjct” correspondem as suas sequências nucleotídicas depositadas no NCBI. As sequências idênticas possuem uma barra vertical (“|”) abaixo delas, enquanto sequências discordantes estão em branco. Em vermelho são os mismatches entre as sequências. Um espaço no lugar de um nucleotídeo corresponde a um *gap* nesta sequência.

5.5 Expressão heteróloga em bactéria das proteínas recombinantes

Para a obtenção das proteínas recombinantes LinJ.15.0030 (EctoLi), LinJ.29.2310 (MyxoLi e MyxoTLi), LmxM.08_29.2200 (MyxoLm e MyxoTLm) e

LbrM.35.5630 (TyroLb), as bactérias *E. coli* das cepas BL-21 Star e Arctic Express transformadas com os vetores pET28a-TEV, contendo estes genes, foram crescidas em meio de cultura acrescido de 1 mM de IPTG. Foram coletadas frações da cultura imediatamente antes da adição de IPTG e após o término da indução para averiguar a ocorrência da expressão. As proteínas expressas apresentaram peso molecular esperado de 49,2 kDa para EctoLi, 78,4 kDa para MyxoLi e MyxoLm, 58,2 kDa para TyroLb e 59,1 kDa para MyxoTLi e MyxoTLm (Figura 10). Os resultados mostraram bandas de expressão do tamanho esperado para todas as proteínas.

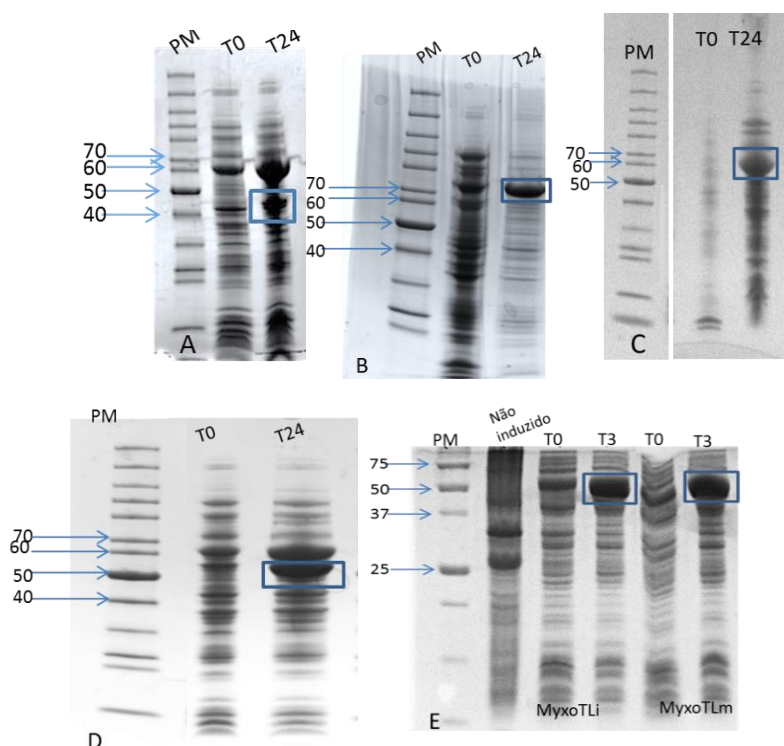


Figura 10: SDS-PAGE das expressões em bactérias das proteínas recombinantes. Análise eletroforética dos géis de poliacrilamida, sob condições desnaturantes, corados com *Coomassie Blue*, dos extratos bacterianos, contendo o plasmídeo pET28a-TEV com os genes de interesse em fusão com caudas de histidina, antes (0 h) e após (3 ou 24 h, de acordo com a cepa da bactéria) da indução com IPTG. As proteínas induzidas foram: (A) Ecto de *L. infantum* (49,2 kDa); (B) Myxo de *L. infantum* (78,4 kDa); (C) Myxo de *L. mexicana* (78,4 kDa); (D) Tyro de *L. braziliensis* (58,2 kDa) e (E) Myxo truncada de *L. infantum* e de *L. mexicana* (59,1 kDa cada). Em (E), a canaleta “não induzida” corresponde ao extrato de bactéria não transformada, utilizado como controle do perfil de bandas no gel. Os padrões de peso molecular em kDa estão indicados à esquerda. Os caixas azuis indicam as bandas de indução nos géis.

Para verificar a solubilidade das proteínas recombinantes obtidas, as bactérias que expressão as proteínas foram lisadas por adição de lisozima e choque térmico. As frações solúveis e insolúveis do lisado foram separadas por centrifugação e submetidas ao SDS-PAGE para a determinação da fração que contém a proteína recombinante (Figura 11). Todas as proteínas recombinantes se encontraram na fração insolúvel,

exceto EctoLi, que está distribuída nas duas frações, sendo, então, ressuspensas em tampão contendo 8 M de uréia para a sua solubilização.

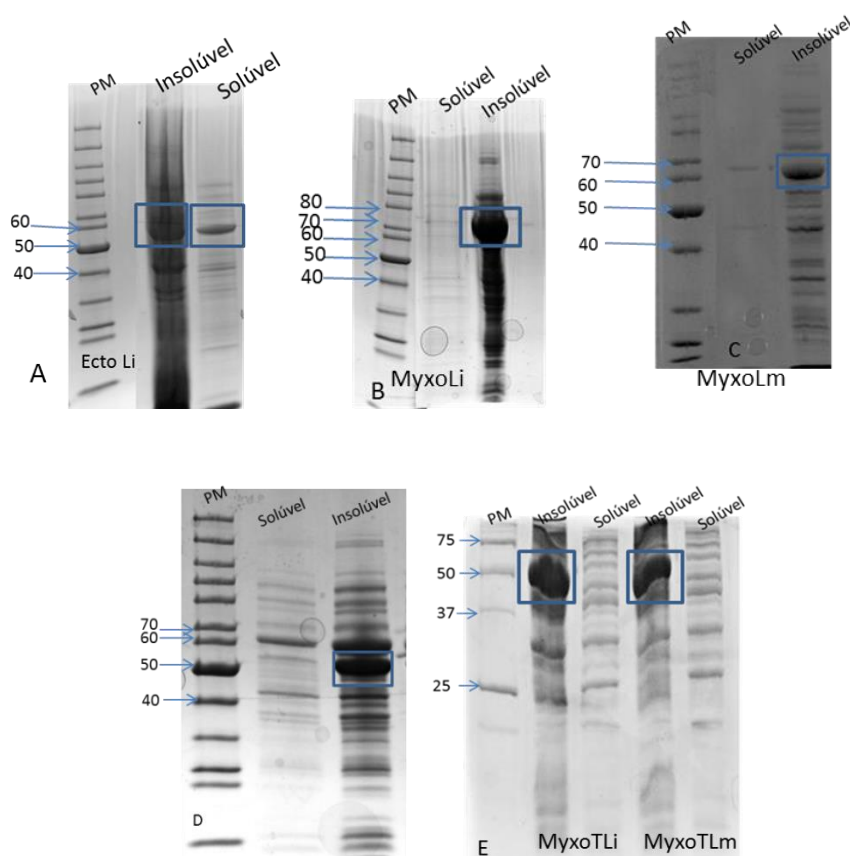


Figura 11: SDS-PAGE do teste de solubilidade das proteínas recombinantes. As bactérias que expressaram as proteínas recombinantes foram lisadas, separadas em fração solúvel e insolúvel e submetidas ao SDS-PAGE. (A) Ecto de *L. infantum*; (B) Myxo de *L. infantum*; (C) Myxo de *L. mexicana*; (D) Tyro de *L. braziliensis* e (E) Myxo truncada de *L. infantum* e de *L. mexicana*. Todas as proteínas recombinantes se encontraram na fração insolúvel do lisado bacteriano, exceto EctoLi que se encontra tanto na porção solúvel e insolúvel. Os padrões de peso molecular em kDa estão indicados à esquerda de cada gel. As caixas azuis indicam as bandas das proteínas recombinantes nos géis.

5.6 Purificação das proteínas recombinantes

A fração solúvel do lisado bacteriano que, após a adição de 8 molar de uréia, continha as proteínas recombinantes, foi submetida a purificação por cromatografia de afinidade em coluna HisTrap HP de 5 mL (GE Healthcare Life Sciences) no aparelho ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare Life Sciences).

A coluna HisTrap HP apresenta em seu interior uma matriz de níquel-sefarose, que consiste em *beads* de agarose recobertas com o íon bivalente Ni^{2+} . A expressão de proteínas no vetor pET28a-TEV adiciona a extremidade N-terminal da proteína seis resíduos de histidina (cauda de histidina), um aminoácido que apresenta grande afinidade por íons bivalentes. Desta forma, quando o lisado bacteriano atravessa a

matriz da coluna HisTrap HP, as proteínas recombinantes que contêm cauda de histidina ficam retidas na coluna, enquanto as proteínas endógenas da bactéria são lavadas e descartadas. Para a eluição das proteínas recombinantes, foi utilizado um tampão contendo 500 mM de imidazol, um sal que interage fortemente com o níquel, e, portanto, compete com a proteína recombinante pela ligação a este íon bivalente, liberando-a da coluna (Anexo I).

Para verificar a qualidade da purificação, as frações purificadas foram submetidas a fracionamento em SDS-PAGE (Figura 12). As bandas adicionais observadas abaixo das bandas das proteínas recombinantes purificadas correspondem à degradação parcial dessas proteínas.

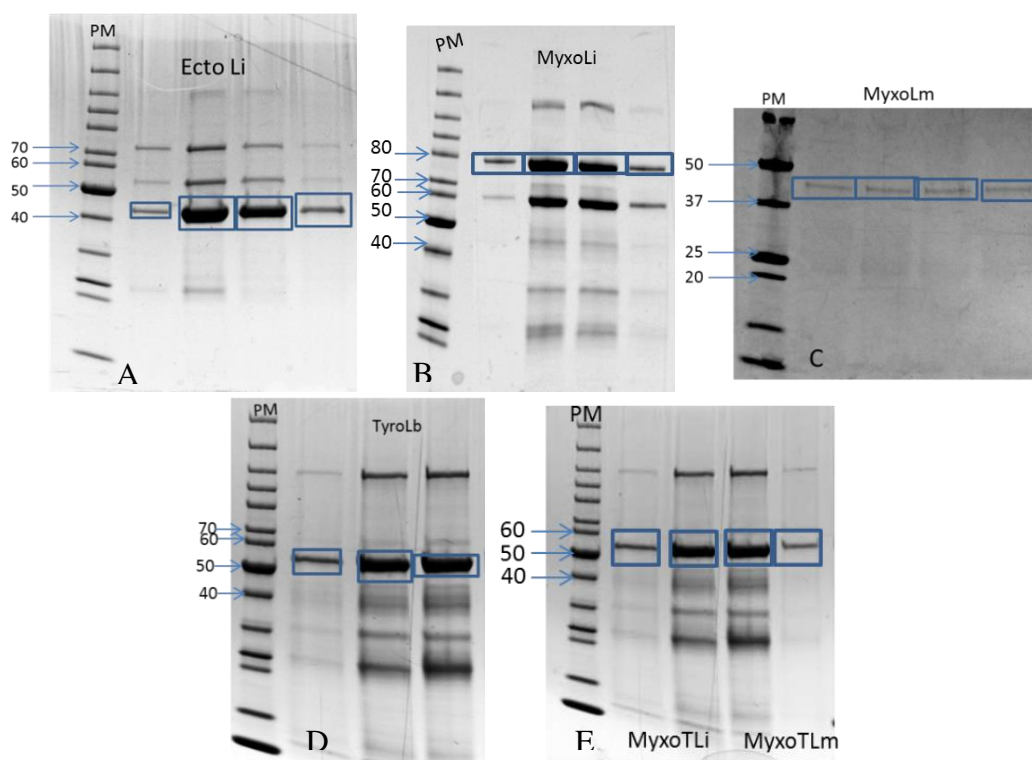


Figura 12: SDS-PAGE das frações purificadas por cromatografia de afinidade das proteínas recombinantes. (A) LinJ.15.0030 (EctoLi) de *L. infantum*, (B) LinJ.29.2310 (MyxoLi) de *L. infantum*, (C) LmxM.08_29.2200 (MyxoLm) de *L. mexicana*, (D) LbrM.35.5630 (TyroLb) de *L. braziliensis*, e (E) LinJ.29.2310 (MyxoTLi) de *L. infantum* e LmxM.08_29.2200 (MyxoTLm) de *L. mexicana*. Cada canaleta corresponde a uma fração coletada referente à região de maior absorvância na Figura 12, obtida durante a purificação por cromatografia de afinidade. As caixas azuis indicam as bandas das proteínas recombinantes nos géis. Os padrões de peso molecular em kDa estão indicados à esquerda de cada gel.

Após o processo de purificação, as concentrações proteicas das frações de maior pico de absorvância durante a eluição da cromatografia de afinidade foram dosadas, utilizando o método do BCA, e as frações que apresentaram a maior concentração de proteínas recombinantes foram selecionadas para a utilização nos ensaios de ELISA.

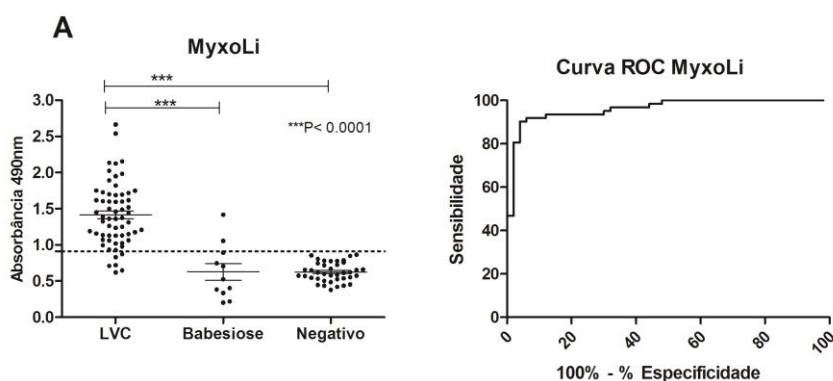
5.7 ELISA das proteínas recombinantes

5.7.1 Avaliação das proteínas recombinantes como antígeno no ELISA para LVC

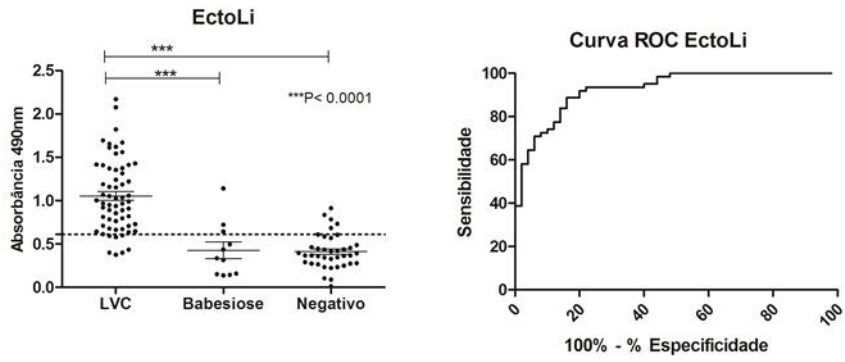
As proteínas recombinantes EctoLi (LinJ.15.0030), MyxoLi completa e truncada (LinJ.29.2310), MyxoLm completa e truncada (LmxM.08_29.2200), e TyroLb (LbrM.35.5630) foram purificadas por cromatografia de afinidade e utilizadas como antígenos em experimentos de ELISA para avaliar sua reatividade primeiramente contra os soros caninos. Foram utilizados 62 soros de cães infectados com *L. infantum* e, como controle negativo, 65 soros de cães não infectados com *Leishmania*, sendo 2 grupos (n=11 e n=15) infectados com *Babesia* sp. e 39 não infectados.

Diante da necessidade de se estabelecer pontos de referência a partir de testes confiáveis que, além de apresentar desempenho significativo no sorodiagnóstico da LVC na atualidade, é amplamente utilizado e recomendado para esse fim, o teste EIE-LVC (FIOCRUZ – Bio-Manguinhos, Brasil) foi realizado para comparação com o desempenho das proteínas recombinantes utilizadas neste estudo.

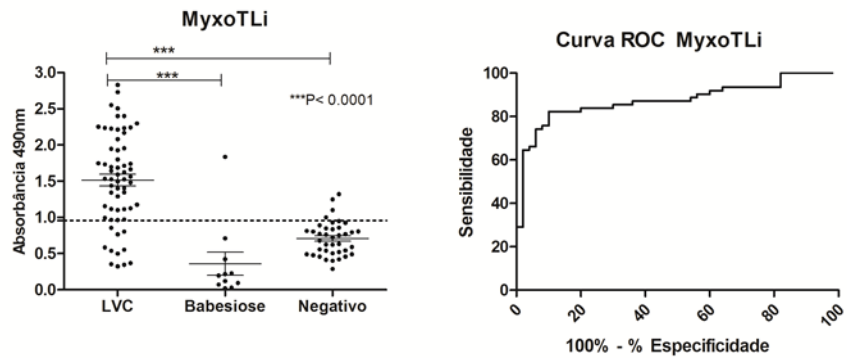
A reatividade de todos os 6 antígenos recombinantes contra os soros analisados por ELISA e suas respectivas curvas ROC utilizadas na definição do valor *cutoff* estão representadas na Figura 13. As proteínas que apresentaram os melhores desempenhos diante dos soros de cães testados nos ELISAs estão com os seus resultados sumarizados nas Tabelas 3 e 4. Todas as proteínas apresentaram baixa reatividade cruzada de anticorpos (IgG) contra babesiose (Figura 13). Por outro lado, o kit EIE-LVC apresentou alta taxa de reatividade cruzada com essa parasitose (Figura 13G).



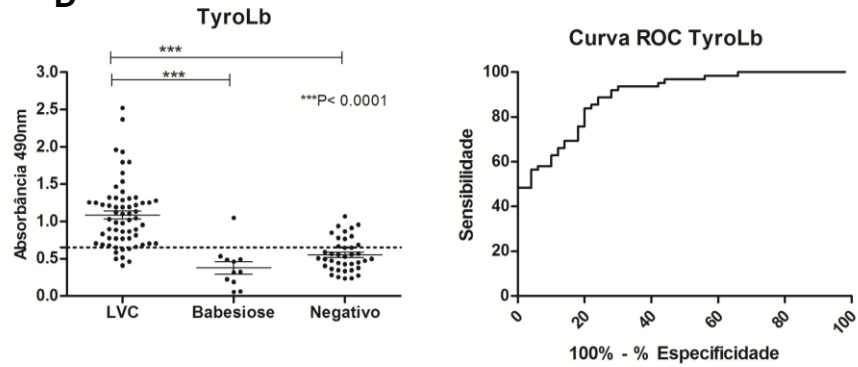
B



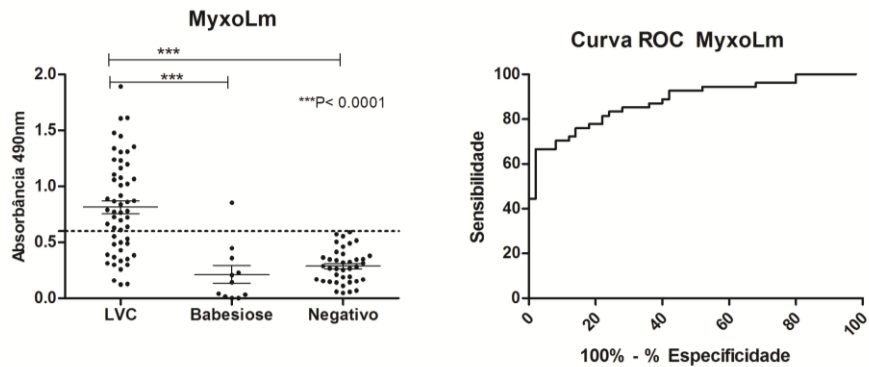
C



D



E



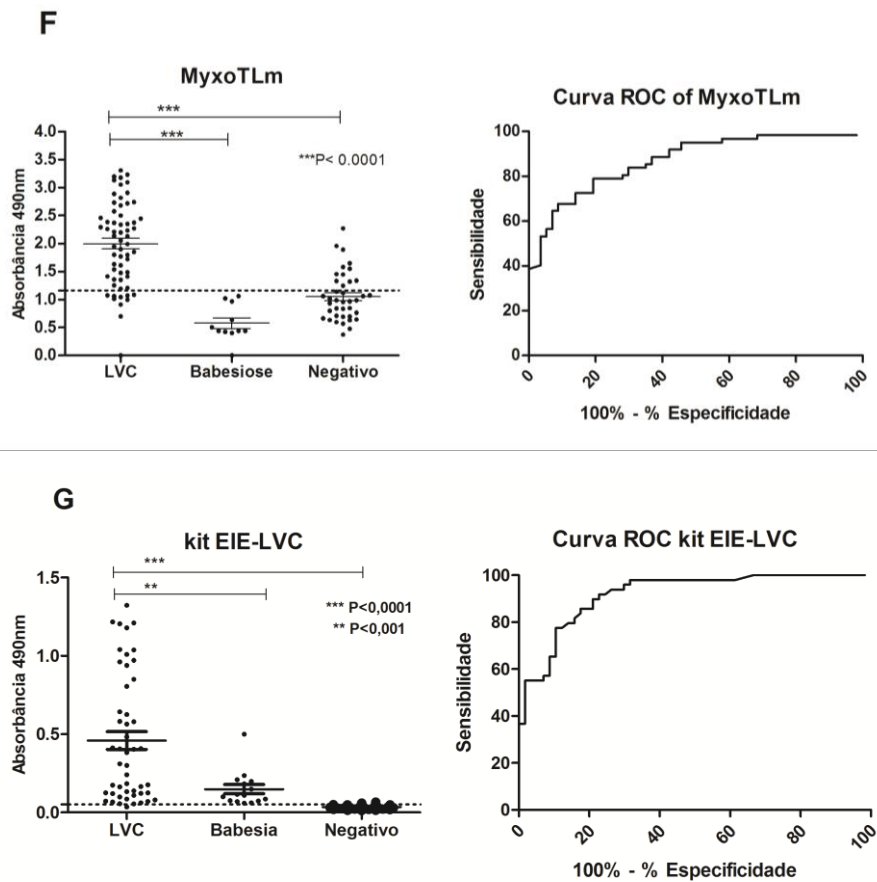


Figura 13: Gráfico da absorbância dos soros caninos do grupo infectado com *L. infantum* (LVC) e dos grupos controles, negativo (não infectado) e infectado com *Babesia* sp. (babesiose), contra os antígenos recombinantes e suas respectivas curvas ROC. (A) MyxoLi, (B) EctoLi, (C).MyxoTLi, (D) TyroLb, (E) MyxoLm, (F) MyxoTLm e (G) kit EIE-LVC. Nos gráficos à esquerda, o eixo das ordenadas representa a absorbância lida em 490 nm resultante do experimento. Cada ponto no gráfico corresponde à média de duplicatas e a linha pontilhada corresponde ao ponto de corte (*cutoff*) do experimento, selecionado com base na curva ROC de cada proteína, gráficos à direita. *** p < 0,0001 ** p < 0,001

Tabela 3: Resultado do ELISA para cães utilizando o antígeno MyxoLi.

MyxoLi		Presença da infecção		Total
		Presente	Ausente	
Resultado ELISA	Positivo	56	2	58
	Negativo	6	48	54
Total		62	50	112

Para avaliar o desempenho das proteínas recombinantes no ELISA para diagnóstico, foram calculados os parâmetros sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia (ACC).

De acordo com a Tabela 3, a proteína MyxoLi mostrou o melhor desempenho como antígeno no ELISA contra LVC, apresentando 56 soros de cães infectados com *L. infantum* acima do valor de *cutoff*, conferindo a este antígeno uma sensibilidade de

90%. Apenas 2 dos 50 soros não infectados com *Leishmania* apresentaram reatividade acima do *cutoff*, indicando uma especificidade de 96% para esta proteína. O VPP encontrado foi de 97%, enquanto o VPN foi de 89%. Portanto, a acurácia do teste foi de 93%. A área sob a curva ROC foi de 0,9616, indicando um teste com excelente qualidade para diagnóstico de LVC.

Tabela 4: Resultado do ELISA para cães utilizando o antígeno EctoLi.

EctoLi		Presença da infecção		Total
		Presente	Ausente	
Resultado ELISA	Positivo	55	8	63
	Negativo	7	42	49
Total		62	50	112

De acordo com a Tabela 4, a proteína EctoLi apresentou 55 soros de cães infectados com *L. infantum* acima do valor de *cutoff*, conferindo a este antígeno uma sensibilidade de 89%. Somente 8 dos 50 soros não infectados com *Leishmania* apresentaram reatividade acima do *cutoff*, indicando uma especificidade de 84% para esta proteína. O VPP encontrado foi de 87%, enquanto o VPN foi de 85%. Portanto, a acurácia do teste foi de 87%. A área sob a curva ROC foi de 0,9277, indicando que este teste apresenta uma excelente qualidade.

A Tabela 5 apresenta sumariamente os dados de desempenho no ELISA de todas as seis proteínas avaliadas. O ELISA, usando MyxoLi como antígeno, foi que apresentou melhor resultado, seguido de EctoLi, com valores de sensibilidade e especificidade descritos acima. A proteína MyxoTLi, que é a forma truncada desta proteína, apresentou sensibilidade 82% e especificidade de 90%, acompanhada por TyroLb com 89% de sensibilidade e 76% de especificidade. Por fim, MyxoLm e sua variante truncada MyxoTLm atingiram 67% e 82% de sensibilidade e 98% e 74% de especificidade, respectivamente. Quando é feita a comparação dos antígenos do estudo com o resultado do kit EIE-LVC, apesar da grande sensibilidade de 97% observada, este teste apresentou o menor valor de especificidade (68%), além da maior taxa de reação cruzada dentre todos os antígenos testados.

Tabela 5: Comparação do desempenho do ELISA para soros de cães com LVC realizado com os antígenos recombinantes e o kit EIE-LVC.

Antígeno	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	ACC (%)	Cutoff	Área sob a curva ROC
MyxoLi	90	96	97	89	93	0,9119	0,9616
EctoLi	89	84	87	85	86	0,6114	0,9277
MyxoTLi	82	90	91	81	87	0,9560	0,8752
TyroLb	89	76	82	84	83	0,6504	0,8961
MyxoLm	67	98	97	73	75	0,6004	0,8826
MyxoTLm	82	74	91	81	78	1,202	0,8694
kit EIE-LVC	97	68	72	97	82	0,0515	0,9184

Também é possível observar na Tabela 5 que o VPP do kit EIE-LVC foi o menor encontrado (72%). Esse valor indica a probabilidade de perante um resultado positivo, o cão estar realmente infectado com LVC. Portanto, resultados de VPP mais baixos aumentam-se as chances de resultados falsos positivos.

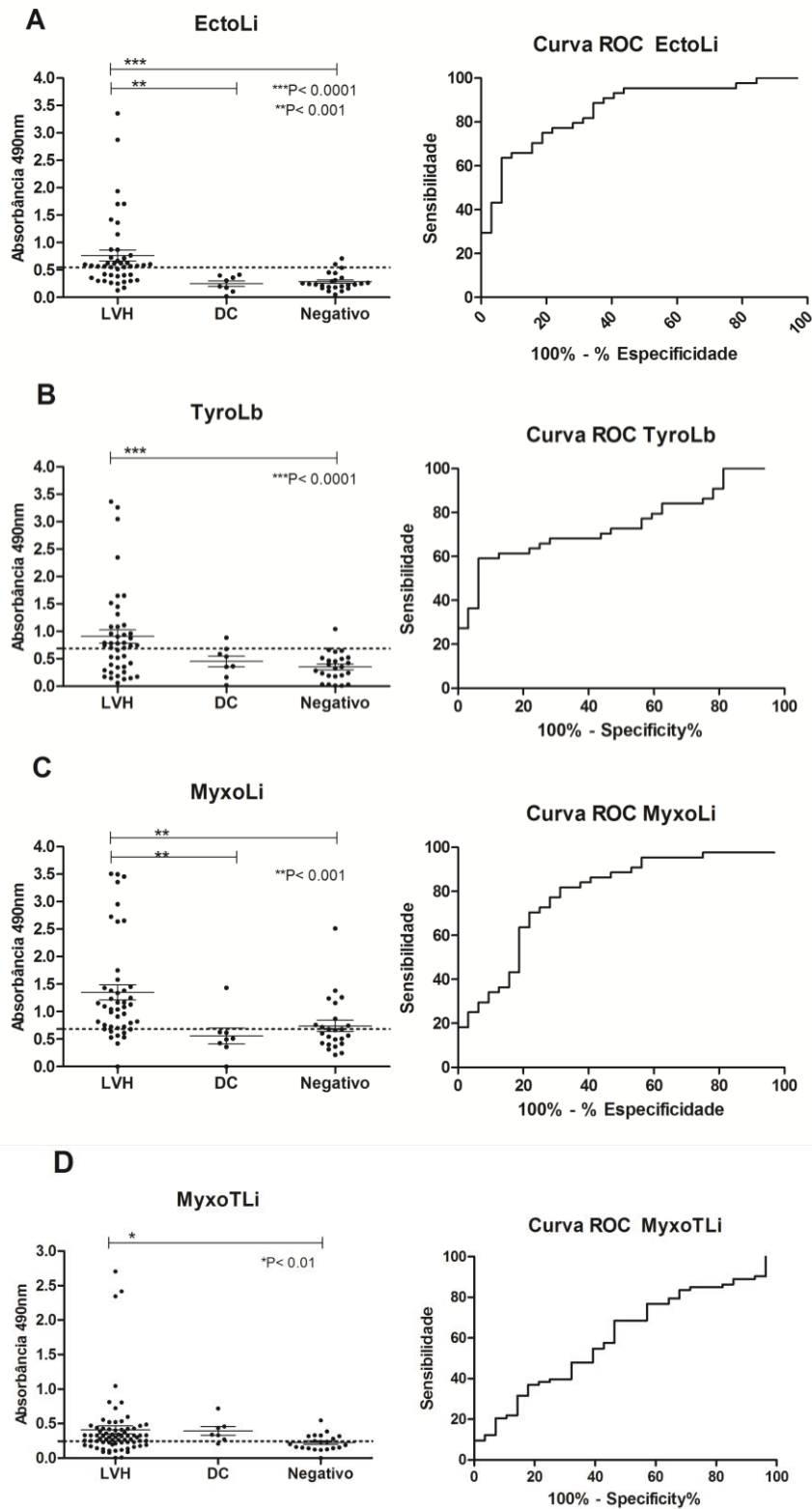
Com o valor de $p < 0,0001$, pode-se concluir que houve diferença significativa entre os grupos controles e infectado por *L. infantum* quando todas as proteínas recombinantes foram utilizadas como antígeno no teste diagnóstico. A maioria das proteínas apresentaram uma ótima sensibilidade e especificidade, sendo útil para determinar os verdadeiros positivos e verdadeiros negativos, o que possibilita diferenciar um cão com LVC de um não infectado ou infectado com *Babesia* sp.. Além disso, os testes apresentaram qualidade, baseada na área sob a curva ROC, entre boa e excelente para os seis antígenos recombinantes.

Vale ressaltar que, em função dos resultados obtidos no ELISA para a proteína MyxoLi aqui apresentado, foi feito pela Coordenadoria de Transferência e Inovação Tecnológica (CTIT) da UFMG um pedido de depósito de patente referente ao “Processo para produção de proteínas recombinantes de *Leishmania* para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina”, junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI). A documentação referente ao depósito da patente está descrita no Anexo II.

5.7.2 Avaliação as proteínas recombinantes como antígeno no ELISA para LVH

Em paralelo, foi testada a reatividade das proteínas recombinantes contra os soros humanos, através de experimentos de ELISA. Foram utilizados 44 soros de pacientes com LVH e, como controle negativo, 32 soros de humanos não infectados

com *Leishmania*, sendo 8 infectados com *T. cruzi* e 24 não infectados (controle negativo). A avaliação dos antígenos foi realizada por meio de comparação entre eles e o antígeno bruto de *L. infantum*. Os dados referentes à reatividade e curva ROC das proteínas recombinantes estão representados na Figura 14.



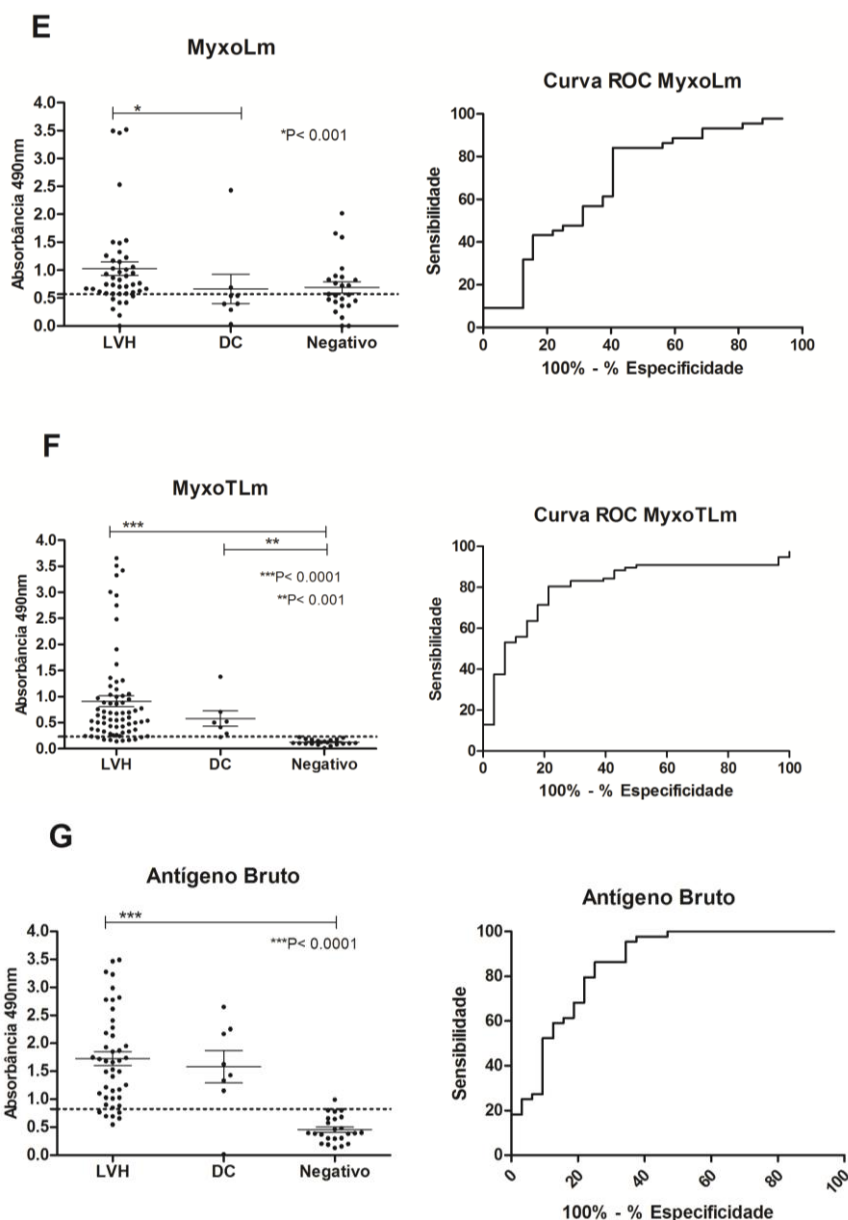


Figura 14: Comparação da reatividade das proteínas recombinantes e do antígeno bruto de *L. infantum* nos testes de ELISA com soros humanos e suas respectivas curvas ROC. (A) EctoLi, (B) TyroLb, (C) MyxoLi, (D) MyxoTLi, (E) MyxoLm, (F) MyxoTLm, e (G) Antígeno bruto de *L. infantum*. Os testes de ELISA foram realizados com os seguintes grupos de soros humanos: pacientes com leishmaniose visceral (LVH); pacientes com doença de Chagas (DC), para avaliação de reatividade cruzada; e indivíduos sadios (controle negativo). Nos gráficos de reatividade à esquerda, os eixos das ordenadas estão representando as absorbâncias de comprimento de 490 nm. Cada ponto no gráfico corresponde à média de duplicatas e a linha pontilhada corresponde ao ponto de corte (*cutoff*) do experimento, selecionado com base na curva ROC de cada proteína, gráficos à direita.

A proteína EctoLi apresentou o melhor desempenho contra os soros de humanos nos experimentos de ELISA e os resultados obtidos para essa proteína encontram-se resumidos na Tabela 6. De acordo com esses dados, a proteína EctoLi apresentou especificidade de 94% e sensibilidade de 64%. O VPP e VPN foram de 93% e 65%, respectivamente, e a área sob a curva ROC foi de 0,8587, indicando que este teste apresenta uma boa qualidade.

Tabela 6: Resultado do ELISA para humanos utilizando o antígeno EctoLi

EctoLi		Presença da infecção		Total
		Presente	Ausente	
Resultado do ELISA	Positivo	28	2	30
	Negativo	16	30	46
Total		44	32	76

Na Tabela 7, estão representados de maneira sumária os resultados do desempenho nos testes de ELISA das seis proteínas recombinantes e do antígeno bruto de *L. infantum*. TyroLb apresentou 94% de especificidade e 60% de sensibilidade. MyxoLi e sua variante truncada MyxoTLi, atingiram 69% e 54% de especificidade e 82% e 69% de sensibilidade, respectivamente. Por fim, MyxoLm, atingiu 60% de especificidade e 84% de sensibilidade, e sua variante truncada, MyxoTLm, 79% e 89% de especificidade e sensibilidade, respectivamente. Para comparação, o antígeno bruto de *L. infantum* apresentou 75% de especificidade e 87% de sensibilidade. Mesmo o antígeno bruto apresentado uma boa sensibilidade, ele não é capaz de distinguir pacientes com leishmaniose visceral (LVH) de pacientes com doença de Chagas (DC). Como pode ser observado na Figura 14, as proteínas EctoLi, MyxoLi e MyxoLm são capazes de diferenciar significativamente soros de paciente com LVC de pacientes com DC e apresentam um perfil sorológico de separação superior ao antígeno bruto.

Tabela 7: Comparação do desempenho do ELISA para soros de humanos com LVH realizado com as proteínas recombinantes e o antígeno bruto de *L. infantum*.

Antígeno	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	ACC (%)	Cutoff	Área sob a curva ROC
EctoLi	64	94	93	65	76	0,5462	0,8587
TyroLb	60	94	93	63	74	0,6895	0,7486
MyxoLi	82	69	78	72	75	0,6847	0,7859
MyxoTLi	69	54	79	29	64	0,2461	0,6037
MyxoLm	84	60	74	73	71	0,5692	0,6875
MyxoTLm	89	79	91	73	86	0,2318	0,8015
Ag. bruto <i>L. infantum</i>	87	75	82	80	81	0,8246	0,8558

Apesar de EctoLi apresentar uma menor sensibilidade quando comparado com antígeno bruto de *L. infantum*, esta proteína apresenta uma maior especificidade. Portanto, testes sorológicos utilizando EctoLi como antígeno são capazes de diferenciar significativamente os grupos de soros humanos sadios (controle negativo) e com LVH, com o valor de $p < 0,0001$, e de distinguir, com o valor de $p < 0,001$, entre os grupos de soros humanos com LVH e soros humanos com DC, o que não é possível com antígeno bruto. Assim, pode-se sugerir que EctoLi é um bom candidato para realização de sorodiagnóstico da LVH.

A maioria dos antígenos testados, apesar de não diferenciarem a infecção por *Leishmania* de *T. cruzi*, foi capaz de separar significativamente pacientes infectados de não infectados (Figura 14). Apenas a proteína MyxoLm não apresentou diferença estatística entre o grupo de soros de humanos sadios e com LVH (Figura 15E).

A reatividade cruzada com os soros de pacientes chagásicos foi claramente observada quando a proteína MyxoTLm foi usada como antígeno nos ensaios de ELISA (Figura 14F). Por esta razão, em uma primeira análise, esta proteína não é um bom candidato ao sorodiagnóstico da LVH, uma vez que se objetiva a separação das infecções causadas por *Leishmania* e *T. cruzi*. Porém, MyxoTLm demonstrou ser um excelente candidato para sorodiagnóstico e triagem de infecção por tripanossomatídeos (*Leishmania* + *T. cruzi*) (Figura 15). Esta proteína apresenta uma significativa capacidade de diferenciar soros de pacientes infectados com um desses parasitos e soros de indivíduos sadios, com $p < 0,0001$, além de ter exibido um excelente desempenho no teste de ELISA, com área sob a curva ROC de 0,9790 (Figura 15A).

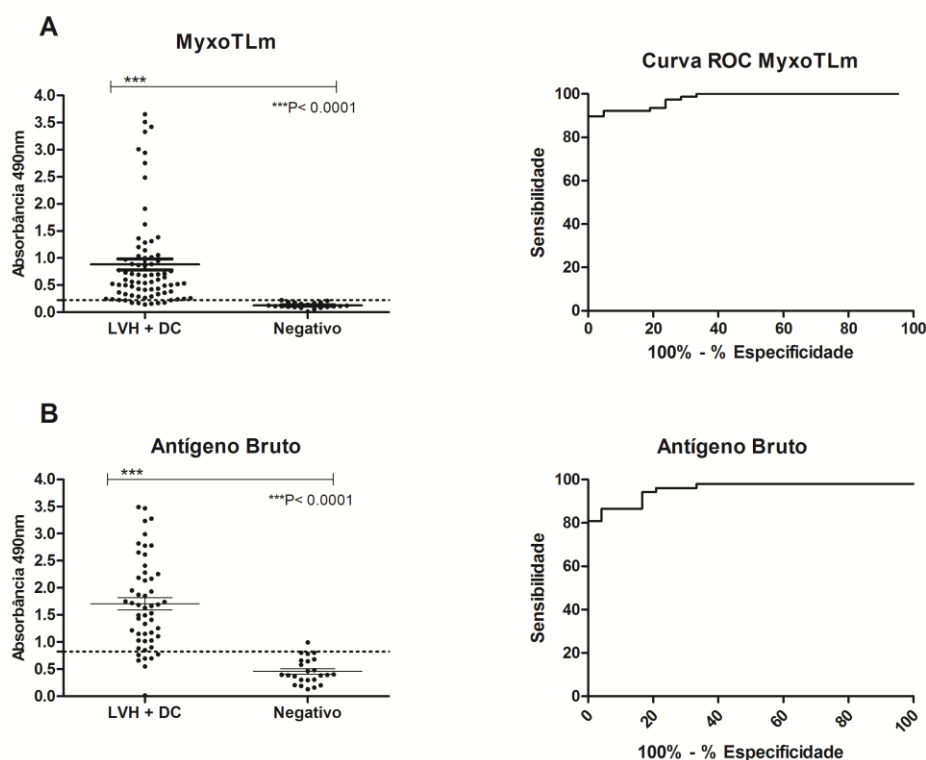


Figura 15: Comparação da reatividade da proteína MyxoTLM e do antígeno bruto de *L. infantum* e suas respectivas curvas ROC no teste de ELISA com soros humanos. Os testes de ELISA foram realizados com seguintes grupos de soros humanos: indivíduos sadios (negativo) e pacientes com leishmaniose visceral e doença de Chagas (LVH + DC). **(A)** MyxoTLM e **(B)** antígeno bruto de *L. infantum* foram utilizados para sensibilizar a placa de ELISA. Nos gráficos de reatividade à esquerda, os eixos das ordenadas estão representando as absorbâncias de comprimento de 490 nm. Cada ponto no gráfico corresponde à média de duplicatas e a linha pontilhada corresponde ao ponto de corte (*cutoff*) do experimento, selecionado com base na curva ROC de cada proteína, gráficos à direita.

Os resultados encontrados no ELISA com a proteína MyxoTLM e o antígeno bruto com soros de humanos, infectados com tripanossomatídeos ou não infectados, encontram-se resumidos nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8: Resultado do ELISA para humanos infectados com tripanossomatídeos utilizando o antígeno MyxoTLM.

MyxoTLM (LVH+DC)		Presença da infecção		Total
		Presente	Ausente	
Resultado do ELISA	Positivo	69	0	69
	Negativo	8	21	29
Total		77	21	98

Tabela 9: Resultado do ELISA para humanos infectados com tripanossomatídeos utilizando o antígeno bruto de *L. infantum*.

Antígeno bruto de <i>L. infantum</i> (LVH+DC)		Presença da infecção		Total
		Presente	Ausente	
Resultado do ELISA	Positivo	45	1	46
	Negativo	7	23	30
Total		52	24	76

A proteína recombinante MyxoTLm apresentou especificidade de 100% e sensibilidade de 90%, quando é utilizada como antígeno para diagnosticar um grupo infectado com tripanossomatídeos (LVH + DC) e um grupo de indivíduos sadios (negativo) (Tabela 10). Em comparação com a utilização de antígeno bruto de *L. infantum*, que apresenta uma especificidade de 96% e sensibilidade de 86%, a proteína MyxoTLm demonstrou ser um promissor antígeno para ser utilizado em triagem inicial de diagnóstico, principalmente em bancos de sangue.

Tabela 10: Comparação do desempenho do ELISA para soros de humanos infectados com tripanossomatídeos realizado com a proteína recombinante MyxoTLm e o antígeno bruto de *Leishmania*.

Antígeno	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	ACC (%)	Cutoff	Área sob a curva ROC
MyxoTLm (LVH+DC)	90	100	100	72	92	0,2242	0,9790
Ag. Bruto (LVH+DC)	86	96	98	77	89	0,8246	0,9551

Vale ressaltar que, em função dos resultados obtidos pela MyxoTLm aqui apresentados, foi feito pela Coordenadoria de Transferência e Inovação Tecnológica (CTIT) da UFMG o depósito da patente referente ao “Processo para produção de proteínas recombinantes de *Leishmania*, método e kit para triagem de tripanossomatídeos, e uso”, junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI). A documentação referente ao depósito da patente está descrita no Anexo II.

5.8 Seleção de peptídeos antigênicos das proteínas recombinantes

Os peptídeos presentes nas proteínas, que estão associados a regiões imunogênicas e que estão ausentes no hospedeiro ou em outros organismos frequentemente associados à reatividade cruzada, podem ser candidatos mais

promissores para uso no diagnóstico das leishmanioses, aumentando a sensibilidade e especificidade do teste, quando comparados com a proteína recombinante completa.

Para selecionar os peptídeos antigênicos presentes nas proteínas recombinantes usadas neste trabalho, sequências proteicas homólogas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. major* e *L. mexicana* foram obtidas no banco de dados TriTrypDB. Ortólogos no proteoma de *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas e responsável por alta reatividade cruzada sorológica no diagnóstico de pacientes portadores da LV, e sequências ortólogas dos hospedeiros *H. sapiens* e *C. familiaris* foram também incluídos nas análises de similaridade. Para encontrar as regiões conservadas, as sequências selecionadas foram alinhadas utilizando o algoritmo Clustal 2.1 (Chenna et al., 2003). As regiões conservadas entre as espécies de *Leishmania* foram submetidas ao algoritmo BepiPred (Larsen et al., 2006) para a predição de epítomos lineares de célula B. Este algoritmo prediz a probabilidade de cada aminoácido de uma sequência ser um epítomo de célula B e atribui um *score* a este resultado. O valor de *score* escolhido para validar um aminoácido como sendo parte de um epítomo foi de 1,3, que atribui ao mesmo uma sensibilidade de 96%, minimizando a probabilidade de ocorrência de falsos positivos. Epítomos preditos conservados entre as proteínas homólogas de parasitos do gênero de *Leishmania*, mas divergentes nos ortólogos de *T. cruzi* e nos hospedeiros homem e cão, foram selecionados como alvos para a síntese de peptídeos solúveis e posteriores análises de antigenicidade por ELISA (Figuras 16-19).

```

EctoLi -----
LbrM.15.0030 -----
LinJ.15.0030 -----
AFJ75402.2 -----
LmxM.15.0030 -----
LmjF.15.0030 -----
LdBPK_150030.1. -----
TcCLB.511571.49 MGAAMKQSMARSRRRLRRCISLTFALLCLFLVTVVYITAYTVGKFSMDARGREKLDLTD
TcCLB.506229.50 ----MKQSMARSRRRLRRCISLTFALLCLFLVTVVYITAYTVGKFSMDARGREKLDLTD
TCSYLVIO_010935. MGAAMKQSMARSRRRLRRCISLTFALLCLFLVTVVYITAYTVGKFSMDARGREKLDLTD
NP_001240.1 -----
XP_537507.2 -----

EctoLi -----MRPYS-----
LbrM.15.0030. -----MRPYS-----
LinJ.15.0030 -----MRPYS-----
AFJ75402.2 -----MRPYS-----
LmxM.15.0030 -----MRPYS-----
LmjF.15.0030 -----MRPYS-----
LdBPK_150030.1 -----MRPYS-----
TcCLB.511571.49 I I H S M T R R F Q E C Q A Q K Q L L K N G H T T A R M A L E I A Q E T K K K L E M E L G L M R N R N T L M L Q S V E E
TcCLB.506229.50 I I H S M T K R F Q E C Q A Q K Q L L K N G H T T A R M A L E I A Q E T K K K L E M E L G L M R N R N T L M L Q S V E E
TCSYLVIO_010935 I I H S M T R R F Q E C Q A Q K Q L L K N G H T T A R M A L E I A Q E T K K K L E M E L G L M R N R N T L M L Q S V E E
NP_001240.1 -----
XP_537507.2 -----

```

EctoLi
LbrM.15.0030
LinJ.15.0030
AFJ75402.2
LmxM.15.0030
LmjF.15.0030
LdBPK_150030.1
TcCLB.511571.49
TcCLB.506229.50
TCSYLVI0_010935
NP_001240.1
XP_537507.2

-----SVRRMTQQSKRL---RIAGTLVLSA-----LVIFGFLVYY
-----SVRRMTQQSNRL---RVIGVLVLSA-----FVLFGFVIYS
-----SVRRMTQQSKRL---RIAGTLVLSA-----LVIFGFLVYY
-----SVRRMTQQSKRL---RVAGTLVLSA-----LVLFGFVVYH
-----SVRRMTQQSKRL---RVAGTLVLSV-----LVLFGFIVYH
-----SVRRMTQQSKRL---RVASTLVLSA-----LVIFGFLVYH
-----SVRRMTQQSKRL---RIAGTLVLSA-----LVIFGFLVYY
CKKELELLKENGREGAVTLALQLDRLTKERQLYMDAIAVAVNRSSDVGRRTADVFAAIAKE
CKKELELLKENGREGAVTLALQLDRLTKERQFYMDAIAVAVNRSSDVGRRTADVFAAIAKE
CKKELELLKENGREGAVTLALQLDRLTKERQFYMDAIAVAVNRSSDVGRRTADVFAAIAKE
-----MATSWG-----TVFFMLVASC-----VCSAVSHRN
-----MATTWG-----AAFMLVASC-----VCSTVFHRD

EctoLi
LbrM.15.0030
LinJ.15.0030
AFJ75402.2
LmxM.15.0030
LmjF.15.0030
LdBPK_150030.1
TcCLB.511571.49
TcCLB.506229.50
TCSYLVI0_010935
NP_001240.1
XP_537507.2

QSPL-----LSPCDSAYANVYDVVIDAGSTGSRVHVVFQYERGRGTGLV--LLRERF
ESPW-----FSPCNSPYSNVYDVIDAGSTGSRVHVVFQYERSSTGVI--LLRERF
QSPL-----LSPCDSAYANVYDVVIDAGSTGSRVHVVFQYERGRGTGLV--LLRERF
KSPL-----FSPCDSAYANVYDVIDAGSTGSRVHVVFQYERSRTGVV--LLKERF
KSPL-----FSPCDSAYANVYDVIDAGSTGSRVHVVFQYERSRTGVV--LLKERF
QSPL-----FSPCDSAYANVYDVVIDAGSTGSRVHVVFQYERGTGFV--LLRERF
QSPL-----LSPCDSAYANVYDVVIDAGSTGSRVHVVFQYERGRGTGLV--LLRERF
FDEWEDAAPNKTELLTNCNN-AMRRYSIVFDAGSTGSRVHVFRYNLTSTPHAG---NFSW
FDEWEDAAPNKTELLTNCNN-AMRRYSIVFDAGSTGSRVHVFRYNLTSTPHAG---NFSW
FDEWEDAAPNKTELLTNCNN-AMRRYSIVFDAGSTGSRVHVFRYNLTSTPHAG---NFSW
QQTWFEGIF--LSSMCPINVSASTLYGIMFDAGSTGTRIHVYTFVQKMPGQLPILEGEVF
QQTWFEGVF--LSSMCPINVSASTLYGIMFDAGSTGTRIHVYTFVQKIPGQLPILEGEIF

EctoLi
LbrM.15.0030
LinJ.15.0030
AFJ75402.2
LmxM.15.0030
LmjF.15.0030
LdBPK_150030.1
TcCLB.511571.49
TcCLB.506229.50
TCSYLVI0_010935
NP_001240.1
XP_537507.2

KRVEPGLSSF-----ATDPDGAKESLAGLLRFADKVVPPQSYQKCTFVT
KRIEPLSSFF-----ATDQEGAKQSLAGLLRFADKVVPPQSYQKCTFVT
KRVEPGLSSFF-----ATDPDGAKESLAGLLRFADKVVPPQSYQKCTFVT
KRIEPLSSFF-----ATDPDGAKESLTLGLLRFADKVVPPQSYQKCTFVT
KRIEPLSSFF-----TDDPDGAKESLTLGLLRFADKVVPPQSYQKCTFVT
KRAEPDLSSFF-----ATDDLGAASLEGLLRFADKVVPPQSYQKCTFVT
KRVEPGLSSFF-----ATDPDGAKESLAGLLRFADKVVPPQSYQKCTFVT
NGTRPSLASFRLRDLDELFFVENYEPSSLANPNDAVASLSPLLEAAKAYIPESLHACVPIE
NGTRPSLASFRLRDLDELFFVENYEPSSLANPNDAVASLSPLLEAAKAYIPESLHACVPIE
NGTRPSLASFRLRDLDELFFVENYEPSSLANPNDAVASLSPLLEAAKAYIPESLHACVPIE
DSVKPGLSAF-----VDQPKQGAETVQGLLEVAKDSIPRSHWKKTPVV
DSVKPGLSAF-----VDQPKQGAETVQGLLEVAKDSIPRSHWKKTPVV

EctoLi
LbrM.15.0030
LinJ.15.0030
AFJ75402.2(L.
LmxM.15.0030
LmjF.15.0030
LdBPK_150030.1
TcCLB.511571.49
TcCLB.506229.50
TCSYLVI0_010935
NP_001240.1
XP_537507.2

LKATAGLRLLPESVQQVLLDAAQHTLNASPFQS----RGASIIISGAQEGVYGWLTVNYLL
LKATAGLRLLPESVQQVLLDAAQHTLNASPFQS----RGASIIISGAQEGVYGWLTVNYLL
LKATAGLRLLPESVQQVLLDAAQHTLNASPFQS----RGASIIISGAQEGVYGWLTVNYLL
LKATAGLRLLPESDQQM-LDAAQQALNAPFQS----RGASIIISGAQEGVYGWLTVNYLL
LKATAGLRLLPESDQQVLLDAAQHTLNASPFQS----RGASIIISGAQEGVYGWLTVNYLL
LKATAGLRLLPESAQQALLDVAQHTLNASPFQS----RGASIIISGAQEGVYGWLTVNYLL
LKATAGLRLLPESVQQVLLDAAQHTLNASPFQS----RGASIIISGAQEGVYGWLTVNYLL
MKATAGLRRIGREHAEAVLDVRRRLFARGPFWMQSELDVSRILEGWEGLPLAWLTVNYLL
MKATAGLRRIGREHAEAVLDVRRRLFARGPFWMQSELDVSRILEGWEGLPLAWLTVNYLL
MKATAGLRRIGREHAEAVLDVRRRLFARGPFWMQSELDVSRILEGWEGLPLAWLTVNYLL
LKATAGLRLLPESHAKALLFEVKEIFRKSPLV--PKGSVIMDGSDEGILAWVTVNFILT
LKATAGLRLLPESHAKALLFEVREIFRKSPLV--PNDSVIMDGSYEGILAWVTVNFILT

EctoLi
LbrM.15.0030
LinJ.15.0030
AFJ75402.2.
LmxM.15.0030
LmjF.15.0030
LdBPK_150030.1
TcCLB.511571.49
TcCLB.506229.50
TCSYLVI0_010935
NP_001240.1
XP_537507.2

NRLDT-DVATVATIDMGGASTQVVFETTPTS-G-WLPPFNIAHQLRTPKRTITMYQHSYLG
NRLDK-EGATVATIDMGGASTQVVFETKFTS-GEWLPFNIAHQLRTPKRTIAMYQHSYLG
NRLDT-DVATVATIDMGGASTQVVFETTPTS-G-WLPPFNIAHQLRTPKRTITMYQHSYLG
DRLDT-DVATIATIDMGGASTQVVFETTPTS-GEWLPFNIAHQLRILKRTISVYQHSYLG
DRLDT-DVATIATIDMGGASTQVVFETTPTS-GEWLPFNIAHQLRIPKRTISVYQHSYLG
DRLDT-DVATVATIDMGGASTQVVFETTPTS-GEWLPFNIAHQLRTPKRTITMYQHSYLG
NRLDT-DVATVATIDMGGASTQVVFETTPTS-G-WLPPFNIAHQLRTPKRTITMYQHSYLG
GALNG-DNNTATILDGGGSTQIVMHPSPDKAIEA-YAEFSYALKVNGRSFVVYQHSYEG
GALNG-DKNTATILDGGGSTQIVMHPSPDKAIEA-YAEFSYALKVNGRSFVVYQHSYEG
GALNG-DKNTATILDGGGSTQIVMHPSPDKAIEA-YAEFSYALKVNGRSFVVYQHSYEG
GQLHGHRSQETVGTLDLGGASTQITFLPQFEKTEQTPRGYLTSEFEMFNSTYKLYTHSYLG
GQLHGHRSQETVGTLDLGGASTQITFLPQFEKTEQTPRGYLTSEFEMFNSTYKLYTHSYLG

EctoLi
LbrM.15.0030
LinJ.15.0030
AFJ75402.2
LmxM.15.0030
LmjF.15.0030

LGMNEAKKLMMSFAE-----ANGTSSFPFCFPRGYAKR
LGLNEAKKLMTLFAK-----VNGTSPFCFPRRHTEH
LGMNEAKKLMMSFAE-----ANGTSSFPFCFPRGYAKR
LGMNEAKKLMTLFAE-----ANGTSSFPFCFPRGYTKH
LGMNEAKKLMTLFAE-----ANGTSSFPFCFPRGYTKH
LGMNEAKKLMTLFAE-----ANGTSSFPFCFPRGYTKR

```

LdBPK_150030.1      LGMNEAKKKLMMSFAE-----ANGTSSFFPCFPRGYAKR
TcCLB_511571.49    NGLHAAKEQLLQAVAAANNTGANSKVQAANKIATGTDATPGASADVAVDAFPCFPKGYVHT
TcCLB_506229.50    NGLHAAKEQLLQAVAAANNTGANSKVQEANKIATGTTEATPGASADVAVDAFPCFPKGYVHT
TCSYLVI0_010935    NGLHAAKEQLLQAVAAANNTGANSKVQEANKIATGTDATPGASADVAVDAFPCFPKGYVHT
NP_001240.1        FGLKAAARLATLGALETEGT-----DGHTFRSACLPRWLEAE
XP_537507.2        FGLKAAARLATLGALETEGI-----DGHTFRSACLPRWLEAE

EctoLi
LbrM.15.0030      --LNDVELRNSD----ATDFDACAGLFREHVITK-TTCKFDACGARGVPPQLFP-SRQHL
LinJ.15.0030      --LNGVELRNGD----STDFDVCVNLFREHVITK-PICRFDACGARGVPPQLFP-SKQHP
AFJ75402.2        --LNDVELRNSD----ATDFDACAGLFREHVITK-TTCKFDACGARGVPPQLFP-SRRHL
LmxM.15.0030      --LNDVKLNNND----ATDFDACVGLFREHVITK-STCRFDACGARGVPPQLFP-SRRHP
LmjF.15.0030      --LNGVELRNSD----ATDFDACVGLFREHVITK-ATCRFDACGARGVPPQLFP-SRRHP
LdBPK_150030.1    --LNDVELRNSD----ATDFDACAGLFREHVITK-TTCKFDACGARGVPPQLFP-SRRHL
TcCLB_511571.49   --ETGIS--NTRDGGKVPSMEECSALFRRHVVRKHQP CGSNSCGFNGVFQPDISAVPMVP
TcCLB_506229.50   --ETGIS--NTRDGGKVPSMEECSALFRRHVVRKHQP CGSNSCGFNGVFQPDISAVPMVP
TCSYLVI0_010935   --ETGIS--NTRDGGKVPSMEECSALFRRHVVRKHQP CGSNSCGFNGVFQPDISAVPMVP
NP_001240.1       WIFGKVYQYGGNQEGEVGFEP CYAEVL-----RVVRGKQLHQPEE-VQRGS
XP_537507.2       WIFGKVYQYGGNKEGKMGFEP CYAEVL-----RVVQGKQLHQPEE-VQRSS

EctoLi
LbrM.15.0030      IYAFSYFYDRLYHFS----KEGSPVYVSSYKEVGQEVCHRESAR-----RTTA
LinJ.15.0030      IYAFSYFYDRLYHFR----SEGFVYVSSYKELGREVCQRESAD-----HTTT
AFJ75402.2        IYAFSYFYDRLYHFS----KEGSPVYVSSYKEVGQEVCHRESAR-----RTTA
LmxM.15.0030      VYAFSYFYDRLYHFH----KEGRPVYVSLYKEVGKEVCHRESAS-----RATT
LmjF.15.0030      VYAFSYFYDRLYHFH----KEGRPVYVSLYKEVGKEVCHRESAS-----RATT
LdBPK_150030.1    IYAFSYFYDRLYDFL----KEGSQVYVSSYKEVGQEVCHRESAR-----RTTA
TcCLB_511571.49   IYAFSYFYDRLYHFS----KEGSPVYVSSYKEVGQEVCHRESAR-----RTTA
TcCLB_506229.50   VYAFSYFYDRLKPYI----KDEVIRVQDVLDIASQVCRSMKSVRELLEQNDTK-----
TCSYLVI0_010935   VYAFSYFYDRLKPYI----KDEVIRVQDVLDIASQVCRSMKSVRELLEQNDTKKKNKGS
NP_001240.1       FYAFSYFYDRAVDTDMIDYEKGGILKVEDFERKAREVCDNLEN-----FTS
XP_537507.2       FYAFSYFYDRAVDTGMIDYETGGVLKVEDFERKAREVCDNLEN-----FTS

EctoLi
LbrM.15.0030      PEETACMELAYMYSFLTYGLGLSDATALTVPNRIEGMAVSWSLGSSLSFVLKME---
LinJ.15.0030      PKETTACMELAYLYSFLTHGLGLSDDRRTLEVPNRIEGIAVSWSLGCSLSFVLKME---
AFJ75402.2        PEETACMELAYMYSFLTYGLGLSDATALTVPNRIEGMAVSWSLGSSLSFLLKME---
LmxM.15.0030      PEETACMELAYLYSFLTNGGLGDDTALTVPNRIAGMSVSWSLGSSLSFLLKME---
LmjF.15.0030      PEETACMELAYLYSFLTNGGLGDDTALTVPNRIAGMSVSWSLGSSLSFLLKME---
LdBPK_150030.1    PEETACMELAYMYSFLTYGLGLSDATVLTVPNRIEGMAVSWSLGSSLSFLLKME---
TcCLB_511571.49   -----
TcCLB_506229.50   KPEMECFELSYLFTLLRYGFGFPPEQKLHI AKKINGFETAWALGASLVSLEGGQA--
TCSYLVI0_010935   KPEMECFELSYLFTLLRYGFGFPLEQKLHI AKKINGFETAWALGASLVSLEGGYA--
NP_001240.1       GSPFLCMDLSYITALLKDGFGFADSTVQLTKKVNNIETGWALGATFHLLQSLGISH
XP_537507.2       GSPFLCMDLSYITALLKDGFGFADSTVQLSKKVNNIETGWALGATFHLLQSLGISH

```

Figura 16: Predição de epítomos polimórficos lineares de linfócitos B na proteína ATP difosfohidrolase de *L. infantum*. Alinhamento entre a proteína recombinante EctoLi, a proteína do banco de dados de *L. infantum* (LinJ.15.0030) e ortólogos presente em *L. braziliensis* (LbrM.15.0030), *L. amazonensis* (AFJ75402.2), *L. mexicana* (LmxM.15.0030), *L. major* (LmjF.15.0030), *L. donovani* (LdBPK_150030.1), *T. cruzi* haplótipo Esmeraldo (TcCLB.511571.49) e não-Esmeraldo CL Brener (TcCLB.506229.50), *T. cruzi* cepa Sylvio (TCSYLVI0_010935), *H. sapiens* (NP_001240.1) e *C. familiaris* (XP_537507.2). Os epítomos preditos selecionados estão marcados em amarelo na sequência de EctoLi. Os aminoácidos marcados em vermelho mostram a região de homologia entre os ortólogos da proteína.

```

MyxoLi
LbrM.29.2180      MDQLISVINELHDAFAGVKMNIKLNLPQIAVVGVSQSCGKSSVLESIVGKDFLPRGSGIVT
LinJ.29.2310      MDQLISVINELHDAFAGVKMNIKLNLPQIAVVGVSQSCGKSSVLESIVGKDFLPRGSGIVT
XP_003872337.1    MDQLISVINELHDAFAGVKMNIKLNLPQIAVVGVSQSCGKSSVLESIVGKDFLPRGSGIVT
LmxM.08.29.2200   MDQLISVINELHDAFAGVKMNIKLNLPQIAVVGVSQSCGKSSVLESIVGKDFLPRGSGIVT
LmjF.29.2200      MNQLISVINELHDAFAGVKMNIKLNLPQIAVVGVSQSCGKSSVLESIVGKDFLPRGSGIVT
LdBPK_292310.1    MDQLISVINELHDAFAGVKMNIKLNLPQIAVVGVSQSCGKSSVLESIVGKDFLPRGSGIVT
TcCLB_503671.39   MNQLIAVVNELHDAFANVKMNIKLNLPQIAVVGVSQSSGKSSVLEAIVGKDFLPRGSGIVT
TcCLB_508187.10   -----
TCSYLVI0_007449   MNQLIAVVNELHDAFANVKMNIKLNLPQIAVVGVSQSSGKSSVLEAIVGKDFLPRGSGIVT
AAD39541.1        MEALIPVINKLQDVFNITVGADI-IQLPQIVVVGTTQSSGKSSVLESIVGRDLLPRGTGIVT
XP_864886.1       MEALIPVINKLQDVFNITVGADI-IQLPQIVVVGTTQSSGKSSVLESIVGRDLLPRGTGIVT

```

MyxoLi RCPLVLQLVQLPKS-----NNEEWGEFLHIPNKKFYDFNEIQNEITRRTIEMA
LbrM.29.2180 RCPLVLQLVQLPFS-----NSEEWGEFLHIPNKKFYDFNAIQEEITRRTIEVA
LinJ.29.2310 RCPLVLQLVQLPKS-----NNEEWGEFLHIPNKKFYDFNEIQNEITRRTIEMA
XP_003872337.1 RCPLVLQLVQLPKS-----NNEEWGEFLHIPQKKFYDFNEIQNEITRRTIEMA
LmxM.08_29.2200 RCPLVLQLVQLPKS-----NNEEWGEFLHIPQKKFYDFNEIQNEITRRTIEMA
LmjF.29.2200 RCPLVLQLVQLPKS-----NNEEWGEFLHIPNKKFYDFNEIQNEITRRTIEIA
LdBPK_292310.1 RCPLVLQLVQLPKS-----NNEEWGEFLHIPNKKFYDFNEIQNEITRRTIEMA
TcCLB.503671.39 RCPLVLQLVQLPKT-----SEEWGEFLHKPNKKYDFLEINEEIKHRTVEIA
TcCLB.508187.10
TCSYLVIO_007449 RCPLVLQLVQLPKT-----SEEWGEFLHKPNKKYDFLEINEEIKHRTVEIA
AAD39541.1 RRPLILQLVHVHTQEDKRKTTGEENGVEAEWGFHLHTKNKLYTDFDEIRQEIENETERIS
XP_864886.1 RRPLILQLVHVSPEDKRKTTGEENGVEAEWGFHLHTKNKLYTDFDEIRQEIENETERIS

MyxoLi GP-SAITDKPISLKVYSNTVLNLTLDLPLGLVMNAVGDQPKDIDRQIKDMVTRYVSPKNT
LbrM.29.2180 GP-HAITDKPINLKVYSNMVLNLTLDLPLGLVMNAVGD-PKIDRQIKDMVTRYVSPKNT
LinJ.29.2310 GP-SAITDKPISLKVYSNTVLNLTLDLPLGLVMNAVGDQPKDIDRQIKDMVTRYVSPKNT
XP_003872337.1 GP-SAITDKPISLKVYSKTVLNLTLDLPLGLVMNAVGDQPKDIDRQIKDMVTRYVSPKNT
LmxM.08_29.2200 GP-SAITDKPISLKVYSKTVLNLTLDLPLGLVMNAVGDQPKDIDRQIKDMVTRYVSPKNT
LmjF.29.2200 GP-SAITDKPINLKVYSNAVLTLDLPLGLVMNAVGDQPKDIDRQIKDMVTRYVLPKNT
LdBPK_292310.1 GP-SAITDKPISLKVYSNTVLNLTLDLPLGLVMNAVGDQPKDIDRQIKDMVTRYVSPKNT
TcCLB.503671.39 GN-SAISERPINLKVYSKNVLNLTLDLPLGLVMNAVGDQPKDIDRQIKEMVTRYVAVPNT
TcCLB.508187.10 -----
TCSYLVIO_007449 GN-SAISERPINLKVYSKNVLNLTLDLPLGLVMNAVGDQPKDIDRQIKEMVTRYVAVPNT
AAD39541.1 GNNKGVSPPEIHLKIIFSPNVNLTLDLPLGTMKVPVGDQPKDIELQIRELILRFISNPNS
XP_864886.1 GNNKGVSPPEIHLKIIFSPHVNLTLDLPLGTMQVPGVGDQPKDIELQIRELILRFISNPNS

MyxoLi IILAI SPANTDLATSQSLRLAKQLDPEGVRTFGVLTKEIDLMDKGTDCFDVLQNKVLQLRH
LbrM.29.2180 IILAI SPANTDLATSQSLRLAKQLDPEGTRTVGVLTKEIDLMDKGTDCFDVLQNKVHLHRH
LinJ.29.2310 IILAI SPANTDLATSQSLRLAKQLDPEGVRTFGVLTKEIDLMDKGTDCFDVLQNKVLQLRH
XP_003872337.1 IILAI SPANTDLATSQSLRLAKQLDPEGVRTFGVLTKEIDLMDKGTDCFDLILQNRVQLRH
LmxM.08_29.2200 IILAI SPANTDLATSQSLRLAKQLDPEGVRTFGVLTKEIDLMDKGTDCFDLILQNRVQLRH
LmjF.29.2200 IILAI SPANTDLATSQSLRLAKQLDPEGVRTFGVLTKEIDLMDKGTDCFDVLQNKVLQLRH
LdBPK_292310.1 IILAI SPANTDLATSQSLRLAKQLDPEGVRTFGVLTKEIDLMDKGTDCFDVLQNKVLQLRH
TcCLB.503671.39 IILAI SPANTDLATSQSLRLAKQLDPEGVRTFGVLTKEIDLMDKGTDCFDLILQNRVQLRH
TcCLB.508187.10 IILAI SPANTDLATSQSLRLAKQLDPEGVRTFGVLTKEIDLMDKGTDCFDLILQNRVQLRH
TCSYLVIO_007449 IILAI SPANTDLATSQSLRLAKQLDPEGVRTFGVLTKEIDLMDKGTDCFDLILQNRVQLRH
AAD39541.1 IILAVTAANTDMATSEALKISREVDPDGCRTLAVITKLDLMDAGTDAMDVLMGRVIPVKL
XP_864886.1 IILAVTAANTDMATSEALKISREVDPDGRRTLAVITKLDLMDAGTDAMDVLMGRVIPVKL

MyxoLi GFVGVVCRSQDINDRKSMEARRSQYEFFANSPIYSPIAEEAGTAYLSKKNLFLLEHI
LbrM.29.2180 GFVGVVCRSQDINDRKSMEARRSQYEFFANSPTYSPIAEEAGTVYLSKKNLFLLEHI
LinJ.29.2310 GFVGVVCRSQDINDRKSMEARRSEYEFFANSPIYSPIAEEAGTAYLSKKNLFLLEHI
XP_003872337.1 GFVGVVCRSQDINDRKSMEARRSEYEFFANSPIYSPIAEEAGTAYLSKKNLFLLEHI
LmxM.08_29.2200 GFVGVVCRSQDINDRKSMEARRSEYEFFANSPIYSPIAEEAGTAYLSKKNLFLLEHI
LmjF.29.2200 GFVGVVCRSQDINDCKSMEDARRSEYEFFANSPIYSPIAEEAGTAYLSKKNLFLLEHI
LdBPK_292310.1 GFVGVVCRSQDINDRKSMEARRSEYEFFANSPIYSPIAEEAGTAYLSKKNLFLLEHI
TcCLB.503671.39 GFVGVVCRSQDINDRKSMEARRSEYEFFANSPIYSPIAEEAGTAYLSKKNLFLLEHI
TcCLB.508187.10 GFVGVVCRSQDINDRKSMEARRSEYEFFANSPIYSPIAEEAGTAYLSKKNLFLLEHI
TCSYLVIO_007449 GFVGVVCRSQDINDRKSMEARRSEYEFFANSPIYSPIAEEAGTAYLSKKNLFLLEHI
AAD39541.1 GFVGVVNRSQDINDSKGMLAAREDERAFHFNHPSYSIAADRQTEYLAKKLNQ-----
XP_864886.1 GFVGVVNRSQDINDSKGMLAAREDERAFHFNHPSYSIAADRQTEYLAKKLNQLLQH
GIIGVVNRSQLDINNKSVDTSIRDEYAFLOK--KYP LANRNGTKYLARTLNRLMHHI
GIIGVVNRSQLDINNKSVDTSIRDEYAFLOK--KYP LANRNGTKYLARTLNRLMHHI

MyxoLi KAVIPDLKRHVDQLMEATKKQMEKLGMEQDITEPTAQLLYLIKLFSDTLNQTIDGGIT-
LbrM.29.2180 KSVIPDLKRHVDQLMEATRKQMEKLGMEQDITEPTAQLLYLIKLFSDTVNQTIDGGIT-
LinJ.29.2310 KAVIPDLKRHVDQLMEATKKQMEKLGMEQDITEPTAQLLYLIKLFSDTLNQTIDGGIT-
XP_003872337.1 KAVIPDLKRHVDQLMEATKKQMEKLGMEQDITEPTAQLLYLIKLFSDTLNQTIDGGIT-
LmxM.08_29.2200 KAVIPDLKRHVDQLMEATKKQMEKLGMEQDITEPTAQLLYLIKLFSDTLNQTIDGGIT-
LmjF.29.2200 KAVIPDLKRHVDQLMEATKKQMEKLGMEQDITEPTAQLLYLIKLFSDTLNQTIDGGIT-
LdBPK_292310.1 KAVIPDLKRHVDQLMEATKKQMEKLGMEQDITEPTAQLLYLIKLFSDTLNQTIDGGIT-
TcCLB.503671.39 -----
TcCLB.508187.10 -----
TCSYLVIO_007449 KDVIPDLKRHVDQLMEATKKQMEKLGMEQDITEPTAQLLYLIKLFSDTLNQTIDGGIT-
AAD39541.1 RDCLPELKRTRINVLAAQYQSL---LNSYGEPEVDDKSA TLQLITKFA TEYCNTIEGTAKY
XP_864886.1 RDCLPELKRTRINVLAAQYQSL---LNSYGEPEVDDKSA TLQLITKFA TEYCNTIEGTAKY

MyxoLi DATKELGGARLDYIFHECFATYVTSLSATKDLTDDYIRINTRNMAGMHATLFPDQVFF
LbrM.29.2180 DATKELGGARLDYIFHECFATYVTSLSARKDLTDDYIRINTRNMAGMHATLFPDQVFF
LinJ.29.2310 DATKELGGARLDYIFHECFATYVTSLSATKDLTDDYIRINTRNMAGMHATLFPDQVFF
XP_003872337.1 DATKELGGARLDYIFHECFATYVTSLSATKDLTDEYIRINTRNMAGMHATLFPDQVFF
LmxM.08_29.2200 DATKELGGARLDYIFHECFATYVTSLSATKDLTDEYIRINTRNMAGMHATLFPDQVFF
LmjF.29.2200 DATKELGGARLDYIFHECFATYVTSLSATKDLTDDYIRINTRNMAGMHATLFPDQVFF

LdBPK_292310.1 DATKELGGARLDYIFHECFATYVTSLSATKDLTDDYIRINTRNMAGMHATLFPDQVVF
TcCLB_503671.39 -----
TcCLB_508187.10 -----
TCSYLVI0_007449 DATKELMGGARLDYIFNECFAAVYVNGLTAKKELTDEYIRINARNMAGMHSALFPDQVVF
AAD39541.1 IETSELCCGGARICYIFHETFGRTLESVDPLGGLNTIDILTAIRNATGPRPALFVPEVSFE
XP_864886.1 IETSELCCGGARICYIFHETFGRTLESVDPLGGLNTIDILTAIRNATGPRPALFVPEVSFE

MyxoLi ALSKQQITRLEEPICIKCVTFVYEELTKIVEICAG----KVD RYPNLKDAIISICKKMLLD
LbrM.29.2180 ALSKQQIARLEEPSIKCVSFVYEELINIVNICAA----KVD RYPNLKQAIISICHNMLLD
LinJ.29.2310 ALSKQQITRLEEPICIKCVTFVYEELTKIVEICAG----KVD RYPNLKDAIISICKKMLLD
XP_003872337.1 ALSKQQITRLEEPICIKCVTFVYEELS KIVETCAG----KVD RYPNLKEAIISICKKMLLD
LmxM.08_29.2200 ALSKQQITRLEEPICIKCVTFVYEELS KIVETCAG----KVD RYPNLKEAIISICKKMLLD
LmjF.29.2200 ALSKQQINRLEEPICIKCVTFVYEELGKIVEICAG----KVD RYPNLKEAVIAICKKMLFD
LdBPK_292310.1 ALSKQQITRLEEPICIKCVTFVYEELTKIVEICAG----KVD RYPNLKDAIISICKKMLLD
TcCLB_503671.39 -----
TcCLB_508187.10 -----PL*NICRQSLQE
TCSYLVI0_007449 ALSRQQIARLEEPSQKCVQVFEELIKIVDICAS----KLDNFPRLKQAVVDICRQSLQE
AAD39541.1 LLVKRQIKRLEEPSLRVELVHEEMQRI IQHCSNYSTQELLRFPKLHDAIVEVVTCLLRK
XP_864886.1 LLVKRQIKRLEEPSLRVELVHEEMQRI IQHCSNYSTQELLRFPKLHDAIVEVVTCLLRK

MyxoLi YRLPTSTHVRTIIKAERGFINVKHPMMDELAQRAFANIYGTNGD-----AS
LbrM.29.2180 YRSPTSAHVRTII SAERGFINVKHPMMDELAQRAFENIYGT PNGH-----AP
LinJ.29.2310 YRLPTSTHVRTIIKAERGFINVKHPMMDELAQRAFANIYGTNGD-----AS
XP_003872337.1 YRKPTSTHVRTIIQAERGFINVKHPMMDELAQRAFANIYGTANGE-----SS
LmxM.08_29.2200 YRKPTSTHVRTIIQAERGFINVKHPMMDELAQRAFANIYGTANGE-----SS
LmjF.29.2200 YRLPTSTHVRTIIKAERGFINVKHPMMDELAQRALSNYGTTSGE-----SS
LdBPK_292310.1 YRLPTSTHVRTIIKAERGFINVKHPMMDELAQRAFANIYGTNGD-----AS
TcCLB_503671.39 -----
TcCLB_508187.10 YRAPTM SHVRTIIAERGFVNVKHPMMEQLVQRSFLKIFGTENEK-----SQ
TCSYLVI0_007449 YRAPTM SHVRTIIAERGFVNVKHPMMEQLVQRSFLKIFGTENEK-----SQ
AAD39541.1 RLPVTNEMVHNLVAIELAYINTKHPDFADACGLMNNNIEEQRRNRLARELPSAVSRDKSS
XP_864886.1 RLPVTNEMVHNLVAIELAYINTKHPDFADACGLMNNNIEEQRRNRLARELPSAVSRDKSY

MyxoLi SPPR----NSSDPNASAAVGT HADFN SGR -----
LbrM.29.2180 SGPK----GTESN-PST----TGNPPADQKGN SK-----DPKDDKGGKGD
LinJ.29.2310 SPPR----NSSDPNASAAAGGTQADPKQSGRDIKR-----DDRKDDKRGGRD
XP_003872337.1 S-PE----NSRDPNASPAGGTQTDPKQGGKDIKK-----GNKD
LmxM.08_29.2200 S-PE----NSRDPNASPAGGTQTDPKQGGKDIKK-----GNKD
LmjF.29.2200 SPPR----NSSGPNASAAAGGTQADPKQSGKDIKK-----DDKRGVVD
LdBPK_292310.1 SPPR----NSSDPNASAAAGSTQADPKQSGRDIKR-----DDRKDDKRGGRD
TcCLB_503671.39 -----
TcCLB_508187.10 TSQS-----QQGGNEGKD-----KGK--
TCSYLVI0_007449 TSHS-----QQGGNEGKD-----KGK--
AAD39541.1 KVPSALAPASQEPSPAASAEADGK-----VASGGGVGDGVQEPPTGNWRGMLK
XP_864886.1 KVPSALAPASQEPSPAASAEADGKLIQDSRRETKNVAAGGGVGDGGQEPPTGNWRGMLK

MyxoLi -----
LbrM.29.2180 EKKL-----EKSKDQGWIDSLANAGNKASMTDVPSRIMLGS-MTMHEQRMNNAIREMVE
LinJ.29.2310 EKRP-----EKSRDQGNADNVMSPGSKSDMNDVPSRIMLGKNTMHEQYMNSAIREMVE
XP_003872337.1 EKRP-----DKSKDHANADNAMSHGGKSVMTDVPSRIMLGKNTMHEQYMNSAIREMVE
LmxM.08_29.2200 EKRP-----DKSKDHANADNAMSHGGKSVMTDVPSRIMLGKNTMHEQYMNSAIREMVE
LmjF.29.2200 EKRP-----EKPKEQGNTDSAISPGNKSMDNDVPSRIMLGKNTMHEQYMNSAIREMVE
LdBPK_292310.1 EKRP-----EKSRDQGNADNVMSPGSKSDMNDVPSRIMLGKNTMHEQYMNSAIREMVE
TcCLB_503671.39 -----
TcCLB_508187.10 -----KVNSEPTSNGVEKSDMGDVPVTIMLGNNMSMHEQHINNVI RDMVE
TCSYLVI0_007449 -----KVNSEPTSNGVEKSDMGDVPVTIMLGNNMSMHEQHINNVI RDMVE
AAD39541.1 TSKAEELLAEKSKPIPI MPASPQKGHAVNLLDVPV--PVARKLSAREQRDCEVIERLIK
XP_864886.1 TSKAEELLAEKSKPIPI MPASPQKGHAVNLLDVPV--PVARKLSAREQRDCEVIERLIK

MyxoLi -----
LbrM.29.2180 GYFAIVKGNVADQVPKAITLLMISRLREEVYARLVRELYSEKAATSLLEPPGIAAQRKA
LinJ.29.2310 GYFSIVKGNVADQVPKAITLLMITRLREEVYARLVSELYSDKTAKALLSEPPGIATQRKA
XP_003872337.1 GYFSIVKANVADQVPKAITLLMIARLREEVYARLVSYLYSEKTAKALLSEPPGIATQRKA
LmxM.08_29.2200 GYFSIVKANVADQVPKAITLLMIARLREEVYARLVSYLYSEKTAKALLSEPPGIATQRKA
LmjF.29.2200 GYFSIVKGNVADQVPKAITLLMITRLREEVYARLVSELYSDKTAKALLSEPPGIATQRKA
LdBPK_292310.1 GYFSIVKGNVADQVPKAITLLMITRLREEVYARLVSELYSDKTAKALLSEPPGIATQRKA
TcCLB_503671.39 -----
TcCLB_508187.10 GYFGIVKGTVADQVPKAITLLMITKLREDVYSRLVRSLYSEKKADLLAEPPPEVETQRKA
TCSYLVI0_007449 GYFGIVKGTVADQVPKAITLLMITKLREDVYSRLVRSLYSEKKADLLAEPPPEVETQRKA
AAD39541.1 SYFLIVRKNIQDSVPKAMMHLVNHVKDTLQSELVGLYKSSLLDDLLTESEDMAQRKE
XP_864886.1 SYFLIVRKNIQDSVPKAMMHLVNHVKDTLQSELVGLYKSSLLDDLLTESEDMAQRKE

MyxoLi	-----
LbrM.29.2180	AKEMLEALTKAQNALNSVRDYHLGREPPSST----
LinJ.29.2310	AKEMLEALTKAQNALNSVRDYQLTKEPSSSMQAGA
XP_003872337.1	AKEMLEALTKAQDALNSVRDYQLTKEPSSSIQAAD
LmxM.08_29.2200	AKEMLEALTKAQDALNSVRDYQLTKEPSSSIQAAD
LmjF.29.2200	AKEMLEALTKAQNALNSVRDYQLTKEPASSMQAGT
LdBPK_292310.1	AKEMLEALTKAQNALNSVRDYQLTKEPSSSMQAGA
TcCLB.503671.39	-----
TcCLB.508187.10	TKTMMIALKKAQEALSVREFTL-----
TCSYLVI0_007449	TKTMMIALKKAQEALSVREFTL-----
AAD39541.1	AADMLKALQGASQIIAEIRETHLW-----
XP_864886.1	AADMLKALQGASQIIAEIRETHLW-----

Figura 17: Predição de epítomos polimórficos lineares de linfócitos B na proteína de ligação ao GTP de *L. infantum*. Alinhamento entre a proteína recombinante MyxoLi, a proteína do banco de dados de *L. infantum* (LinJ.29.2310) e ortólogos presente em *L. braziliensis* (LbrM.29.2180), *L. amazonensis* (XP_003872337.1), *L. mexicana* (LmxM.08_29.2200), *L. major* (LmjF.29.2200), *L. donovani* (LdBPK_292310.1), *T. cruzi* clone CL Brener haplótipo Esmeraldo (TcCLB.503671.39) e não-Esmeraldo (TcCLB.508187.10), *T. cruzi* cepa Sylvio (TCSYLVI0_007449), *H. sapiens* (AAD39541.1) e *C. familiaris* (XP_864886.1). Os epítomos preditos selecionados estão marcados em amarelo e verde na sequência de MyxoLi. Os aminoácidos marcados em vermelho mostram a região de homologia entre os ortólogos da proteína.

MyxoLm	MDQLIGVINELHDAFAGVKMNIKLNLPQIAVVGSSQCGKSSVLESIVGKDFLPRGSGIVT	60
LmxM.08_29.2200	MDQLISVINELHDAFAGVKMNIKLNLPQIAVVGSSQCGKSSVLESIVGKDFLPRGSGIVT	60
LinJ.29.2310	MDQLISVINELHDAFAGVKMNIKLNLPQIAVVGSSQCGKSSVLESIVGKDFLPRGSGIVT	60
LdBPK_292310.1	MDQLISVINELHDAFAGVKMNIKLNLPQIAVVGSSQCGKSSVLESIVGKDFLPRGSGIVT	60
LmjF.29.2200	MNQLISVINELHDAFAGVKMNIKLNLPQIAVVGSSQCGKSSVLESIVGKDFLPRGSGIVT	60
LbrM.29.2180	MDQLIGVINELHDAFAGVKMNIKLNLPQIAVVGSSQCGKSSVLESIVGKDFLPRGSGIVT	60
TcCLB.508187.10	-----	
TCSYLVI0_007449	MNQLIAVVNELHDAFANVKMNIKLNLPQIAVVGSSQSGKSSVLEAIVGKDFLPRGSGIVT	60
TcCLB.503671.39	MNQLIAVVNELHDAFANVKMNIKLNLPQIAVVGSSQSGKSSVLEAIVGKDFLPRGSGIVT	60
AAD39541.1	MEALIPVINKLQDVFNVTGADI IQ- LPQIVVVGTSQSGKSSVLESIVGRDLLPRGTGIVT	59
XP_864886.1	MEALIPVINKLQDVFNVTGADI IQ- LPQIVVVGTSQSGKSSVLESIVGRDLLPRGTGIVT	59
MyxoLm	RCPLVLQVLQPKSND-----EEWGEFLH IPQKKFYDFNEIQNEITRRTIEMA	108
LmxM.08_29.2200	RCPLVLQVLQPKSNN-----EEWGEFLH IPQKKFYDFNEIQNEITRRTIEMA	108
LinJ.29.2310	RCPLVLQVLQPKSNE-----EEWGEFLH IPNKKFYDFNEIQNEITRRTIEMA	108
LdBPK_292310.1	RCPLVLQVLQPKSNE-----EEWGEFLH IPNKKFYDFNEIQNEITRRTIEMA	108
LmjF.29.2200	RCPLVLQVLQPKSNE-----EEWGEFLH IPNKKFYDFNEIQNEITRRTIEMA	108
LbrM.29.2180	RCPLVLQVLQPKSNS-----EEWGEFLH IPNKKFYDFNAIQEIEITRRTIEMA	108
TcCLB.508187.10	-----	
TCSYLVI0_007449	RCPLVLQVLQPKTSE-----EEWGEFLH KPNKKYDFDFLEINEIEIKHRTVEIA	108
TcCLB.503671.39	RCPLVLQVLQPKTSE-----EEWGEFLH KPNKKYDFDFLEINEIEIKHRTVEIA	108
AAD39541.1	RRPLILQVLVHVTQEDKRKTTGEENGVEAE EEWGKFLHTKNKLYTDFDEIRQEIENETERIS	119
XP_864886.1	RRPLILQVLVHVSPEDKRKTTEENGVEAE EEWGKFLHTKNKLYTDFDEIRQEIENETERIS	119
MyxoLm	G-PSAITDKPISLKVYSKTVLNLTLVDLPLGLVMNAVGDQPKDIDRQIKDMVTRYVSPKNT	167
LmxM.08_29.2200	G-PSAITDKPISLKVYSKTVLNLTLVDLPLGLVMNAVGDQPKDIDRQIKDMVTRYVSPKNT	167
LinJ.29.2310	G-PSAITDKPISLKVYSNTVLNLTLVDLPLGLVMNAVGDQPKDIDRQIKDMVTRYVSPKNT	167
LdBPK_292310.1	G-PSAITDKPISLKVYSNTVLNLTLVDLPLGLVMNAVGDQPKDIDRQIKDMVTRYVSPKNT	167
LmjF.29.2200	G-PSAITDKPINLKVYSSAVLNLTLVDLPLGLVMNAVGDQPKDIDRQIKDMVTRYVLPKNT	167
LbrM.29.2180	G-PHAITDKPINLKVYSNMVLNLTLVDLPLGLVMNAVGDQPKDIDRQIKDMVTRYVSPKNT	167
TcCLB.508187.10	-----	
TCSYLVI0_007449	G-NSAISERPINLKVFSKNVLNLTLVDLPLGLVMNAVGDQPKDIDRQIKEMVTRYVAVPNT	167
TcCLB.503671.39	G-NSAISERPINLKVYSKNVLNLTLVDLPLGLVMNAVGDQPKDIDRQIKEMVTRYVAVPNT	167
AAD39541.1	GNNKGVSP PIHLKIFSPNVNLT VLVDLPGMTKVPVGDQPKDIELQIRELILRFISNPNS	179
XP_864886.1	GNNKGVSP PIHLKIFSPNVNLT VLVDLPGMTQVPVGDQPKDIELQIRELILRFISNPNS	179
MyxoLm	IILAI SPANTDLATSQSLRLAKQLDPDGLRTVGVLTKIDLMDKGTDCDLILQNRVLQRLRH	227
LmxM.08_29.2200	IILAI SPANTDLATSQSLRLAKQLDPDGLRTVGVLTKIDLMDKGTDCDLILQNRVLQRLRH	227
LinJ.29.2310	IILAI SPANTDLATSQSLRLAKQLDPEGVRTVGVLTKIDLMDKGTDCFDVLQNKVLQRLRH	227
LdBPK_292310.1	IILAI SPANTDLATSQSLRLAKQLDPEGVRTVGVLTKIDLMDKGTDCFDVLQNKVLQRLRH	227
LmjF.29.2200	IILAI SPANTDLATSQSLRLAKQLDPEGVRTVGVLTKIDLMDKGTDCFDVLQNRVLQRLRH	227
LbrM.29.2180	IILAI SPANTDLATSQSLRLAKQLDPEGTRTVGVLTKIDLMDKGTDCFDVLQNKVHLRH	227
TcCLB.508187.10	-----	
TCSYLVI0_007449	IILAI SPANTDLATSSSLRLAKQLDPEGIRTVGVLTKIDLMDRGTDALDALTGKLVSLRH	227
TcCLB.503671.39	IILAI SPANTDLATSSSLRLAKQLDPEGIRTVGVLTKIDLMDRGTDALDALTGKLVSLRH	227
AAD39541.1	IILAVTAANTDMATSEALKISREVD PDGCR TLAVITKLDLMDAGTDAMDVLMGRVIPVKL	239
XP_864886.1	IILAVTAANTDMATSEALKISREVD PDGR RTLAVITKLDLMDAGTDAMDVLMGRVIPVKL	239

MyxoLm GFIVGVCRSQQDINDRKSMEGARRSEYEFFANSPIYSPIAEEAGTTYLSKKNLFLLEHI 287
LmxM.08_29.2200 GFIVGVCRSQQDINDRKSMEGARRSEYEFFANSPIYSPIAEEAGTTYLSKKNLFLLEHI 287
LinJ.29.2310 GFVGVVCRSQQDINDRKSMEARRSEYEFFANSPIYSPIAEEAGTAYLSKKNLFLLEHI 287
LdBPK_292310.1 GFVGVVCRSQQDINDRKSMEARRSEYEFFANSPIYSPIAEEAGTAYLSKKNLFLLEHI 287
LmjF.29.2200 GFVGVVCRSQQDINDCKSMEDARRSEYEFFANSPIYSPIAEEAGTAYLSKKNLFLLEHI 287
LbrM.29.2180 GFVGVVCRSQQDINDRKSMEARQSEYDFFANSPTYSPIADEAGTVYLSKKNLFLLEHI 287
TcCLB.508187.10 -----
TCSYLVI0_007449 GFVGVVNRSQDINDSKGMLAAREDERAFFHNHPSYSAIADRQGT EYLAKKLNQLLQHI 287
TcCLB.503671.39 GFVGVVNRSQDINDSKGMLAAREDERAFFHNHPSYSAIADRQGT EYLAKKLNQ----- 281
AAD39541.1 GIIGVVNRSQLDINNKKSVTDSIRD EYAF LQKK--YPSLANRNGTKYLARTLNRLLMHHI 297
XP_864886.1 GIIGVVNRSQLDINNKKSVTDSIRD EYAF LQKK--YPSLANRNGTKYLARTLNRLLMHHI 297

MyxoLm KAVIPDLKRHVDQLMEATKKQMEKLGMFQDITEPTAQLLYLIKLFSDTLNQTIDG-GIT 346
LmxM.08_29.2200 KAVIPDLKRHVDQLMEATKKQMEKLGMFQDITEPTAQLLYLIKLFSDTLNQTIDG-GIT 346
LinJ.29.2310 KAVIPDLKRHVDQLMEATKKQMEKLGMFQDITEPTAQLLYLIKLFSDTLNQTIDG-GIT 346
LdBPK_292310.1 KAVIPDLKRHVDQLMEATKKQMEKLGMFQDITEPTAQLLYLIKLFSDTLNQTIDG-GIT 346
LmjF.29.2200 KAVIPDLKRHVDQLMEATKKQMEKLGMFQDITEPTAQLLYLIKLFSDALNQTIDG-GIT 346
LbrM.29.2180 KSVIPDLKRHVDQLMEATRQKMEKLGMFQDITEPSAQVLSLIKLFSDTVNQTIDG-GIT 346
TcCLB.508187.10 -----
TCSYLVI0_007449 KDVIPELKKHVVDKLLGSTMKQMEKLGMLDQTNIDPSAHMLSLIKRFSDTLNHTIDG-GAT 346
TcCLB.503671.39 -----
AAD39541.1 RDCLPELKRTRINVLAAQYQSLN---SYGEPVDDKSA TLLQLITKFATEYCNTIEGTAKY 354
XP_864886.1 RDCLPELKRTRINVLAAQYQSLN---SYGEPVDDKSA TLLQLITKFATEYCNTIEGTAKY 354

MyxoLm DATKELGGARLDYIFHECFATYVTSLSATKDLTDDYIRINTRNMAGMHATLFPSDQVVF 406
LmxM.08_29.2200 DATKELGGARLDYIFHECFATYVTSLSATKDLTDEYIRINTRNMAGMHATLFPSDQVVF 406
LinJ.29.2310 DATKELGGARLDYIFHECFATYVTSLSATKDLTDDYIRINTRNMAGMHATLFPSDQVVF 406
LdBPK_292310.1 DATKELGGARLDYIFHECFATYVTSLSATKDLTDDYIRINTRNMAGMHATLFPSDQVVF 406
LmjF.29.2200 DATKELGGARLDYIFHECFATYVTSLSATKDLTDDYIRINTRNMAGMHATLFPSDQVVF 406
LbrM.29.2180 DATKELGGARLDYIFHECFATYVTSLSARKDLTDDYIRINTRNMAGMHATLFPSDQVVF 406
TcCLB.508187.10 -----
TCSYLVI0_007449 DATKELMGGARLDYIFNECFAYVNGLTAKKELTDEYIRINARNMAGMHSA LFPSDQVVF 406
TcCLB.503671.39 -----
AAD39541.1 IETSELGGARICYIFHETFGRTL E SVDP LGLNTIDILTAIRNATGPRPALFVPEVSE 414
XP_864886.1 IETSELGGARICYIFHETFGRTL E SVDP LGLNTIDILTAIRNATGPRPALFVPEVSE 414

MyxoLm ALSKQQITRLEEPCIKCVTFVYEELSKIVEVCAG----KVD RYPNLKEAII SICKMLLD 462
LmxM.08_29.2200 ALSKQQITRLEEPCIKCVTFVYEELSKIVEVCAG----KVD RYPNLKEAII SICKMLLD 462
LinJ.29.2310 ALSKQQITRLEEPCIKCVTFVYEELTKIVEICAG----KVD RYPNLKD AII SICKMLLD 462
LdBPK_292310.1 ALSKQQITRLEEPCIKCVTFVYEELTKIVEICAG----KVD RYPNLKD AII SICKMLLD 462
LmjF.29.2200 ALSKQQINRLEEPCIKCVTFVYEELGKIVEICAG----KVD RYPNLKEAVI AICKMFLD 462
LbrM.29.2180 ALSKQQIARLEEPSIKCVSFVYEELINIVNICAA----KVD RYPNLQAI I SICHNMLD 462
TcCLB.508187.10 -----PLNICRQSLQE 11
TCSYLVI0_007449 ALSRQQIARLEEPSQKCVQVFEELIKIVDICAS----KLDNFPRLQAVVDICRQSLQE 462
TcCLB.503671.39 -----
AAD39541.1 LLVKRQIKRLEEPSLRCELVHEEMQRI IQHCSNYSTQELLRFPK LHD AIVEVVTCLLRK 474
XP_864886.1 LLVKRQIKRLEEPSLRCELVHEEMQRI IQHCSNYSTQELLRFPK LHD AIVEVVTCLLRK 474

MyxoLm YRKPTSTHVRTIIQAERGFINVKHP-----MMDELAQRAFANIYGTANGESSSP 511
LmxM.08_29.2200 YRKPTSTHVRTIIQAERGFINVKHP-----MMDELAQRAFANIYGTANGESSSP 511
LinJ.29.2310 YRLPTSTHVRTIIKAERGFINVKHP-----MMDELAQRAFANIYGT TNGDASSP 511
LdBPK_292310.1 YRLPTSTHVRTIIKAERGFINVKHP-----MMDELAQRAFANIYGT TNGDASSP 511
LmjF.29.2200 YRLPTSTHVRTIIKAERGFINVKHP-----MMDELAQRALSNIYGT TSGESSSP 511
LbrM.29.2180 YRSPTSAHVRTII SAERGFINVKHP-----MMDELAQRAFANIYGT PNGHAPS 511
TcCLB.508187.10 YRAPTMSHVRTIIA AERGFINVKHP-----MMEQLVQRSFLKI FGTENEKSQTS 60
TCSYLVI0_007449 YRAPTMSHVRTIIA AERGFINVKHP-----MMEQLVQRSFLKI FGTENEKSQTS 511
TcCLB.503671.39 -----
AAD39541.1 RLPVTNEMVHNLVAIE LAYINTKHPDFADACGLMNNNIEEQRRNRLARELPSAVSRDKSS 534
XP_864886.1 RLPVTNEMVHNLVAIE LAYINTKHPDFADACGLMNNNIEEQRRNRLARELPSAVSRDKSY 534

MyxoLm -ENSRDPNASPADSTQTDPKQG-----KDIK-----K 538
LmxM.08_29.2200 -ENSRDPNASPADSTQTDPKQG-----KDIK-----K 538
LinJ.29.2310 PRNSSDPNASAAGGTQADPKQSG-----RDIKRDDRKDDKR 547
LdBPK_292310.1 PRNSSDPNASAAGGTQADPKQSG-----RDIKRDDRKDDKR 547
LmjF.29.2200 PRNSSDPNASAAGGTQADPKQSG-----KDIK----KDDKR 543
LbrM.29.2180 PSKGTESNPSTTGPNPADQKNS-----KDPK----KDDK 543
TcCLB.508187.10 -----QSQQGG-----NEGK-----70
TCSYLVI0_007449 -----HSQQGG-----NEGK-----521
TcCLB.503671.39 -----
AAD39541.1 KVP\$ALAPASQEPSPAASAEADG-----KVASGGGGVGDGVQEP TGNWRGMLK 583
XP_864886.1 KVP\$ALAPASQEPSPAASAEADGKLIQDSRRETKNVAAGGGGGVGDGVQEP TGNWRGMLK 594

MyxoLm GNKDEKRPDKSKGKLNADNVMSPGSKSDMNDVPSRIMLGKNMTTHEQYMNSAIREMVEGY 598
LmxM.08_29.2200 GNKDEKRPDKSKDHANADNVMSPGSKSDMNDVPSRIMLGKNMTTHEQYMNSAIREMVEGY 598
LinJ.29.2310 GGRDEKRPEKSRDQGNADNVMSPGSKSDMNDVPSRIMLGKNMTTHEQYMNSAIREMVEGY 607
LdBPK_292310.1 GGRDEKRPEKSRDQGNADNVMSPGSKSDMNDVPSRIMLGKNMTTHEQYMNSAIREMVEGY 607

LmjF.29.2200	GVRDEKRPEKPKKEQNTDSAISPGNKSDMNDVPSRIMLGKTMTHHEQFMNSAIREMVEGY	603
LbrM.29.2180	GGKDEKKLEKSKDQGWIDSLANAGNKASMTDVPSTRIMLGNSMTMHEQRMNNAIREMVEGY	603
TcCLB.508187.10	-----DKGK-KVNSEPTSNNGVEKSDMGDVPVVTIMLGNMMSMHEQHIINNVIRDMVEGY	121
TCSYLVIO_007449	-----DKGK-KVNSEPTSNNGVEKSDMGDVPVVTIMLGNMMSMHEQHIINNVIRDMVEGY	572
TcCLB.503671.39	-----	
AAD39541.1	TSKAEELLAEKSKPIPIIMPASPOKGHAVNLLDVPVVPVARKLSAREQRDCEVIERLIKSY	643
XP_864886.1	TSKAEELLAEKSKPIPIIMPASPOKGHAVNLLDVPVVPVARKLSAREQRDCEVIERLIKSY	654
MyxoLm	FSIVKANVADQVPKAITLLMIARLREEVYARLVSQLYSEKTAKALLSEPPGIATQRKAAK	658
LmxM.08_29.2200	FSIVKANVADQVPKAITLLMIARLREEVYARLVSQLYSEKTAKALLSEPPGIATQRKAAK	658
LinJ.29.2310	FSIVKGNVADQVPKAITLLMIARLREEVYARLVSELYSDKTAKALLSEPPGIATQRKAAK	667
LdBPK_292310.1	FSIVKGNVADQVPKAITLLMIARLREEVYARLVSELYSDKTAKALLSEPPGIATQRKAAK	667
LmjF.29.2200	FSIVKGNVADQVPKAITLLMIARLREEVYARLVSELYSDKTAKALLSEPPGIATQRKAAK	663
LbrM.29.2180	FAIVKGNVADQVPKAITLLMIARLREEVYARLVRELYSEKAATSLLEPPGIAAQRKAAK	663
TcCLB.508187.10	FGIVKGTVADQVPKAITLLMIARLREEVYARLVRELYSEKAATSLLEPPGIAAQRKAAK	181
TCSYLVIO_007449	FGIVKGTVADQVPKAITLLMIARLREEVYARLVRELYSEKAATSLLEPPGIAAQRKAAK	632
TcCLB.503671.39	-----	
AAD39541.1	FLIVRKNIQDSVPKAVMHFLVNHVKDTLQSELVGLYKSSLLDDLLTESEDMAQRKKEAA	703
XP_864886.1	FLIVRKNIQDSVPKAVMHFLVNHVKDTLQSELVGLYKSSLLDDLLTESEDMAQRKKEAA	714
MyxoLm	EMLGALTKAQDALNNRVDYQLTKPESSSIQAAD	687
LmxM.08_29.2200	EMLGALTKAQDALNNRVDYQLTKPESSSIQAAD	691
LinJ.29.2310	EMLGALTKAQNALNSVRDYQLTKPESSSMQAGA	700
LdBPK_292310.1	EMLGALTKAQNALNSVRDYQLTKPESSSMQAGA	700
LmjF.29.2200	EMLGALTKAQNALNSVRDYQLTKPESSSMQAGT	696
LbrM.29.2180	EMLGALTKAQNALNSVRDYHLGREPPSST----	692
TcCLB.508187.10	TMMIALKKAQEALESVREFTL-----	202
TCSYLVIO_007449	TMMIALKKAQEALESVREFTL-----	653
TcCLB.503671.39	-----	
AAD39541.1	DMLKALQGASQIIAEIRETHLW-----	725
XP_864886.1	DMLKALQGASQIIAEIRETHLW-----	736

Figura 18: Predição de epítomos polimórficos lineares de linfócitos B na proteína de ligação ao GTP de *L. mexicana*. Alinhamento entre a proteína recombinante MyxoLm, a proteína do banco de dados de *L. mexicana* (LmxM.08_29.2200) e ortólogos presente em *L. infantum* (LinJ.29.2310), *L. donovani* (LdBPK_292310.1), *L. major* (LmjF.29.2200), *L. braziliensis* (LbrM.29.2180), *T. cruzi* clone CL Brener haplótipo não-Esmeraldo (TcCLB.508187.10) e Esmeraldo (TcCLB.503671.39), *T. cruzi* cepa Sylvio (TCSYLVIO_007449), *H. sapiens* (AAD39541.1) e *C. familiaris* (XP_864886.1). Os epítomos preditos selecionados estão marcados em amarelo, verde e azul na sequência de MyxoLm. Os aminoácidos marcados em vermelho mostram a região de homologia entre os ortólogos da proteína.

TyroLb	-----MH-KRLRKEKQRFDAHLRRLGE-----
LbrM.35.5630	-----MH-KRLRKEKQRFDAHLRRLGE-----
LinJ.36.5610	-----MH-EKQLKEKQRFDVHLRRLGE-----
A20570	-----MR-EKKLKEKQRFDVHLRRLGE-----
LmxM.36.5370	-----MR-EKQLKEKQRFDVHLRRLGE-----
LmjF.36.5370	-----MC-EKQLKEKQRFDVHLRRLGE-----
LdBPK_365610.1	-----MH-EKQLKEKQRFDVHLRRLGE-----
TcCLB_506839.60	-----MS-REQRKIATAFLEQLRQLSK-----
TcCLB.508717.10	-----MS-RDQRKIATVFLEQLRQLSK-----
TCSYLVIO_004733	-----MS-REQRKIATAFLEQLRQLSK-----
AAA59531.1	MTQPPPEKTPAKKHVRLQERGRSNNVALMLDVRSLGAVEPICSVNTPREVTLHFLRTAGHP
XP_013970422.1	-----MLDVRSLGAVEPICSVNTPREVTLHFLRTAGHP
TyroLb	-----RVYPTLEDGFDELAKLRRVDEYVRSNLDEYYASLGSSTMVKNRFPNPKPNEG
LbrM.35.5630	-----RVYPTLEDGFDELAKLRRVDEYVRSNLDEYYASLGSSTMVKNRFPNPKPNEG
LinJ.36.5610	-----RVYPSMEDGFDELAKLRRIDAYIRSNLDEYYASLGSSTMAKNRFPDVKPNEG
A20570	-----RVYPSIEDGFDELAKLRRVDAYVRSNLDEYYASLGSSTMAKNRFPDVKPNEG
LmxM.36.5370	-----RVYPSIEDGFDELAKLRRVDAYVRSNLDEYYASLGSSTMAKNRFPDVKPNEG
LmjF.36.5370	-----RVYPSIEDGFDELAKLRRIDACVRSNLDEYYASLGSSTMAKNRFPSEVKPNEG
LdBPK_365610.1	-----RVYPSMEDGFDELAKLRRIDAYIRSNLDEYYASLGSSTMAKNRFPDVKPNEG
TcCLB.506839.60	-----RHPGNRRDGFDEEMDELRAVDHRVRSNVDEFYASLATSVAKNRFTVVRANEG
TcCLB.508717.10	-----RHPGNRRDGFDEEMDELRAVDHRVRSNVDEFYASLATSVAKNRFTVVRANEG
TCSYLVIO_004733	-----RHPGNRRDGFDEEMDELRAVDHRVRSNVDEFYASLATSVAKNRFTVVRANEG
AAA59531.1	LTRWALQRQPPS-PKQLEEFLL-----KIPSNFVSPEDLDIPGHASKDRYKTIILPNPQ
XP_013970422.1	LTRWALQHQPPS-PKQLEEFLL-----KIPSNFVSNEDLDIPGHASKDRYKTIILPNPQ
TyroLb	TIVHLNETSFQGDGAYINANYVDAREKFSVPFVYIATQSPMKNTVLDWFWRMVEYENDSAFI
LbrM.35.5630	TIVHLNETSFQGDGAYINANYVDAREKFSVPFVYIATQSPMKNTVLDWFWRMVEYENDSAFI
LinJ.36.5610	TIVRLNETSGQDGTYINANYIDAREKFKVPFVYIATQAPMKNTVLDWFWRMVEYENDSAFI
A20570	TIVRLDETSSQDGTYINANYIDAREKFKVPFVYIATQAPLKNVLDWFWRMVEYENDSAFI
LmxM.36.5370	TIVRLDETSSQDGTYINANYIDAREKFKVPFVYIATQAPLKNVLDWFWRMVEYENDSAFI
LmjF.36.5370	TIVRLSETSGQDGTYINANYIDAREKFKVPFVYIATQAPMKNSVLDWFWRMVEYENDSAFI
LdBPK_365610.1	TIVRLNETSGQDGTYINANYIDAREKFKVPFVYIATQAPMKNTVLDWFWRMVEYENDSAFI

TcCLB.506839.60 TRVRLRSLVEENQESYINANYVDGRALFNVPFTYIATQAPLKNITFDWFRMVFENDVVFV
TcCLB.508717.10 TRVRLRSLVEENQESYINANYVDGRALFNVPFTYIATQAPLQNTIFDFWFRMVFENDVVFV
TCSYLVIO 004733 TRVRLRSLVEENQESYINANYVDGRALFYVPFTYIATQAPLQNTIFDFWFRMVFENDVVFV
AAA59531.1 SRVCLGRAQSQEDGDYINANYIRGYDG--KEKVYIATQGPMNTVSDWFEMVWQEEVSLI
XP_013970422.1 SRVCLGRAQSQEDGDYINANYIRGYDG--QEKVYIATQGPMNTVSDWFEMVWQEEVSLI

TyroLb VMLCAVEENGKIKSETYWPLRGETYDMGMLTVTHVAESMQQNSVHRCLLLRVSRGDEKEV
LbrM.35.5630 VMLCAVEENGKIKSETYWPLRGETYDMGMLTVTHVAESMQQNSVHRCLLLRVSRGDEKEV
LinJ.36.5610 VMLCAVKENGKIKSETYWPPRGAAAYDMGVLSVTLVAENMRPDSVHRRLLLRVSRGDEKEV
A20570 VMLCAVKENGKIKSETYWPSRGATYDMGVLSVTLVAENMRPDSVHRRLLLRVSRGAEKEV
LmxM.36.5370 VMLCAVKENGKIKSETYWPSRGATYDMGVLSVTLVAENMRPDSVHRRLLLRVSRGAEKEV
LmjF.36.5370 VMLCAVKENGKIKSETYWPPRGAAAYDMGVLSVTLVAENMRPDSVHRRLLLRVSRGDEKEV
LdBPK 365610.1 VMLCAVKENGKIKSETYWPPRGAAAYDMGVLSVTLVAENMRPDSVHRRLLLRVSRGDEKEV
TcCLB.506839.60 VMLCGEVEDGKAKSEMYWPKENGVLDIGILQISSIGERRLSDLVFRSFLHNANGEEHQV
TcCLB.508717.10 VMLCGEVEDGKAKSEMYWPKENGVLDIGILQISSISEKRRLSDLVFRSFLRNANGEEHQV
TCSYLVIO 004733 VMLCGEVEDGKAKSEMYWPKENGVLDLGLILQISSIGERRLSDLVFRSFLHNANGEEHQV
AAA59531.1 VMLTQL-REGKEKCVHYWPTEETTYGPFQIRIQDMKECP--EYTVRHV-TIQYQEEERSV
XP_013970422.1 VMLTQL-REGKEKCVHYWPTEETTYGPFQIRIQDTKECP--EYTVRQL-SIQHQEETRPV

TyroLb LHIQYLTWPDOGVPPQSSVTLMEMINSIAKSPRS--TRSPIVHCSGGVGRGRTGVFIFGLHIA
LbrM.35.5630 LHIQYLTWPDQGVPPQSSVTLMEMINSIAKSPRS--TRSPIVHCSGGVGRGRTGVFIFGLHIA
LinJ.36.5610 YHMQYVAVPDPQGVPPQSSVTLMEMINTIAKSPRS--TQSPIVHCSGGIGRTGVFIFGLHIA
A20570 YHMQYVAVPDPQGVPPQSSVTLMEMINTIAKSPRS--TQSPIVHCSGGIGRTGVFIFGLHIA
LmxM.36.5370 YHMQYVAVPDPQGVPPQSSVTLMEMINTIAKSPRS--TQSPIVHCSGGIGRTGVFIFGLHIA
LmjF.36.5370 YHMQYVAVPDPQGVPPQSSVTLMEMINTIAKSPRS--TQSPIVHCSGGIGRTGVFIFGLHIA
LdBPK 365610.1 YHMQYVAVPDPQGVPPQSSVTLMEMINTIAKSPRS--TQSPIVHCSGGIGRTGVFIFGLHIA
TcCLB.506839.60 YHMQYIGWPDQGIPTDSAPLMEIIQTMGKSELS--VQTPIVHCSGGIGRTGVFIALHVA
TcCLB.508717.10 YHMQYIGWPDQGIPTDSAPLMEIIQTMGKSELS--VQTPIVHCSGGIGRTGVFIALHVA
TCSYLVIO_004733 YHMQYIGWPDQGIPTDSAPLMEIIQTMGKSELS--VQTPIVHCSGGIGRTGVFIALHVA
AAA59531.1 KHILFSAWPDHQTPEASAPLLRLVAEVEESPETAHPGPIVHCSAGIGRTGCFIATRIG
XP_013970422.1 KHVLFSAWPDHQTPEASAPLLRLVAEVEDSPEAAASTGPIVHCSAGIGRTGCFIATRIG

TyroLb LAQFQLGLVNISIPRIVGYLTKCRSGMVGRRDQYIFLYYAVQREMERMILSQKAGVNLLD
LbrM.35.5630 LAQFQLGLVNISIPRIVGYLTKCRSGMVGRRDQYIFLYYAVQREMERMILSQKAGVNLLD
LinJ.36.5610 LAQFQLGQANISIPCIVRHLKACRTGMVQRKDQYIFLYYAVQREMERMILSQKAGVNLLD
A20570 LAQFQLGQANISIPCIVRHLKACRTGMVQRKDQYIFLYYAVQREMERMILSQKAGVNLLD
LmxM.36.5370 LAQFQLGQANISIPCIVRHLKACRTGMVQRKDQYIFLYYAVQREMERMILSQKAGVNLLD
LmjF.36.5370 LAQFQLGQANISIPCIVRHLKACRTGMVQRKDQYIFLYYAVQREMERMILSQKAGVNLLD
LdBPK 365610.1 LAQFQLGQANISIPCIVRHLKACRTGMVQRKDQYIFLYYAVQREMERMILSQKAGVNLLD
TcCLB_506839.60 LAQFQLERKIDIKRIVHILKLSRTGMVQRKDQYVFLYYSVQREMDRMIMSAEKGVSLLE
TcCLB.508717.10 LAQFQLERKIDIKRIVHILKLSRTGMVQRKDQYVFLYYSVQREMDRMIMSAEKGVSLLE
TCSYLVIO 004733 LAQFQLERKIDIKRIVHILKLSRTGMVQRKDQYVFLYYSVQREMDRMIMSAEKGVSLLE
AAA59531.1 CQQLK-ARGEVDILGIVCQLRLDRGGMIQTAEQYQFLHHTLALYAGQLPE-----
XP_013970422.1 CQQLK-ARGEVDILGIVCQLRLDRGGMIQTTEQYQFLHHTLALYAAQLPE-----

TyroLb SRPRLATPAVTRADPAPTMTSPLIMPVVPVGRGWHRTSIFTLFRSSKSV-----
LbrM.35.5630 SRPRLATPAVTRADPAPTMTSPLIMPVVPVGRGWHRTSIFTLFRSSKSV-----
LinJ.36.5610 SRPRLAAAAA TRAEPAPTQIASPLIMPMPVQARGRHMFSTISPLRSSSTA-----
A20570 SRPRLTAAAA TRAEPAPTQITSPILIMPMPVQTRGWHMFSIPKPLRSSSTA-----
LmxM.36.5370 SRPRLTAAAA TRAEPAPTQITSPILIMPMPVQTRGWHVFSIPKPLRSSSTA-----
LmjF.36.5370 SRSRLAAAAA TRAEPAPTQIASPLIMPMPVQTRGRHMFSTIFAPLRSSTA-----
LdBPK 365610.1 SRPRLAAAAA TRAEPAPTQIASPLIMPMPVQARGRHFTSISTPLRSSSTA-----
TcCLB_506839.60 LLRRREPTASRQTAPRPVTNTTPQ-SPVFSSQAAWTTTKVPQQFATPIPTQAYPHHQSQS
TcCLB.508717.10 LLRRREPTASRQTAPRPVTNTTPQ-SPVFSSQAAWTTTKVPQQFATPIPTQAYPHHQSQR
TCSYLVIO_004733 LLRRRESTASRQTAPRPVTNTTPQ-SPVFSSQAAWTTTKVPQQFATPIPTQAYPHHQSQG
AAA59531.1 -----EPS-----
XP_013970422.1 -----GPC-----

TyroLb ---RPTDLRSASIRTPKH--RNAEADVAAMENYLQRAGSSPC-----
LbrM.35.5630 ---RPTDLRSASIRTPKH--RNAEADVAAMENYLQRAGSSPC-----
LinJ.36.5610 ---YPTELRSTPIHVPEN--RNAEDDAATMENYLQRVGSSPS-----
A20570 ---CPTLPSAPIQVPEN--RNAEDDAATMENYLQRVGSSPS-----
LmxM.36.5370 ---CPTLPSAPIQVPEN--RNAEDDAATMENYLQRVGSSPS-----
LmjF.36.5370 ---NPTELRSTPIQVPEN--RNAEDDAATLENYLQAVGSSPS-----
LdBPK 365610.1 ---YPTELRSTPIQVPEN--RNAEDDAATMENYLQRVGSSPS-----
TcCLB.506839.60 RELGPMFRRNFPYASPHSFSAITTEGEQRLLLEDYLKRQTPSSQQLVALPRDPVLKLGKETT
TcCLB.508717.10 RELGPMFRRNFPYASPHSFSAITTEGEQRLLLENYLKRQTPSSRQLVALPRDPVLKLGKETT
TCSYLVIO_004733 REIDPMFRRNFPYASPHSFSAITTEGEQRLLLEDYLKRQTPSSQQLVALPRDPVLKLGKETT
AAA59531.1 -----
XP_013970422.1 -----

TyroLb SGRSPNMSHTGDRSSPMEALHHACRQTSFSSKSLFIPVPHEPNMHC--RQVGTSSRS----
LbrM.35.5630 SGRSPNMSHTGDRSSPMEALHHACRQTSFSSKSLFIPVPHEPNMHC--RQVGTSSRS----
LinJ.36.5610 LGRSPSLSNPVDCSFVETSHPFRQTSLSPPSLPNSIPREPDVHW--RQVGTSSRS----
A20570 LGRSPSLSNPVDRSFMEALHHQFRQTSLSPTSLSNSITREPDH--RPVGTSSRS----
LmxM.36.5370 LGRSPSLSNPVDRSFMEALHHQFRQTSLSPTSLSNSITREPEIHW--RPVDTSSRS----
LmjF.36.5370 LGRSPSLSNPVDRSFVSEALHHQFRQTSLSPPSLSNSIPREPDVHR--RQVGTSSRS----

```

LdBPK_365610.1      LGRSPSLSYPVDCSFSVETLHHFFRQTSLSPPSLPNSIPREPDHW--RQVGTSR-----
TcCLB.506839.60    TKKVPNMSVLATQKESHTGIPNS-----TTNTEALEEQQLQHWQWRNREMRFSTDRV
TcCLB.508717.10    TKKVPNMSVLATQKESHTGIPNS-----APNTEALEEQQLQHWQWRNREMRFSTDRV
TCSYLVIO_004733    TKKVPNMSVLATQKESLTGIPNS-----TPNTEALQEQQLQHWQWRNREMRFSTDRV
AAA59531.1         -----
XP_013970422.1     -----

TyroLb              -----STSHSTSETTT-----PV--FRSTSL
LbrM.35.5630        -----STSHSTSETTT-----PV--FRSTSL
LinJ.36.5610        -----STSYMSESTT-----PL--LRATSL
A20570              -----SPSYMSESTA-----PL--LRATSF
LmxM.36.5370        -----SPSYMSESTA-----PL--LRATSL
LmjF.36.5370        -----STSYMSESAT-----PL--LRATSL
LdBPK_365610.1     -----STSYMSESTT-----PL--LRATSL
TcCLB.506839.60    ERREREAAATRQAPEAGTKNESAPSKRPSEEKPSKMEALVEPGPTPEEVQNPFSSTRGAST
TcCLB.508717.10    ERGEREAAATRQALEAGTKNESAPSKRPSEEKPSKMEALVEPSPTPEEVQNPFASTRGAST
TCSYLVIO_004733    ERREREAAATRQAPEAGTKNESAPSKRPSEEKPSKMEALVEPSPAPEEVQNPFASTRGAST
AAA59531.1         -----
XP_013970422.1     -----

TyroLb              LQE-----ELARLQQVNRVKRFSPLACGIGGS-----
LbrM.35.5630        LQE-----ELARLQQVNRVKRFSPLACGIGGS-----
LinJ.36.5610        LRE-----ELARQQQANRVKRFSPSFV-----
A20570              LQE-----ELARQQQANRVKRFSPSFV-----
LmxM.36.5370        LQE-----ELARQQQANRVKRFSPSFV-----
LmjF.36.5370        LRE-----ELARQQQANRVKRFSPSFV-----
LdBPK_365610.1     LRE-----ELARQQQANRVKRFSPSFV-----
TcCLB.506839.60    FSERSAPPVSI IITPQEAGTARNSDPTFHAGSGNSPTNGSYSVGNDSEQHGHSVATPEKA
TcCLB.508717.10    LSERSAPPVSI IITPQEAGTARNSDPTFHAGSGNSPTNGSYSVGNESEQHGHSVATPEKA
TCSYLVIO_004733    FSERSAPPVSI IITPQEAGTARNSDPTFHAGSGNSPTNGSYSVGNESEQHGHSVATPEKA
AAA59531.1         -----
XP_013970422.1     -----

TyroLb              -----
LbrM.35.5630        -----
LinJ.36.5610        -----
A20570              -----
LmxM.36.5370        -----
LmjF.36.5370        -----
LdBPK_365610.1     -----
TcCLB.506839.60    TALTAATAPPATTETKSATAPGDPAEESEASRFDRLGALADFETLGFPPRRPRTHIAK
TcCLB.508717.10    TALTAATAPPATEAKSATAPGDPAEEAEASRSRDLGALADFETLGFPPRRPRTHIVAK
TCSYLVIO_004733    TALTAATAPPATTEAKPATAPGDPAEEAEASRFDRLGALADFETLGFPPRRPRTHIAK
AAA59531.1         -----
XP_013970422.1     -----

TyroLb              -----
LbrM.35.5630        -----
LinJ.36.5610        -----
A20570              -----
LmxM.36.5370        -----
LmjF.36.5370        -----
LdBPK_365610.1     -----
TcCLB.506839.60    EEFDRL
TcCLB.508717.10    EEFDRL
TCSYLVIO_004733    EEFDRL
AAA59531.1         -----
XP_013970422.1     -----

```

Figura 19: Predição de epítomos polimórficos lineares de linfócitos B na proteína tirosina fosfatase de *L. braziliensis*. Alinhamento entre a proteína recombinante TyroLb, a proteína do banco de dados de *L. braziliensis* (LbrM.35.5630) e ortólogos presente em *L. infantum* (LinJ.36.5610), *L. amazonenses* (A20570), *L. mexicana* (LmxM.36_5370), *L. major* (LmjF.36.5370), *L. donovani* (LdBPK_365610.1), *T. cruzi* clone CL Brener haplótipo não-Esmeraldo (TcCLB.506839.60) e Esmeraldo (TcCLB.508717.10), *T. cruzi* cepa Sylvio (TCSYLVIO_004733), *H. sapiens* (AAA59531.1) e *C. familiaris* (XP_013970422.1). Os epítomos preditos selecionados estão marcados em amarelo na sequência de TyroLb. Os aminoácidos marcados em vermelho mostram a região de homologia entre os ortólogos da proteína.

Foram identificados 18 epítomos lineares de célula B nas proteínas recombinantes, sendo 2 de EctoLi, 3 de MyxoLi, 9 de MyxoLm e 4 de TyroLb. Para

minimizar a ocorrência de reação cruzada com o soro de pacientes infectados com outros parasitos filogeneticamente relacionados, os epítomos selecionados foram submetidos a uma busca de similaridade usando o programa BLASTp contra os bancos de dados dos proteomas preditos baseados nos genomas das diferentes cepas de *T. cruzi*. Além disso, foram também realizadas busca nos bancos de dados dos hospedeiros *H. sapiens* e *C. familiaris* para evitar falsos positivos.

5.8.1 Immunoblotting

Para validar os resultados obtidos nas predições *in silico*, estão sendo sintetizadas membranas de nitrocelulose contendo os peptídeos com maior *score* de predição de epítomo de célula B, pelo BepiPred, e que são possivelmente *Leishmania* específicos. Até o momento, foi realizado o experimento com a membrana contendo os 9 peptídeos de MyxoLm. Esta membrana foi incubada com *pool* de 10 soros de humanos com LVH e, como controle negativo, *pool* de indivíduos não infectados. Após ser regenerada, a membrana foi também incubada com *pool* de 10 soros de cães infectados com *L. infantum* e, como controle negativo, *pool* de cães saudios, não infectados. Os resultados obtidos neste experimento podem ser observados na Figura 20.

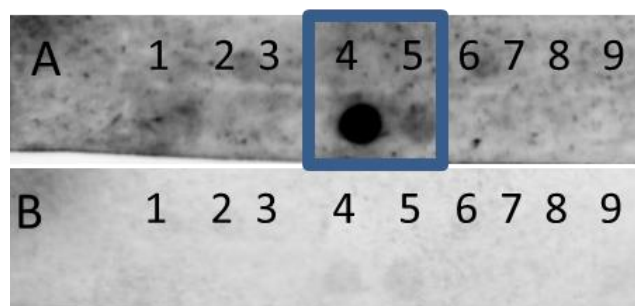


Figura 20: Immunoblotting da membrana contendo os peptídeos de Myxo Lm com maior score de predição de epítomos de célula B. (A) Membrana incubada com o *pool* de 10 soros de humanos com LVH; (B) Membrana incubada com o *pool* de soros de cães infectados com *L. infantum*. Como controle negativo, a membrana foi incubada com os soros de humanos ou cães não infectados e, em ambos os casos, não houve reatividade. Os *spots* escuros correspondem aos peptídeos reativos.

Após a análise densitométrica dos *spots* resultantes dos ensaios de *immunoblotting*, foram selecionados 2 peptídeos para síntese solúvel no experimento utilizando o *pool* de soros de humanos com LVH. No experimento com o *pool* de soros de cães com LVC não houve reatividade diferencial significativa em relação ao *pool* de soros de cães não infectados. Esses dois peptídeos de MyxoLm (Q-T-D-P-K-Q-G-G-K-D-I-K-K e G-N-K-D-E-K-R-P-D-K-S-K) selecionados por *immunoblotting* foram

encaminhados para síntese solúvel e serão utilizados em experimentos de ELISA para avaliação de sua utilização em teste de sorodiagnósticos da LVH.

As membranas de nitrocelulose com os peptídeos antigênicos das demais proteínas recombinantes, EctoLi, MyxoLi e TyroLb estão em processo de produção por *spot* síntese. Em seguida, estes peptídeos serão analisados por *immunoblotting* e os mais reativos serão encaminhados para síntese solúvel para validação dos mesmos para o uso em teste diagnóstico na determinação da infecção por leishmaniose visceral.

6. DISCUSSÃO

Com o aumento da incidência da LV e da resistência aos medicamentos, principalmente, nas áreas endêmicas, é imprescindível a busca por alternativas de controle como um diagnóstico mais preciso de fácil execução e com a detecção dos casos na fase inicial para que haja a realização do tratamento efetivo em tempo hábil, componente essencial para o controle e fundamental para interromper o ciclo vicioso de transmissão (Srivastava et al., 2011).

No Brasil, o Programa Nacional de Controle de Leishmanioses, coordenado pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, recomenda que o diagnóstico da LV seja realizado por métodos parasitológicos, preferencialmente o exame microscópico de aspirado de medula e, alternativamente, usando-se técnicas baseadas na detecção de anticorpos, como a RIFI ou o ELISA (Ministério da Saúde 2006). Embora o diagnóstico parasitológico apresente plena especificidade, este método apresenta vários desafios, como grande variação na sensibilidade dependendo do tipo de amostra analisada (Siddig et al., 1988; Zijlstra et al., 1992) e da carga parasitária presente nos tecidos (Piarroux et al. 1994), é um teste invasivo, e requer profissionais especializados e experientes para as análises.

O diagnóstico ideal seria o desenvolvimento de um teste sensível o suficiente para detectar a doença na fase aguda ou uma infecção assintomática. Ademais, tais testes devem apresentar suficiente especificidade para evitar tratamento desnecessário, uma vez que o mesmo possui sérios efeitos colaterais, ou, ainda, evitar a eliminação de um animal falso positivo de maneira obviamente equivocada (Alves & Bevilacqua 2004, Chappuis et al. 2007). Além disso, os mesmos deveriam ser simples e acessíveis (Srivastava et. al 2011) para permitir o amplo tratamento dos hospedeiros e evitar que se tornem uma fonte de infecção para o vetor (Alves & Bevilacqua 2004).

Sendo assim, os métodos sorológicos mostram-se como ferramentas promissoras para auxiliar no diagnóstico da leishmaniose, pois não são métodos invasivos e é possível trabalhar com um grande número de amostras ao mesmo tempo. Este tipo de diagnóstico baseia-se na avaliação da resposta imune humoral resultante da presença do parasito e, portanto, são métodos indiretos de detecção. Estes métodos partem do pressuposto de que os cães e pacientes infectados passam por uma estimulação policlonal de linfócitos B, que gera grande produção de anticorpos anti-*Leishmania* (Cañavate et al. 2005). Os testes sorológicos utilizados em maior escala no Brasil para avaliação e recomendados pelo Ministério da Saúde são ELISA e RIFI (Dietze 2005).

Sensibilidades variando de 82 a 95% e especificidades de 78 a 92% são relatadas para estes testes, dependendo da preparação antigênica e da espécie de *Leishmania* utilizada (Cahil 1970; Sengupta 1969). Atualmente, o kit de RIFI é produzido por Bio-Manguinhos (FIOCRUZ, Rio de Janeiro-RJ), e distribuído pelo Ministério da Saúde para laboratórios públicos locais e nacionais. Esse método, entretanto, requer microscópio de imunofluorescência e profissional treinado para sua execução, tornando o diagnóstico mais demorado e laborioso. O teste de ELISA é considerado um importante avanço tecnológico para o diagnóstico da LV, pois permite a avaliação de um grande número de amostras em um curto espaço de tempo, seu protocolo pode ser facilmente adaptado para a utilização de diferentes antígenos e a leitura dos resultados é automatizada (Voller et al. 1976, Reithinger et al. 2002). No entanto, esses testes sorológicos podem apresentar baixa sensibilidade para detectar a infecção em animais com baixos níveis de anticorpos anti-*Leishmania* e sua especificidade pode ser dificultada devido às reações cruzadas com anticorpos desenvolvidos por outras parasitoses, como a doença de Chagas, erliquiose e babesiose (Courtenay et al., 2002; Reis et al. 2006). Essas reações cruzadas são causadas por determinantes antigênicos comuns, que dificultam a precisão do resultado (Carmelo et al., 2006). Além disso, quando antígenos brutos são utilizados para RIFI e ELISA, ocorrem também limitações quanto à especificidade e reprodutibilidade destas técnicas (Sundar & Rai, 2002; Singh 2006).

O advento da biologia molecular e a disponibilidade de dados genômicos a partir do sequenciamento de vários organismos levou ao progresso exponencial da compreensão da biologia e da identificação de potenciais alvos para intervenção (de Azevedo et al., 2009) pela seleção de genes, clonagem e produção em larga escala das proteínas recombinantes de interesse (de Azevedo & Soares, 2009). A vantagem da produção de antígenos recombinantes consiste na obtenção de um antígeno com alto grau de pureza, produção a relativo baixo custo e seleção de genes que não sejam conservados entre as espécies, conferindo alta especificidade ao teste o qual o utilize (Fernández-Robledo & Vasta 2010). Assim, o uso de proteínas recombinantes representa uma das melhores opções para o diagnóstico da LV, devido à sua alta especificidade e sensibilidade (Sivakumar et al., 2006).

Utilizando metodologias de mineração de dados na área de imunogenômica, é possível identificar proteínas e/ou peptídeos presentes nos parasitos que exibem características bioquímicas e funcionais semelhantes a moléculas do hospedeiro

(Robinson et al. 2011), e que podem ser utilizadas para o desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico e prevenção. A identificação desses alvos só foi possível devido publicação do genoma dos parasitos em conjunto com a disponibilidade de algoritmos para predição de epítomos, que permite a identificação de novos antígenos (Bryson et al. 2010; Dudek et al. 2010; Singh et al. 2013).

Portanto, diante da carência de testes confiáveis para o diagnóstico da LV no país, neste estudo, identificamos quatro proteínas de *Leishmania* spp., que apresentam *in silico* potencial para o uso no diagnóstico e que possuem alta similaridade no banco de dados ImmunomeBase, que dispõem de genes de *H. sapiens* com função biológica associada a processos de defesa do hospedeiro previamente caracterizada (Rannikko et al. 2007). As proteínas selecionadas foram: ATP difosfohidrolase (Ecto) de *L. infantum* (LinJ.15.0030), proteína de ligação ao GTP (Myxo) de *L. infantum* e *L. mexicana* (LinJ.29.2310 e LmxM.08_29.2200, respectivamente) e proteína tirosina fosfatase (Tyro) de *L. braziliensis* (LbrM.35.5630).

A escolha de proteínas ortólogas ao hospedeiro humano para o diagnóstico das leishmanioses, apesar de potencial resposta cruzada com proteínas do hospedeiro, demonstra ser vantajosa (Menezes-Souza et al., 2014; 2015), uma vez que a produção de anticorpos para essas proteínas seria direcionada para regiões polimórficas e específicas do parasito; sequências comuns entre o hospedeiro e o parasito não apresentariam resposta cruzada devido à seleção negativa de clones de células da resposta imune frente à autoantígenos (Van Lochem et al., 2004; Wen et al., 1994; Holtmeier 2005). Assim, estas sequências, que apesar de desempenhar a mesma função e possuir a mesma origem evolutiva em organismos distintos, apresentam diferenças estruturais, que podem ser reconhecidas imunologicamente (Koonin & Galperin, 2002). No nosso estudo, a similaridade entre o parasito e os hospedeiros para as proteínas testadas variou entre 27-42%. A proteína MyxoLi de *L. infantum* apresentou maior similaridade com seus ortólogos nos hospedeiros mamíferos, sendo 42% com *H. sapiens* e 41% com *C. familiares*; seguido por MyxoLm de *L. mexicana*, que apresentou 37% de similaridade entre ambos os hospedeiros. Por sua vez, para EctoLi de *L. infantum*, a similaridade foi de 27% para seu ortólogo em humano e 28% em cão, e TyroLb de *L. braziliensis* apresentou 28% e 27% de similaridade para *H. sapiens* e *C. familiares*, respectivamente.

Assim, após identificação, expressão e purificação das proteínas de interesse, este trabalho teve como propósito inicial empregá-las como antígenos em

sorodiagnostics canino e humano da LV, de forma a validar os resultados das análises *in silico* de predição de epítomos lineares de células B, que indicaram a antigenicidade das proteínas estudadas. Desta forma, abrem-se perspectivas para o desenvolvimento de novas tecnologias voltadas para o aperfeiçoamento e o desenvolvimento de novos testes diagnósticos que sejam mais rápidos, práticos, confiáveis e baratos.

O nosso grupo tem obtido resultados importantes que podem ser considerados avanços na busca por novos candidatos antigênicos (Menezes-Souza et al., 2013; 2014; 2015), sejam por proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos que obtiveram bons resultados ao validar a predição de epítomos de *Leishmania* para células B. Em nosso trabalho atual, demonstramos, mais uma vez, a importância da tecnologia de imunogenômica utilizada para mineração de dados e sua análise *in silico* na identificação de alvos que sejam sensíveis e altamente específicos.

As proteínas recombinantes em estudo, ao serem testadas em ELISA para o diagnóstico da LVC, foram capazes de discriminar significativamente os cães infectados com *Leishmania* dos animais controles (não infectados ou infectados com *Babesia sp.*), sugerindo que são bons candidatos para uso em sorodiagnostics, em especial a proteína MyxoLi, que apresentou excelentes resultados para todos os parâmetros analisados. Alguns dos antígenos testados, devido à menor correlação entre a sensibilidade e especificidade, poderiam ser utilizados em combinação com outras proteínas ou com seus melhores peptídeos, ainda em avaliação no nosso grupo de pesquisa, a fim de maximizar o desempenho dos ensaios serológicos. Um exemplo foi MyxoLm que apresentou apenas 67% de sensibilidade, mas uma excelente especificidade de 98%. Por sua vez, as proteínas EctoLi e TyroLb, avaliadas no nosso trabalho, apresentaram ambas 89% de sensibilidade e poderiam ser utilizadas em combinação com outras proteínas para triagem inicial de LVC. Há a necessidade de se associar outro teste de triagem com maior sensibilidade conforme explicitado por Costa & Vieira (2001), o uso de apenas um antígeno para a triagem e a confirmação da LVC aumenta a proporção de falsos positivos. Portanto, a combinação de MyxoLi e MyxoLm pode aumentar o desempenho do teste uma vez que apresentam especificidades elevadas de 96 e 98%. Sendo, portanto, capazes de detectar as amostras positivas para *Leishmania* e ainda eficaz em distinguir as infecções.

No trabalho de Faria et al. (2011), que consistiu na identificação, produção e teste em ELISA de peptídeos sintéticos como novos antígenos para o diagnóstico da LVC, foram selecionados 2 peptídeos da proteína C8 e 8 peptídeos da proteína C1. Um

peptídeo selecionado da proteína C1 apresentou como resultados área sob a curva ROC de 0,797, especificidade de 70% e sensibilidade de 75,8%, e a proteína completa C1 apresentou 60% de especificidade e 80% de sensibilidade (Faria et al., 2011). Comparando estes resultados aos dados obtidos no nosso trabalho, os valores de sensibilidade de todas as proteínas, com exceção de MyxoLm, foram muito superiores, variando de 82 a 90%. Por outro lado, a proteína recombinante C8 apresentou 75% de sensibilidade e 90% de especificidade, que são valores considerados satisfatórios para testes diagnósticos (Faria et al., 2011). De forma interessante, no presente estudo foi observado, para efeitos de comparação, resultados de 96% e 98% de especificidade para MyxoLm e MyxoLi, respectivamente. Esse é um resultado muito promissor quando comparado a outras proteínas já descritas na literatura, tendo essas proteínas possibilidades de virem a compor futuros testes diagnósticos para a LV.

Atualmente, o diagnóstico da LVC é obtido a partir de uma combinação de evidências clínicas e da confirmação por testes sorológicos (Ministério da Saúde 2006), uma vez que, não há um sinal clínico patognomônico e as características consideradas típicas no animal doente podem se confundir com as de outras enfermidades como erliquiose, babesiose, rickettsiose, neoplasia cutânea, entre outras (Barbosa-de-Deus et al. 2002, Reis et al. 2006a). Com o surgimento do teste rápido imunocromatográfico da rK39 (DPP-Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos, Brasil), este passou a ser utilizado para triagem inicial dos cães (Sundar et al. 2002, Carvalho et al. 2003). Por sua vez, o kit EIE-LVC – Bio-Manguinhos passou a ser utilizado como teste de ELISA confirmatório da LVC e em muitos casos é considerado teste sorológico padrão-ouro para o diagnóstico dessa parasitose em cães e o recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil (Alves & Bevilacqua 2004).

No entanto, estudos sorológicos comparativos recentes realizados com o kit EIE-LVC demonstram que o uso deste como teste sorológico padrão-ouro apresenta limitações reais (Menezes-Souza et al. 2014b, a). O primeiro percalço do kit EIE-LVC é o fato de este teste consistir na reação de anticorpos presentes nos soros ou plasmas de cães com antígenos solúveis de *L. major* like. Apesar de o antígeno derivar de espécie diferente da qual geralmente os cães são infectados no Brasil, ao contrário do que se esperaria, o antígeno solúvel utilizado parece não ser um fator interferente no desempenho do teste, principalmente pelo fato de que espécies de *Leishmania* exibem um alto grau de conservação entre elas e com outros tripanosomatídeos (El-Sayed et al. 2005). No entanto, o uso do antígeno bruto solúvel no ELISA indireto é pouco

recomendável, visto que, por razão dessa alta conservação proteômica entre os tripanosomatídeos, o grau de reatividade cruzada nos ensaios sorológicos é bem significativo, reduzindo drasticamente a especificidade dos testes (Romero et al. 2009, Zanette et al. 2014). A segunda limitação do kit EIE-LVC está associada com a sensibilidade do teste, resultando em sacrifício grosseiro da sua especificidade. Seguindo as recomendações do manual do próprio teste (FIOCRUZ-Bio-Manguinhos, Brasil), valores de *cutoff* obtidos são extremamente baixos. De acordo nossos resultados, apesar da alta sensibilidade obtida, o kit EIE-LVC apresentou valores inferiores de especificidade, VPP e acurácia, quando comparado com todos os antígenos utilizados neste trabalho. É importante ressaltar, que o kit sugere valores esperados de sensibilidade e especificidade de 94,54% e 91,76%, respectivamente.

Um trabalho do nosso grupo, que usou a porção repetitiva de kinesina (KDDR) de *L. infantum* como antígeno no ensaio de ELISA, mostrou que antígenos constituídos de motivos repetitivos desta proteína exibem alto potencial antigênico (Lemos et al., 2014). Corroborando com os estudos de reatividade cruzada (Romero et al. 2009, Zanette et al. 2014), ao se comparar o reconhecimento sorológico canino da rKDDR com o kit EIE-LVC, comprovou-se que o antígeno recombinante possui maior sensibilidade e especificidade que o kit, que mostrou significativa reatividade cruzada, reconhecendo 100% dos soros com *T. cruzi* e *Babesia* sp., quando o *cutoff* é calculado de acordo com o manual do fabricante (Lemos et al., 2014). Este teste apresenta como ponto negativo, além da especificidade, a baixa sensibilidade, principalmente em cães assintomáticos (Faria et al., 2011; Grimaldi et al., 2012).

Outro trabalho do nosso grupo, avaliando o ELISA com rPeroxidoxina, mostrou uma maior capacidade de discriminação entre animais vacinados e infectados, o que é um requisito importante para campanha de controle da LVC. O teste apresentou um valor combinado de sensibilidade (96%) e especificidade (100%) mais elevado comparado com EIE-LVC. No teste sorológico, o VPP para rPeroxidoxina foi de 100,00%, enquanto o valor obtido por EIE-LVC foi de 81,03% (Menezes-Souza et al., 2014). Comparando com nosso trabalho atual, os antígenos MyxoLi e MyxoLm apresentaram VPP de 97%, enquanto que, para o kit EIE-LVC, o valor foi de 72%, mostrando um resultado similar na baixa concordância do kit padrão-ouro. Quanto à especificidade, os antígenos MyxoLi e MyxoLm apresentaram 96% e 98%, respectivamente.

Em outro estudo também realizado pelo nosso grupo, a rCatL e o peptídeo sintético derivado dessa proteína foram comparados com o kit comercial EIE-LVC (Menezes-Souza et al., 2015). Embora a rCatL tivesse uma especificidade mais elevada do que o EIC-LVC, o kit comercial mostrou a sensibilidade mais elevada. O valor de acurácia para rCatL (89,33%) foi superior ao peptídeo sintético (85,33%) e ao kit EIE-LVC (72,00%) e a área sob a curva ROC para a proteína recombinante (0,885) também foi superior ao peptídeo (0,876) (Menezes-Souza et al., 2015). No nosso estudo, a acurácia das seis proteínas testadas variou de 75% a 93%, já o kit EIE-LVC apresentou 82%. A área sob a curva ROC, para MyxoLi foi de 0,9616 bem superior à rCatL.

Em relação à comparação de testes sorológicos empregados no estudo, não era esperada uma boa concordância entre o ELISA Bio-Manguinhos e as proteínas recombinantes, devido à baixa especificidade apresentada pelo primeiro teste (Faria et al., 2012). Entretanto, seria esperado que as proteínas recombinantes tivessem uma maior concordância entre si. O fato de isso não ter ocorrido pode ter sido devido a diferentes padrões de reconhecimento antigênico que podem existir entre esses antígenos. A ocorrência de reações cruzadas entre as proteínas é compatível com o desempenho de muitos antígenos recombinantes desenvolvidos nos últimos anos para diagnóstico da LVC e ocorrem devido ao compartilhamento de determinantes antigênicos entre parasitos, particularmente organismos do mesmo gênero (Oliveira et al., 2011; Pinheiro et al., 2009). No estudo realizado por Oliveira et al. (2011), foi investigado cinco diferentes proteínas recombinantes para o diagnóstico canino. As sensibilidades variaram entre 67,4% e 93,0%, enquanto as especificidades variaram entre 76,1% e 100%, com índices de reações cruzadas chegando a 23,9%. Por sua vez, Pinheiro et al. (2009) relataram o desenvolvimento de uma cisteína proteinase recombinante, que em ELISA fornece sensibilidade de 98% e especificidade de 96%, mas que apresenta reações cruzadas com *B. canis*.

Para tentar contornar esse problema da baixa especificidade apresentada pelos testes diagnósticos, alguns antígenos purificados sintéticos ou recombinantes têm sido cada vez mais identificados e testados. Entre eles, a proteína recombinante K39 (rK39) de *Leishmania chagasi* (Burns et al, 1993) e a rK26 têm sido as mais amplamente avaliadas. Estudos mostram que estas proteínas apresentam valores de sensibilidade e especificidade consideráveis. No trabalho realizado por Rosário et. al 2005, para a rK39, os resultados de sensibilidade e especificidade foram de 98% e 100%, respectivamente,

e para a rK26 foram de 99% e 96%, respectivamente. Quando utilizada em métodos baseados em ELISA, a rK39 resultou em sensibilidades de 93 a 99% e especificidades de 93 a 100% (Zijlstra et al., 1998; Braz et al., 2002). A mesma proteína foi utilizada em plataformas imunocromatográficas, apresentando valores de sensibilidade e especificidade que variam de 67 a 100% e de 59 a 100%, respectivamente (Ritmeijer et al., 2006).

Reis et al. (2006), ao testar ELISA com o antígeno rK39, obtiveram resultados falso-negativos (12,5%) devido à presença de cães com títulos abaixo de 1:320. Por sua vez, Porrozzi et al. (2007), ao testar diferentes antígenos recombinantes, obtiveram sensibilidades de 66% com rK26 e rK39 e 88% com o A2, em cães assintomáticos. As especificidades dessas proteínas foram de 90%, 85% e 96%, respectivamente, e houve reação cruzada com *L. braziliensis* para todos os antígenos utilizados (Porrozzi et al., 2007). Estes resultados mostram que estudos de validação desses testes têm mostrado resultados variáveis, de acordo com a região geográfica do estudo, do produto e da metodologia empregada (Ritmeijer et al., 2006), afirmando mais uma vez a necessidade de uma padronização quanto à utilização do antígenos e protocolos dos testes.

Atualmente, admite-se não existir um padrão ouro definitivo para o diagnóstico da LVC (Ferreira et al. 2007, Rodríguez-Cortés et al. 2010). O teste padrão a ser adotado pode variar de acordo com o foco investigativo do pesquisador e a escolha da técnica de referência deve ser orientada de acordo com o custo, operacionalidade, sensibilidade e especificidade envolvida (Rodríguez-Cortés et al. 2010). A dificuldade em se diagnosticar a infecção em cães sem manifestações clínicas de forma acurada tem sido uma grande preocupação para as campanhas de controle e ainda permanece como um desafio para o diagnóstico correto da LVC (Porrozzi et al. 2007).

Nos últimos vinte anos, em várias cidades brasileiras, no Nordeste (São Luís, Natal, Aracaju), Norte (Boa Vista e Santarém), Sudeste (Belo Horizonte e Montes Claros) e Centro-oeste (Cuiabá e Campo Grande) têm sido registrados epidemias de LVH (Ministério da Saúde, 2014). Uma das preocupações é sua elevada letalidade: próxima a 100% em pacientes não tratados (Machado de Assis et al, 2008). Mesmo com a instituição do tratamento, 1 a 5% dos indivíduos afetados morrem como resultado da resistência à quimioterapia, pela toxicidade dos quimioterápicos, ou como consequência de complicações da doença, principalmente quando o diagnóstico é tardio (Berman, 1997).

Assim como para o diagnóstico de LVC, as proteínas recombinantes K39 (rK39) e K26 (rK26) têm sido as mais amplamente avaliadas para detecção de LVH. No entanto, os estudos de validação desses testes têm mostrado resultados variáveis, de acordo com a região geográfica do estudo, do produto e da metodologia empregada (Ritmeijer K et al., 2006). Machado de Assis e colaboradores (2008) demonstraram que a sensibilidade do método de ELISA utilizando-se o antígeno rK39 foi superior à obtida com o teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH (DiaMed), que também utiliza este antígeno. As limitações na interpretação dos resultados decorrentes da imperfeição do padrão-ouro ressaltam a necessidade de mais pesquisas na área de diagnóstico, com o objetivo de aprimorar as abordagens metodológicas utilizadas em estudos de validação de métodos diagnósticos. Os valores de sensibilidade (93%) e especificidade (97%) verificados para o teste IT-LEISH (Machado de Assis et al., 2008) aproximam-se de dados obtidos em outros estudos que, ao avaliarem a detecção de anticorpos anti-rK39, observaram valores de sensibilidade variando de 90 a 100%; e de especificidade, de 93 a 100% (Ritmeijer et al., 2006; Sundar et al., 1998). Na literatura, contudo, há relatos de desempenho inferior de testes imunocromatográficos, como a sensibilidade de 80% para rK39 comparada com a de 86% para RIFI em estudo realizado no Kuwait (Iqbal et al., 2002); resultado semelhante foi relatado em estudo realizado no Sudão, onde testes imunocromatográficos usando-se o antígeno rK39 também apresentaram baixa sensibilidade (Zijlstra et al., 2001). No trabalho de Boarino et al. (2005), foi produzida uma proteína quimérica, resultante da fusão da K9, da K26 e da subunidade de K39, de forma recombinante. Os resultados apresentados foram especificidade de 99%, enquanto a sensibilidade apresentada foi de 82% (Boarino et al., 2005).

Em nosso estudo, foi observado que as proteínas recombinantes EctoLi e TyroLb foram altamente específicas para diferenciar os pacientes infectados por *L. infantum* de indivíduos saudáveis, apresentando 94% de especificidade e 93% de valor preditivo positivo (VPP), que indica a chance de pacientes positivos no teste possuírem efetivamente a doença. As demais proteínas não apresentaram valores de especificidade e de área sob a curva ROC suficientemente satisfatórios para serem considerados bons antígenos para esse método de diagnóstico.

Na literatura não é frequente publicações de proteínas recombinantes em diagnóstico de LV humana (Fonseca, 2013). Por outro lado, quando testadas em ELISA para o diagnóstico da LVC, as proteínas recombinantes apresentaram resultados significativos, como mostrado no nosso estudo. Estes dados confirmam que o

processamento e a apresentação de antígenos ocorrem de maneira diferente entre as espécies de hospedeiros mamíferos. A apresentação de antígenos pelas células do sistema imunológico que irão promover a produção de anticorpos contra os mesmos é feita por associação destes com moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Essas moléculas são variáveis principalmente em relação à região de ligação do antígeno, que se dá por interação entre as sequências de aminoácidos (Tizard 2009). Fonseca et al. (2015) mostrou que o antígeno C9, quando testado em ELISA com amostras humanas, apresentou sensibilidade de apenas 68% e especificidade de 78%. Ao comparar estes dados aos nossos resultados, foi observado que apesar das proteínas EctoLi e TyroLb terem apresentado valores de sensibilidades baixos (64% e 60%, respectivamente), ambas apresentaram resultados semelhantes de sensibilidade ao encontrado no estudo de Fonseca et al. (2014). No entanto, as especificidades de EctoLi e TyroLb foram muito superiores (94% para ambas) em relação à apresentada pelo antígeno C9 (Fonseca et al., 2014). Estas duas proteínas recombinantes (EctoLi e TyroLb) obtidas neste trabalho apresentaram ambas 93% de valor preditivo positivo (VPP), enquanto os demais candidatos tiveram para esse parâmetro valores entre 74-79%. Como o VPP expressa a probabilidade de uma amostra com teste positivo ter efetivamente a doença, então pode-se concluir que os antígenos EctoLi e TyroLb têm melhores resultados para LVH.

Tão importante quanto a probabilidade de uma amostra com teste positivo, realmente ser de um indivíduo doente é a avaliação de reatividade cruzada em um teste de diagnóstico (Pereira et al., 2012). Anteriormente, nosso grupo já demonstrou o potencial uso de rPeroxidoxina de *L. braziliensis* no imunodiagnóstico da LVH e LT em comparação com o antígeno solúvel (Menezes-Souza et al., 2014). Os altos níveis de anticorpos contra Peroxidoxina observado nos indivíduos infectados com *L. infantum* confirma a observação de outros estudos, que avaliaram a antigenicidade e imunogenicidade contra antígenos de *L. braziliensis*. Este efeito é devido à alta conservação, a nível proteômico, entre as espécies de *Leishmania* que favorece a reatividade cruzada contra a infecção por diferentes espécies, ampliando assim o espectro em áreas endêmicas comuns a outras leishmanioses. Esta alta conservação ainda pode se estender a outro tripanossomatídeos, como, por exemplo, o agente etiológico da doença de Chagas. No mesmo estudo, ainda foi verificado que a rPeroxidoxina apresentou grande habilidade em separar os indivíduos infectados por *L. infantum* daqueles infectados com *T. cruzi* e quando usado o antígeno solúvel esta

discriminação não foi possível. Mais uma vez estes dados corroboram com os nossos achados, nos quais EctoLi mostrou uma elevada especificidade entre as infecções. Este resultado sugere que novos testes, usando peptídeos destas proteínas em uma quimera, possam apresentar um teste ideal para detectar e diferenciar a infecção.

A especificidade e sensibilidade dos métodos atuais usando antígenos brutos variam dependendo da composição antigênica, espécie e cepa do parasito, protocolo de produção e condições experimentais (Zanette et al., 2014). Por exemplo, o antígeno solúvel de *L. braziliensis* ou o antígeno comercial do kit EIE-LVC, que utiliza antígeno preparado a partir promastigotas de *L. major-like*, ambos produzem muitos resultados falsos positivos. Assim, a seleção de antígenos é crucial para especificidade e sensibilidade da técnica diagnóstica. É preciso destacar que no estudo atual foi avaliada a antigenicidade com antígeno bruto de *L. infantum* e no trabalho da rPeroxdoxina foi utilizado o antígeno bruto de *L. braziliensis* (Menezes-Souza et al., 2014). O reconhecimento, frente ao antígeno de *L. infantum*, apresentou 87% de sensibilidade e 75% de especificidade. Quando foi avaliado o antígeno de *L. braziliensis*, a sensibilidade foi de 53% e a especificidade de 50% (Menezes-Souza et al., 2014). Essa diferença destaca, mais uma vez, o quão fundamental é a padronização na escolha do antígeno para o teste diagnóstico.

Em estudos prévios realizados pelo nosso grupo, foi demonstrado que a proteína recombinante rCatL e seu peptídeo sintético apresentaram melhor desempenho no diagnóstico da LVH quando comparado ao antígeno solúvel de *L. braziliensis* (SLbA) (Menezes-Souza et al., 2015). Os valores de sensibilidade do teste mostraram que o peptídeo, derivado da proteína CatL, apresentou melhor desempenho no teste, com 96% de sensibilidade, em comparação com a rCatL, que apresentou 74%, e o SLbA, com apenas 52%. Em comparação com estes resultados, as proteínas Myxo de *Leishmania*, identificadas e testadas neste estudo, apresentaram sensibilidade superior à rCatL (89% MyxoTLm, 84% MyxoLm e 82% MyxoLi), sugerindo que quando seus peptídeos forem testados poderão apresentar valores semelhantes ou superiores ao peptídeo da rCatL. Em contraste, estas proteínas foram menos específicas que rCatL. Apesar de EctoLi e TyroLb apresentarem menor sensibilidade no teste de ELISA, esses antígenos apresentaram maior especificidade (94% em ambos), enquanto rCatL apresentou 91%.

A escolha do antígeno no diagnóstico de leishmaniose ainda representa um obstáculo relevante, porque é comum encontrar um grande número de reações falso positivas observadas em indivíduos infectados com outros tripanossomatídeos,

principalmente quando é utilizado o antígeno bruto de *Leishmania*, devido à presença de múltiplos epítomos comuns (Alves et al., 2013; Braitbard et al., 2006). No mesmo estudo da rCatL, quando um ELISA foi realizado usando SLbA, números elevados de resultados falso positivos apareceram nos pacientes chagásicos (65,0%), inclusive no controle (30,0%) (Menezes-Souza et al., 2015), o que pode ser explicado pela reação cruzada entre *Leishmania* e outras doenças não relacionadas causados por determinantes antigênicos comuns que dificultam o diagnóstico (Coitinho et al., 2012), especialmente em regiões onde doenças causadas por diferentes parasitos são endêmicas (Wellings, Atherton, 1997).

Confirmando esses relatos de reatividade cruzada, quando foram utilizados soros de pacientes chagásicos em nosso estudo, foi observada 100% de reatividade ao se utilizar a proteína MyxoTLM como antígeno nos ensaios de ELISA para LVH. Por esta razão, em uma primeira análise, esta proteína não é um bom candidato ao sorodiagnóstico específico da LVH, uma vez que se objetiva a separação das infecções por *Leishmania* e *T. cruzi*. Porém, MyxoTLM seria uma excelente candidata para sorodiagnóstico e triagem de infecção por tripanossomatídeos (*L. infantum* + *T. cruzi*), com potencial uso em triagem de imunobiológicos como, por exemplo, em bancos de sangue e hemoderivados. Esta proteína apresenta uma significativa capacidade de diferenciar soros de pacientes infectados com um desses parasitos e soros de indivíduos sadios, com $p < 0,0001$. A proteína recombinante MyxoTLM apresentou especificidade de 100% e sensibilidade de 90%, quando é utilizada como antígeno para diagnosticar um grupo infectado com tripanossomatídeos (LVH + DC) e um grupo de indivíduos negativos. Em comparação com a utilização de antígeno bruto de *L. infantum*, que apresenta uma especificidade de 96% e sensibilidade de 86%, a proteína MyxoTLM demonstrou ser um promissor antígeno para ser utilizado em triagem inicial de diagnóstico, principalmente em bancos de sangue.

A transmissão através de transfusão sanguínea, embora possível do ponto de vista teórico, ainda não possui comprovação científica consistente (ANVISA 2004). Como parasitos intracelulares de monócitos, espera-se que os parasitos de *Leishmania* estejam presentes no sangue por um período não definido entre a infecção após o repasto sanguíneo do vetor e sua localização final em órgãos alvo. O desenvolvimento da doença começa com um período subclínico assintomático indeterminado, no qual os parasitos já podem estar circulando no sangue periférico, mas não há alterações clínicas ou hematológicas. A LV transmitida por transfusão de sangue já foi descrita em

indivíduos de áreas não endêmicas do Reino Unido, da Bélgica, da França e da Índia, mesmo em indivíduos sem histórico de viagem ao exterior (Gontijo et al., 2004; Lainson & Shaw 1987).

Em estudo realizado em Montes Claros/MG, objetivou-se verificar a prevalência de adultos infectados por *L. infantum* entre os doadores de sangue do Hemocentro Regional de Montes Claros, área endêmica de LV. Em relação aos resultados sorológicos, 5,5% dos participantes apresentaram sorologia positiva para LV (Monteiro et al., 2013). Durante a Guerra do Golfo, no início dos anos 1990, após a operação denominada Tempestade no Deserto, vários casos de infecção por *Leishmania* foram documentados nos produtos sanguíneos dos soldados provenientes do Iraque (Bihl et al., 2007). Em Portugal, a existência de história conhecida de LV é um critério de suspensão definitiva de doadores no país. No entanto, se considerar a incidência desta infecção em Portugal, a possibilidade de existirem portadores assintomáticos como reservatórios humanos da doença e a potencial gravidade dos casos de doença em pacientes imunodeprimidos ou recém-nascidos, talvez se devam considerar medidas adicionais para prevenir a transmissão desta infecção por transfusão (Pereira et al., 2011). No entanto, o custo/efetividade da utilização de testes sorológicos para o rastreio dos doadores é difícil de determinar dada a dificuldade em estabelecer a real incidência de casos de leishmaniose transmitidos por transfusão.

Um estudo realizado em Natal, no Rio Grande do Norte, com pacientes em hemodiálise, que receberam múltiplas transfusões de sangue, demonstrou a soroprevalência de anticorpos para *Leishmania* (Otero et al., 2000). Neste estudo, uma possível correlação entre a sororreatividade e a presença de DNA de *L. donovani* foi investigada em doadores de sangue saudáveis e assintomáticos. Após os soros serem testados através do ELISA com ligante fucose manose (FML), foram encontrados 21 doadores de sangue assintomáticos sororreativos com FML, sendo que destes 5 (24%) foram positivos pela PCR e 9 (43%) foram positivos no ensaio de dot-blot com amostras de sangue (Otero et al., 2000).

Portanto, a proteína recombinante MyxoTLm, que apresentou excelentes resultados nos teste de ELISA contra tripanossomatídeos, é um promissor candidato para ser utilizado em teste de triagem em bancos de sangue. Tal medida poderia não só diminuir o risco de transmissão da doença de Chagas e leishmaniose, como também poderia diminuir o número de coletas e posterior rejeição de material biológico.

Finalmente, nosso trabalho sugere que a estratégia de ELISA baseada em proteínas recombinantes homólogas ao sistema imune do hospedeiro, pode ser útil para o desenvolvimento de um ambiente sensível e altamente específico para o sorodiagnóstico da LV e para triagem de tripanossomatídeos. Estes achados de especificidade e baixa reatividade cruzada colocam estas proteínas como potenciais antígenos para diagnóstico da leishmaniose.

Adicionalmente, este trabalho centrou-se na importância de empregar estratégias de abordagem por bioinformática para mapear epítomos polimórficos de células B presentes em potenciais antígenos, objetivando-se a seleção de alvos potencialmente antigênicos e com menor possibilidade de reatividade cruzada com outras infecções. Assim, como perspectiva, visamos a produção de um antígeno multimérico, composto por diferentes proteínas e/ou epítomos de *Leishmania*, objetivando o desenvolvimento de um teste sorológico de melhor sensibilidade e especificidade, de modo que o teste seja capaz de chegar à população com facilidade, em todos os focos de leishmaniose, permitindo o devido controle dessa doença em expansão. O uso de métodos de diagnóstico sensíveis e específicos, de fácil execução e interpretação, que não necessitem de infraestrutura laboratorial e profissionais especializados, deverá trazer benefícios importantes para o diagnóstico acurado e rápido da LV humana e caniana, principalmente nas localidades onde o acesso a exames laboratoriais mais complexos é limitado.

7. CONCLUSÃO

A partir da expressão de proteína dos genes ATP difosfohidrolase (Ecto) de *L. infantum* (LinJ.15.0030), proteína de ligação ao GTP (Myxo) de *L. infantum* e *L. mexicana* (LinJ.29.2310 e LmxM.08_29.2200, respectivamente) e proteína tirosina fosfatase (Tyro) de *L. braziliensis* (LbrM.35.5630), e posterior avaliação das propriedades antigênicas com soros caninos, podemos concluir MyxoLi e EctoLi possuem potencial para sorodiagnóstico da LVC devido a elevada especificidade, sugerindo serem bons candidatos para compor testes diagnóstico de triagem e principalmente confirmatório na infecção por leishmanioses. A avaliação das propriedades antigênicas com soros humanos mostrou que a proteína recombinante MyxoTLm apresentou grande potencial para a compor testes de triagem em banco de sangue para exclusão de indivíduos infectados por tripanossomatídeos.

Com os dados obtidos, este trabalho sugere que o uso de abordagens genômicas abrem perspectivas de intervenção e identificação de novos alvos para diagnóstico da leishmaniose visceral canina e humana. E ainda, que a estratégia de proteínas recombinantes, homólogas ao sistema imune do hospedeiro, pode ser útil para o desenvolvimento de um teste sensível e altamente específico para o sorodiagnóstico.

8. PERSPECTIVAS

- Validação por *immunoblotting* dos peptídeos selecionados por predição *in silico* das demais proteínas recombinantes, EctoLi, MyxoLi e TyroLb, usando soros de cães e humanos com LV;
- Avaliação da eficácia dos peptídeos com maior reatividade, selecionados pelo *immunoblotting*, para o desenvolvimento de teste sorodiagnóstico da LV humana e canina;
- Construção de proteínas quiméricas com os peptídeos mais reativos encontrados neste trabalho e teste para potencial uso no sorodiagnóstico das leishmanioses;
- Validar o resultado dos ELISAs com os antígenos que apresentaram melhores resultados neste estudo, testando-os contra um banco de soros composto por maior número de indivíduos e oriundos de diferentes áreas endêmicas;
- Avaliação dos antígenos recombinantes e/ou peptídeos encontrados nesse estudo, com alto grau de ranqueamento nas metodologias de predição para células T CD4 e CD8 e linfócitos B, como vacina contra LV.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abranches P, Campino L, Santos-Gomes GM. (1998). Canine leishmaniasis. New concepts of epidemiology and immunopathology: their impact in the control of human visceral leishmaniasis. *Acta Med Port.* 1(10):871-5.
- Abu-Dayyeh I, Shio MT, Sato S, Akira S, Cousineau B, Olivier M. *Leishmania*-induced IRAK-1 inactivation is mediated by SHP-1 interacting with an evolutionarily conserved KTIM motif. *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 2008; 2:e305.
- Accola, M.A. et al. (2002). The antiviral dynamin family member, MxA, tubulates lipids and localises to the smooth endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 277, 21829–21835.
- Akhoundi B, Mohebbali M, Babakhan L, Edrissian G-H, Eslami M-B, Keshavarz H, Malekafzali H. (2010.) Rapid detection of human *Leishmania infantum* infection: a comparative field study using the fast agglutination screening test and the direct agglutination test. *Travel Med Infect Dis*, 305-310.
- Akilov OE, Khachemoune A, Hasan T. (2007). Clinical manifestations and classification of Old World cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol*, 132e42.
- Alto NM, Orth K. (2012) Subversion of cell signaling by pathogens. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*; 4:a006114.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25, 3389-3402.
- Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B, Jiménez M, Laguna F, López-Vélez R, Molina R, Moreno J. (1997.). *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin. Microbiol. Rev.*, pp. 10: 298-319.
- Alvar J, Gutiérrez-Solar B, Pachón I, Calbacho E, Ramírez M, Vallés R, Guillén JL, Cañavate C, Amela C. (1996). AIDS and *Leishmania infantum*: new approaches for a new epidemiological problem. *Clin. Dermatol.*, pp. 14:241–246.
- Alvar J, ID Velez, C Bern, Herrero M, Desjeux P, Cano J et al. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS One.* 7 (5): e3567.
- Alves WA, Bevilacqua PD. (2004). Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. *Cadernos de saude publica / Ministerio da Saude, Fundacao Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saude Publica*, 259-265.
- Amin ER el, Wright EP, Abdel Rahman AM, Kolk A, Laarman JJ, Pondman KW. (1986.). Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparison of ELISA--immunofluorescence and indirect haemagglutination. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80, 271–274.

Andrade H, Toledo V, Marques M, Silva J, Tafuri W, Mayrink W, Genaro O. (2002). *Leishmania (Leishmania) chagasi* is not vertically transmitted in dogs. *Vet. Parasitol.* 103, 71-81.

Antinori S, Gianelli E, Calattini S, Longhi E, Gramiccia M, Corbellino M. . (2005). Cutaneous Leishmaniasis: an increasing threat for travellers. . *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*; 11, 343e6.

Angulo IL. Infecções emergentes de importância transfusional. In: Bordin José O, Langli Junior, Dante M, Covas DT. *Hemoterapia Fundamentos e prática*. 1ª edição. São Paulo: Atheneu; 2007; p.613-8

Agência Nacional de Vigilância Sanitária.(2004) RDC 10 de 23/01/04. Brasília; Diário Oficial da União; 26.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2004) RDC 129 de 24/05/04. Brasília; Diário Oficial da União.

Argaw D, Mulugeta A, Herrero M, Nombela N, Teklu T, Tefera T, et al. (2013). Risk factors for visceral leishmaniasis among residents and migrants in Kafta-Humera, Ethiopia. *PLoS Negl Trop Dis*.

Ashford RW. (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. . *Int. J. Parasitol.* 30, 1269-1281.

Assis TSM, Braga ASC, Pedras MJ, Barral AMP, Siqueira IC, Costa CHN, Costa DL, Holanda TA, Soares VYR, Biá M, Caldas AJM, Romero GAS, Rabello A (2008). Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico de leishmaniose visceral humana. *Epidemiol Serv Saúde*, Brasília. 17(2):107-116

Baneth G, Aroch I . (2008). Canine leishmaniasis – a diagnostic and clinical challenge. . *Vet. J.* 175, pp. 14-15.

Banuls AL, Hide M, Prugnolle F. (2007). *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol*;64, pp. 1–109.

Barbosa AJA . (1988). As técnicas de Imunoperoxidase no Estudo da Etiologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias. . *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*, 1-6.

Barbosa-de-Deus R, Mares-Guia M, Nunes A, Costa K, Junqueira R, Mayrink W et al. 2002. *Leishmania major*-like Antigen for Specific and Sensitive Serodiagnosis of Human and Canine Visceral Leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9(6): 1361–1366.

Barinaga M (1997) The telomerase picture fills in. *Science*276(5312):528-9

Barral A, Guerreiro J, Bomfim G, Correia D, Barral-Netto M, Carvalho EM. (1995). Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 53, 256-259.

Barros, F.S., De Menezes, L.F., Pinheiro, A.A.S., Silva, E.F., Lopes, A.H.C.S., De Souza, W., Meyer-Fernandes, J.R. (2000). Ectonucleotide diphosphohydrolase activities in *Entamoeba histolytica*. *Arch. Biochem. Biophys.* 375, p. 304±14.

Basano SA, Camargo LMA. (2004). Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Rev. Bras. Epidemiol.* 7, 328-337.

Basset D, Faraut F, Marty P, Dereure J, Rosenthal E, Mary C, Pratlong F, Lachaud L, Bastien P, Dedet JP. (2005). Visceral leishmaniasis in organ transplant recipients: 11 new cases and a review of the literature. *Microbes Infect.* 7(13), 1370-5.

Bates P . (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotas by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology.* 37, 1097–1106.

Bekpen, C., J. P. Hunn, C. Rohde, I. Parvanova, L. Guethlein, D. M. Dunn, E. Glowalla, M. Leptin, and J. C. Howard. (2005). The interferon-inducible p47 (IRG) GTPases in vertebrates: loss of the cell autonomous resistance mechanism in the human lineage. *Genome Biol* , p. R92.

Berman JD. (1997). Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 24, 684-703.

Bevilacqua PD. 1999. Leishmaniose visceral: interesses públicos e interesses privados na construção social de uma epidemia em Belo Horizonte. Tese (Doutorado) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 343p.

B. Monge-Maillo, R. López-Vélez. (2015) Miltefosine for visceral and cutaneous leishmaniasis: drug characteristics and evidence-based treatment recommendations, *Clin. Infect. Dis.* 60

Bisaggio, D.F.R., Peres-Sampaio, C.E., Meyer-Fernandes, J.R., Souto-Padrón, T., 2003. Ecto-ATPase activity on the surface of *Trypanosoma cruzi* and its possible role in the parasite–host cell interaction. *Parasitology Research* 91, 273–282.

Boarino A, Scalone A, Gradoni L, Ferroglio E, Vitale F, Zanatta R, Giuffrida MG, Rosati S 2005. Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 12(5): 647-653.

Boehm, U. et al. . (1998). Two families of GTPases dominate the complex cellular response to IFN-g. *J. Immunol.* 161, pp. 6715–6723.

Boelaert M, Criel B, Leeuwenburg J, Damme W Van, Ray D Le, Stuyft P Van der . (2000). Visceral leishmaniasis control: a public health perspective. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94, pp. 465–471.

Boutet I, Taler V and Collin CA (2015) On the particular vulnerability of face recognition to aging: a review of three hypotheses. *Front. Psychol.* 6:1139

Bourdoiseau G, Marchal T, Magnol JP. (1997). Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. . *J. Vet. Diagn. Invest.* 9, 439–440.

Britto C, Pirmez C, Fernandes O. (2005). Técnicas básicas de diagnóstico molecular em doenças infecciosas e parasitárias. In: *Coura JR editor. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias.* . Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Burns JM Jr, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG 1993. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90(2):775-9.

Cabrera MAA, Paula AA, Camacho LAB, Marzochi MCA, Xavier SC, Silva AVM, Jansen AM . . (2003). Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: Assessment of risk factors. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 45(2), 79-83.

Cahill. K. M. (1970). Field techniques in the diagnosis of kala-azar. *Trans. R Soc. Med. Hyg.* 64, 107-110.

Cañavate C, Cruz I, Flores M 2005. Leishmaniosis canina: diagnóstico. *Información Veterinaria: La leishmaniosis canina, 1a parte, p. 28-32, 2005*

Cardoso L, Cabral M 1998. *Leishmania* and canine Leishmaniasis. *Ver. Port. Ciênc. Vet.* 527:122-141.

Carneiro FR, Silva TC, Alves AC, Haline-Vaz T, Gozzo FC, Zanchin NI. (2006). Spectroscopic characterization of the tumor antigen NY-REN-21 and identification of heterodimer formation with SCAND1. . *Biochemical and biophysical research communications*, 343, 260-268.

Carvalho FA, Charest H, Tavares CA, Matlashewski G, Valente EP, Rabello A et al 2002. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 43, 289-295.

Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M . (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol.*, 873–882.

Charbonneau, H. and Tonks, N. K. . (1992). 1002 protein phosphatases? . *Ann. Rev. Cell Biol.* 8, 463–493.

Cheng, Y-S.E. et al. (1991). Interferon-induced guanylate binding proteins lack an N(T)KXD consensus motif and bind GMP in addition to GDP and GTP. *Mol. Cell. Biol.* 11, 4717–4725.

Choudhry A, Guru PY, Saxena RP, Tandon A, Saxena KC. (1990). Enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of kala-azar in Bhadohi (Varanasi), India. . *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84, 363–366.

Contreras, A., Hidalgo, C., Henschke, P.A., Chambers, P.J., Curtin, C., Varela, C., (2014). Evaluation of non-Saccharomyces yeasts for the reduction of alcohol content in wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 1670–1678

Convit J, Ulrich M, Fernandez CT, Tapia FJ, Caceres-Dittmar G, Castes M, Rondon AJ (1993.). The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. . *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87, 444-448.

Cortes S, Rolão N, Ramada J, Campino L. (2004). PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l. specific kinetoplastid primers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98, 12-17.

Costa DN, Codeço CT, Silva MA, Werneck GL. 2013. Culling dogs in scenarios of imperfect control: realistic impact on the prevalence of canine visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 7(8):e2355.

Costa CH, Vieira JB 2001. Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 34: 223-228.

Couppie P, Clyti E, Sobesky M, Bissuel F, Del Giudice P, Sainte-Marie D, Dedet JP, Carne B, Pradinaud R (2004). Comparative study of cutaneous leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients and non-HIV-infected patients in French Guiana. *The British journal of dermatology*, 151, 1165-1171.

Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C 2002. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: Why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis* 186: 1314-1320.

Cuba CC, Netto EM, Costa JLM, Barreto AC, Marsden PD . (1986.). El cultivo ``in vitro`` como instrumento practico para el diagnostico y aislamiento primário de *Leishmania braziliensis braziliensis*. 2 estudios en pacientes de areas endemicas. *Rev. Inst. Med. Trop, S. Paulo*, 79-83.

Cupolillo E. (2005). Avanços dos estudos moleculares de *Leishmania* (*Leishmania*) chagasi aplicados ao diagnóstico de LV no Brasil. Consulta de expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral em las Américas. . Brasilia, DF, Brasil.

Da Costa CA, Genaro O, De Lana M, Magalhães PA, Dias M, Michalick MS, Melo MN, Da Costa RT, Magalhães-Rocha NM, Mayrink W 1991. Canine Visceral Leishmaniasis: evaluation of the serologic method used in epidemiologic studies. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 24(1):21-25

Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. (2006). Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting the paradigms of epidemiology and control. . *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 48 (3), 151-156.

D. A. Kafetzis and H. C. Maltezou, “Visceral leishmaniasis in paediatrics,” *Current Opinion in Infectious Diseases*, vol. 15, no. 3, pp. 289–294, 2002.

Deane LM, Deane MP. 1955. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa *Lycalopex vetulus* como reservatórios da *L. donovani* em área endêmica da calazar no Ceará. *Hospital*. 48: 61-70

Desjeux. (2004a). Leishmaniasis. *Nature reviews*, p. 629.

Desjeux P. (2004b.). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 27, 305-318.

Desjeux P. (1996). Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clinics in dermatology*, 14, 417-423.

Dey A, Singh S . (2006). Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature. . *Indian J Med Microbiol*. 24(3), 165-70.

Dietze R 2005. Diagnóstico sorológico e parasitológico da leishmaniose visceral. In Consulta de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis visceral en las Américas. Organización Panamericana de la Salud, Rio de Janeiro, p. 63-65.

Dosztányi Z, Csizmok V, Tompa P, Simo I. (2005). IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. . *Bioinformatics* 21(16), 3433-4.

El Hajj L, Thellier M, Carriere J, Bricaire F, Danis M, Caumes E. (2004). Localized cutaneous leishmaniasis imported into Paris: a review of 39 cases. . *Int J Dermatol*; 43, 120e5.

Elde NC, Malik HS. (2009). The evolutionary conundrum of pathogen mimicry. . *Nature reviews. Microbiology*, 7, 787-797.

El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, Caler E, Renauld H, Worthey EA, Hertz-Fowler C, Ghedin E, Peacock C, Bartholomeu DC, Haas BJ, Tran A-N, Wortman JR, Alsmark UCM, Angiuoli S, Anupama A, Badger J, Bringaud F, Cadag E, Carlton JM, Cerqueira GC, Creasy T, Delcher AL, Djikeng A, Embley TM, Hauser C, Ivens AC, Kummerfeld SK, Pereira-Leal JB, Nilsson D, Peterson J, Salzberg SL, Shallom J, Silva JC, Sundaram J, Westenberger S, White O, Melville SE, Donelson JE, Andersson B, Stuart KD, Hall N 2005. Comparative Genomics of Trypanosomatid Parasitic Protozoa. *Science* 309: 404–409.

Eugene V. Koonin, Michael Y. Galperin (2002) *Sequence-Evolution-Function: Computational Approaches in Comparative Genomics*. Kluwer Academic Publishers

Evans TG, Vasconcelos IA, Lima JW, Teixeira JM, McAullife IT, Lopes UG et al.1990. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assessment of serodiagnostic methods. *Am J Trop Med Hyg*. 42:118–123.

Evans D . (1989). Handbook on Isolation Characterization and Cryopreservation of *Leishmania*. *World Health Organization*, (p. 45). Geneva.

Ezra N, Ochoa MT, Craft N. 2010. Human immunodeficiency virus and leishmaniasis. *J Glob Infect Dis* 2: 248–257.

Faria AR, Costa MM, Giusta MS, Grimaldi Jr G, Penido ML, Gazzinelli RT, Andrade HM 2011. High-Throughput Analysis of Synthetic Peptides for the Immunodiagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis. *Plos Negl. Trop. Dis.* 5(9): e1310.

Fernández-Robledo JA and Vasta GR . (2010). Production of recombinant proteins from protozoan parasites. *Trends in Parasitology*, vol. 26, 5.

Ferreira EC, Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, Silva ES, Schallig H, Gontijo CMG. 2007. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations *Vet Parasitol* 146: 235-241.

Ferreira A, Ituassu L, Melo M, Andrade A. (2008.). Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. . *Vet. Parasitol.*152, 257-263.

Field H, Farjah M, Pal A, Gull K, Field MC. Complexity of trypanosomatid endocytosis pathways revealed by Rab4 and Rab5 isoforms in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem.* 1998;273:32102–32110.

Fietto JL, et al. (2004) Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. *Can J Microbiol*50(8):615-21

Figueiro-Filho EA, Duarte G, El-Beitune P, et al. . (2004). Visceral leishmaniasis (kala-azar) and pregnancy. *Infect Dis Obstet Gynecol; 12(1)*, 31–40.

Filippin FB, Souza LC. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *Rev. Bras. Ciências farmacêuticas. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 42, n° 02, abr./ jun.,2006.

Fisa R, Riera C, Gállego M, Manubens J, Portús M. (2001). Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. . *Vet. Parasitol.* 99, 105-111.

Fonseca, AM (2013). Diagnóstico da leishmaniose visceral utilizando proteínas de *Leishmania infantum* com função desconhecida. Tese, Universidade Federal de Minas Gerais.

Fonseca, LL (2015) The role of the AIM2 inflammasome in *Leishmania amazonensis* infection. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Garg R, Dube A. (2006.). Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *The Indian Journal of Medical Research.* 123 (3), pp. 439-454.

Gerhard Krauss (2008). *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, 5th Edition

Ghosh Dastidar B, Neogy A, Nandy A . (1983). Serologic studies in kala-azar and post kala-azar dermal leishmaniasis. In: *Proceedings of the Indo-UK workshop of leishmaniasis. New Delhi: Indian Council of Medical Research*, 138:43.

Gontijo B, Carvalho M. (2003). Leishmaniose tegumentar Americana. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 71-80.

Gontijo B, d. C. (2003). [American cutaneous leishmaniasis]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36, 71-80.

Gontijo B, de Carvalho M de L. (2003). American cutaneous leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36, 71-80.

Gontijo CMF, Melo MN. (2004). Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. . *Rev. bras. epidemiol.* 7(3), 338-349.

Gradoni L. (2002). The diagnosis of canine leishmaniasis. Canine leishmaniasis: moving towards a solution. . In: *Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Intervet International by*, (pp. 7-14). Sevilha.

Gradoni L, Gramiccia M 2008. Leishmaniosis. In: *OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees)*, Office International des Epizooties, Paris. 1: 240–250.

Gramiccia M . (2011). Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. . *Veterinary Parasitology* 181, 23-30.

Grevelink SA, Lerner EA . (1996). Leishmaniasis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 34, 257–72.

Grimaldi G, Schottelius J . (2001). Leishmaniasis--their relationships to monoxenous and dixenous trypanosomatids. . *Med. Microbiol. Immunol.* 190, 3–8.

Grimaldi G Jr, Teva A, Ferreira AL, dos Santos CB, Pinto Id, de-Azevedo CT, Falqueto A 2012. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 106(1):54-9.

Grogl, M.; Thomason, TN.; Franke, ED. . (1992.). Drug resistance in leishmaniasis: its implications in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.47, 117-126.

Haldar JP, Ghose S, Saha KC, Ghose AC. (1983). Cell-mediated immune response in Indian kala-azar and post kala-azar dermal leishmaniasis. *Infect. Immun.* 42, 702-7.

Hall A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*. Jan 23;279(5350):509–514

- Haller, O. and Kochs, G. (2000). Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. . *Traffic* 3, 710–717.
- Handa M¹, Guidotti G. 1996. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem Biophys Res Commun.* 218(3):916-23.
- Harith A, Salappendel R, Reiter L, Knapen F, Korte P, Huigen E, Kolk R. (1989). Application of a direct agglutination test for detection of specific-Leishmania antibodies in the canine reservoir. . *J.Clin. Microbiol.* 27, 2252-2257.
- Harms G, Schonian G, Feldmeier H. (2003). Leishmaniasis in Germany. . *Emerg Infect Dis*;9, 872e5.
- Harrison P, et al. (2002) A small reservoir of disabled ORFs in the yeast genome and its implications for the dynamics of proteome evolution. *J Mol Biol* 316(3):409-19
- Herwaldt BL. 1999. Leishmaniasis. *Lancet.* 354: 1191–99.
- Hicks-Berger CA, Chadwick BP, Frischauf A-M, Kirley TL (2000) Expression and characterization of soluble and membrane-bound human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (CD39L2). *J Biol Chem* 275:34041–34045
- Ho EA, Soong TH, Li Y 1948. Comparative merits of sternum, spleen and liver punctures in the study of human visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 41: 629–636.
- Holtmeier W, Kabelitz D. Gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses. *Chem Immunol Allergy* 2005; 86:151- 83.
- Hotez PJ, Remme JH, Buss P, Alleyne G, Morel C, Breman JG. (2004). Combating tropical infectious diseases: report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. . *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Disease.*
- Ikonomopoulos J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, Gorgoulis VG 2003. Molecular diagnosis of leishmaniasis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the propose assay on clinical samples. *Veterinary Parasitology.* 113: 99-113
- Iqbal J, Hira PR, Saroj G, Philip R, Al-Ali F, Madda PJ, Sher A 2002. Imported visceral leishmaniasis: diagnostic dilemmas and comparative analysis of three assays. *J. Clin. Microbiol.* 40: 475–479.
- Indiani de Oliveira C, Teixeira MJ, Teixeira CR, Ramos de Jesus J, Bomura Rosato A, Santa da Silva J, Brodskyn C, Barral-Netto M, Barral A 2004. *Leishmania braziliensis* isolates differing at the genome level display distinctive features in BALB/c mice. *Microbes and infection / Institut Pasteur,* 6, 977-984.

Jia Y, et al. (1997) A basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription complex in yeast functions in a signaling pathway from mitochondria to the nucleus. *Mol Cell Biol* 17(3):1110-7

Kumar R, Pai K, Pathak K, Sundar S 2001. Enzyme-linked immunosorbent assay for recombinant K39 antigen in diagnostic and prognosis of Indian visceral leishmaniasis. *Clin. Dagn. Lab. Immunol.* 8, 1220-1224.

Lladró S, Picado A, Ballart C, Portús M, Gállego M. (2017) Management, prevention and treatment of canine leishmaniosis in north-eastern Spain: an online questionnaire-based survey in the province of Girona with special emphasis on new preventive methods (CaniLeish vaccine and domperidone) *Veterinary Record* 180, 47.

Lal K, Field MC, Carlton JM, Warwicker J, Hirt RP. Identification of a very large Rab GTPase family in the parasitic protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol.* 2005;143:226–235

Lainson R, Rangel EF. 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 100(8): 811-827.

Lainson R, Shaw JJ. (2010). *New World Leishmaniasis*. Acesso em Junho de 2015, disponível em <http://www.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470688618.taw0182>

Lainson, R. (1989). Demographic changes and their influence on the epidemiology of the American leishmaniasis. *Demography and Vector-Borne Diseases (MW Servicee, ed.)*, pp. 85-106.

Lainson R, Shaw JJ. 1978. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. *Nature.* 22(273):595-600

Lakhal-Naouar I, Boussoffara T, Meddeb-Garnaoui A, Ben Achour-Chenik Y, Louzir H, Chenik M. (2009). Cellular and humoral responses to *Leishmania major* virulence factors in healed cutaneous leishmaniasis and Mediterranean visceral leishmaniasis patients. *Clin Vaccine Immunol.*, 956-8.

Larsen JE, Lund O, Nielsen M 2006. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome research*, 2, 2.

Laufs H, Müller K, Fleischer J, Reiling N, Jahnke N et al. 2002. Intracellular Survival of *Leishmania major* in Neutrophil Granulocytes after Uptake in the Absence of HeatLabile Serum Factors. *Infec Immun.* 70 (2): 826–835.

Lemos, LCD (2014) Expressão Heteróloga da rKDDR de *Leishmania infantum*: um novo antígeno recombinante para o diagnóstico da leishmaniose visceral. Dissertação, Universidade Federal de Minas Gerais

Leonard DA, Satoskar RS, Wu WJ, Bagrodia S, Cerione RA, Manor D. (1997) Use of a fluorescence spectroscopic readout to characterize the interactions of Cdc42Hs with its target/effecter, mPAK-3. *Biochemistry.* 1997 Feb 4;36(5):1173–1180.

Luján R, Nusser Z, Roberts JD, et al. Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 1996; 8:1488–1500.

Levano-Garcia J, Mortara RA, Verjovski-Almeida S, DeMarco R 2007. Characterization of *Schistosoma mansoni* ATPDase2 gene, a novel apyrase family member. *Biochem Biophys Res Commun* 352: 384-389.

Loeffler, I.Kata & Bennett James L. A rab-related GTP-binding protein in *Schistosoma mansoni* *Molecular and Biochemical Parasitology*, Volume 77, Issue 1, Pages 31-40

Maia C, Campino L. 2008. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol.* 158, 274–287.

Maia-Elkhoury A, Alves W, Sousa-Gomes M, Sena J, Luna E. 2008. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saú Públ.* 24 (12): 2941-2947.

Maliszewski CR, Delespesse GJ, Schoenborn MA, Armitage RJ, Fanslow WC, Nakajima T, Baker E, Sutherland GR, Poindexter K, Birks C, et al. (1994) The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. *J Immunol* 153:3574–3583.

Mansueto P, et al. (2014). Leishmaniasis in travelers: A literature review,. *Travel Medicine and Infectious Disease.*

Marinkelle CJ. 1980. The control of leishmaniasis. *Bull World Health Organ.* 58(6):807- 818.

Marzochi, M. (1992). Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares. . *Jornal Brasileiro de Medicina*, pp. 82-104.

Marzochi MC, Marzochi KB 1994. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cadernos de saude publica / Ministerio da Saude, Fundacao Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saude Publica*, 10 Suppl 2, 359-375.

Mendes F, et al. (2013) Transcriptome-Based Characterization of Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in Lactose-Grown Chemostat Cocultures. *Appl Environ Microbiol* 79(19):5949-61

Menezes-Souza D, Mendes TA, Gomes Mde S, Reis-Cunha JL, Nagem RA, Carneiro CM, Coelho EA, Galvão LM, Fujiwara RT, Bartholomeu DC. (2014). Epitope mapping of the HSP83.1 protein of *Leishmania braziliensis* discloses novel targets for immunodiagnosis of tegumentary and visceral clinical forms of leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol.*, 949-59.

Menezes-Souza D., Mendes T. A., Nagem R. A. et al., (2014) “Mapping B-cell epitopes for the peroxidoxin of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and its potential for the clinical diagnosis of tegumentary and visceral leishmaniasis,” *PLoS ONE*, vol. 9, no. 6, Article ID e99216.

Menezes-Souza D, de Oliveira Mendes TA, de Araújo Leão AC, de Souza Gomes M, Fujiwara RT, Bartholomeu DC. (2015). Linear B-cell epitope mapping of MAPK3 and MAPK4 from *Leishmania braziliensis*: implications for the serodiagnosis of human and canine leishmaniasis. *Appl Microbiol Biotechnol.* , 1323-36.

Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento (2016), coordenação de fiscalização de produtos veterinários-dfip-sda - CPV NOTA TÉCNICA Nº11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA

Ministério da Saúde. (s.d.). *Vigilancia Saude Zoonoses*. Acesso em março de 2016, disponível em Ministério da Saúde: bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_saude_zoonoses

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, Brasília, Brasil, 120 p., 2006.

Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andrés M, González F, Castillo JA et al. 1994. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 88 (4): 491-3.

Montenegro J 1926. Cutaneous reactions in leishmaniasis. *Arc. Dermatol. Syph.* 13:187.
Müller K, van Zandbergen G, Hansen B, Laufs H, Jahnke N, Solbach W et al. 2001. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. *Med Microbiol Immunol.* 190 (1-2):73-6.
Navin TR, Arana FE, de Merida AM, Arana BA, Castillo AL, Silvers DN. (1990). Cutaneous leishmaniasis in Guatemala: comparison of diagnostic methods. *Am J Trop Med Hyg* 42, 36e42.

Neel, BG and Tonks, NK. (1997). Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* , 193-204.

Nelson, DE, Virok, H. Wood, C. Roshick, RM. Johnson, WM. Whitmire, DD. Crane, O. Steele-Mortimer, L. Kari, G. McClarty, and H. D. Caldwell. (2005). Chlamydial IFN-gamma immune evasion is linked to host infection tropism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 10658.

Neves SR, Ram PT, Iyengar R. (2002). G protein pathways. . *Science.* 296(5573), 1636-9.

Odiwuor, S., Vuylsteke, M., De Doncker, S., Maes, I., Mbuchi, M., Dujardin, J.C., Van der Auwera, G., 2011. *Leishmania* AFLP: paving the way towards improved molecular assays and markers of diversity. *Infect. Genet. Evol.* 11:960–7.

OLIVEIRA, Fernanda Muller de. Morcegos como hospedeiros de *Leishmania* spp. em área endêmica para leishmaniose visceral. 2012. 54 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, 2012. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/88166>>.

Oliveira GG, Magalhães FB, Teixeira MC, Pereira AM, Pinheiro CG, Santos LR et al. 2011. Characterization of novel *Leishmania infantum* recombinant proteins encoded by

genes from five families with distinct capacities for serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 85(6):1025-34

Oskam L, Nieuwenhuijs JL, Hailu A . (1999). Evaluation of the direct agglutination test (DAT) using freeze-dried antigen for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in stored sera from various patient groups in Ethiopia. . *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93, 275-277.

Oskam L, Nieuwenhuijs JL, Hailu A. (1999.). Evaluation of the direct agglutination test (DAT) using freeze-dried antigen for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in stored sera from various patient groups in Ethiopia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*

Pavli A, Maltezou HC. (2010). Leishmaniasis: an emerging infection in travelers. *Int. J of Infect Dis.* 14, 1032-1039.

Ana C. S. Otero, Valdemir O. da Silva, Kleber G. Luz, Marcos Palatnik, Claude Pirmez, Octavio Fernandes, and Clarisa B. Palatnik de Sousa.

Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, Peters N, Adlem E, Tivey A, Aslett M, Kerhornou A, Ivens A, Fraser A, Rajandream MA, Carver T, Norbertczak H, Chillingworth T, Hance Z, Jagels K, Moule S, Ormond D, Rutter S, Squares R, Whitehead. (2007). Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature genetics*, 39, 839-847.

Pearson RD, Sousa AQ. (1996). Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 22, 1-13.

Perez-Ayala A, Norman F, Perez-Molina JA, Herrero JM, Monge B, Lopez-Velez R. (2009). Imported leishmaniasis: a heterogeneous group of diseases. . *J Travel Med* , 395-401.

Pessôa SM. (1982). *Parasitologia Médica.* . Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Peters N, Sacks D. (2006.). Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. . *Immunological Reviews.* 213, 159–179.

Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S et al. 2008. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science.* 321(5891):970-4.

Piarroux R, Gambarelli F, Dumon H, Fontes M, Dunan S, Mary C, Toga B, Quilici M 1994. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture and serology for diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* 32: 746-749.

Pinheiro PH, Pinheiro AN, Ferreira JHL, Costa FA, Katz S, Barbiéri CL. 2009. A recombinant cysteine proteinase from *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* as an antigen for delayed-type hypersensitivity assays and serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.*162:32–39.

Plesner, L. (1995). Ecto-ATPases: identities and functions. . *Int. Rev. Cytol.* 158, 141±214.

Porrozzi R, Costa MV, Teva A, Falqueto A, Ferreira A, Santos CD et al. 2007. 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. *Clin Vacc Immunol.* 14 (5): 544–548.

Proietti ABFC, Lopes MSN, Urias EVR. Outras doenças infecciosas transmissíveis pelo sangue. In: Bordin José O, Langli Junior, Dante M, Covas Dimas T. Hemoterapia Fundamentos e prática. 1ª edição. São Paulo:Atheneu; 2007; p. 525-31.

Queiroz NM, Assis J, Oliveira TM, Machado R, Nunes C, Starke-Buzetti W. 2010. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. *Rev Bras Parasitol Vet.* 19(1):32-38

Quintella LP, Cuzzi T, Madeira MF, Okamoto T, Schubach AO. (2009). Immunoperoxidase technique using an anti-*Leishmania(L.) chagasi* hyperimmune serum in the diagnosis of culture-confirmed American tegumentary leishmaniasis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 51, 83-86.

Rajasekariah GH, Ryan JR, Hillier SR, Yi LP, Stiteler JM, Cui L, Smithyman AM, Martin SK . (2001a.). Optimisation of an ELISA for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis using in vitro derived promastigote antigens. . *J. Immunol. Methods* 252, 105–119.

Ramos-Vara JA, Kiupel M, Baszler T, Bliven L, Brodersen B, Chelack B, Czub S, Del Piero F, Dial S, Ehrhart EJ, Graham T, Manning L, Paulsen D, Valli VE, West K. (2008). Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laborato. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20, 393-413.

Rannikko K, Ortutay C, Vihinen M 2007. Immunity genes and their orthologs: a multi-species database. *International immunology*, 19, 1361-1370

Rosário EY, Genaro O, França-Silva JC, da Costa RT, Mayrink W, Reis AB. 2005. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*100(2): 197-203

Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, FrancaSilva JC, Giunchetti RC, Genaro O, Correa-Oliveira R 2006a. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci* 81: 68-75.

Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Vale AM, Marques MJ, Giunchetti RC, Mayrink W, Guerra LL, Andrade RA, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA 2006b. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol* 112: 102-116.

Reithinger R, Davies CR . (1999). Is the domestic dog (*Canis Familiaris*) a reservoir host of american Cutaneous Leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61(4), 530–541.

Reithinger R, Quinnell R, Alexander B, Davies C 2002. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2352-2356.

Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S . (2007). Cutaneous leishmaniasis. . *The Lancet infectious diseases*, 7, 581-596.

Rezende-Soares, F., Carvalho-Campos, C., Marques, M., Porcino, G., Giarola, N., Costa, B., Vasconcelos, E. (2010). Cytochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes and identification of an antigenic and catalytically active isoform. *Parasitology*, 773-783.

Ritmeijer K, Melaku Y, Mueller M, Kipnetich S, O'keeffe C, Davidson RN . (2006.). Evaluation of a new recombinant K39 rapid diagnostic test for Sudanese visceral leishmaniasis. . *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74, 76–80.

Roach, P. J. (1991). Multisite and hierarchal protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 266, 14139– 14142.

Rocha RM, Miller K, Soares F, Vassalo J, Schenka N, Gobbi H. (2009). The use of the immunohistochemical biotin-free visualization systems for estrogen receptor evaluation of breast câncer. *Applied Cancer Research.*29(3), 112-117.

Rodríguez-Cortés A, Ojeda A, Francino O, López-Fuertes L, Timón M, Alberola J 2010. Leishmania Infection: Laboratory Diagnosing in the Absence of a “Gold Standard”. *Am J Trop Med Hyg* 82: 251-256.

Romero G, Boelaert M. 2010. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America—A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis.* 4(1) e584.

Romero HD, Silva L de A, Silva-Vergara ML, Rodrigues V, Costa RT, Guimarães SF, Alecrim W, Moraes-Souza H, Prata A. (2009). Comparative Study of Serologic Tests for the Diagnosis of Asymptomatic Visceral Leishmaniasis in an Endemic Area. . *Am J Trop Med Hyg* 81, 27-33.

Ross. (1903). Further Notes on Leishman's Bodies. *British medical journal*.

Ross R . (1903a). Further Notes on Leishman's Bodies. . *British medical journal*, 2, 1401.

Ross R . (1903b). Note on the Bodies Recently Described by Leishman and Donovan. *British medical journal*, 2, , 1261-1262.

Ryan JR, Smithyman AM, Rajasekariah G-H, Hochberg L, Stiteler JM, Martin SK. (2002). Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen

detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. . *J. Clin. Microbiol.* 40, 1037–1043.

Sacks D, Noben-Trauth N . (2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. . *Nat. Rev. Immunol.* 2 (11), 845-58.

Sacks D, Noben-Trauth N 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2:845-858

Salinas G, Valderrama L, Palma G, Montes G, Saravia NG. (19889). Detección de amastigotes em leishmaniasis cutânea y mucocutanea por el método de inmunoperoxidasa, usando anticuerpo policlonal: sensibilidade y especificidade comparadas com motodos convencionales de diagnostico. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 84:, 53-60.

Sampaio RNR, Andrade GB, Pereira AC, Silva EA, Cuba CA. (2002). Estudo comparativo de técnicas de demonstração de amastigotas e isolamento de promastigotas no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana .: *An bras Dermatol, Rio de Janeiro*, 77(5), 557-561.

Sarkis, J.J.F., Battastini, A.M.O., Oliveira, E.M., Frassetto, S.S., Dias, R.D.(1995). ATP diphosphohydrolase: an overview. *J. Braz. Assoc. Adv. Sci.* 47, 131±6.

Saul J, Semiao S,. (1996.). Canine visceral leishmaniasis in Evora district. . *In: Protogal: A Seroepidemiological Study.* (pp. 9–74.). Amsterdam.: ACP/Academic Press.

Scarisbrick JJ, C. P. (2006). Clinical features and diagnosis of 42 travellers with cutaneous leishmaniasis. *Travel Med Infect Dis* , 14e21.

Schaefer KU, Kurtzhals JA, Gachihi GS, Muller AS, Kager PA 1995. A prospective sero-epidemiological study of visceral leishmaniasis in Baringo District, Rift Valley Province, Kenya. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 89: 471–475.

Schraner C, H. B. (2005). Successful treatment with miltefosine of disseminated cutaneous leishmaniasis in a severely immunocompromised patient infected with HIV-1. . *Clin. Infect. Dis.*40:, 120-4.

Sefton, B. M., Hunter, T., Ball, E. H., and Singer, S. J. . (1981). Vinculin: a cytoskeletal target of the transforming protein of Rous sarcoma virus. . *Cell* 24, 165–174.

Shafiei R, Mohebalı M, Akhoundi B, Galian MS, Kalantar F, Ashkan S, et al. (2014). Emergence of co-infection of visceral leishmaniasis in HIV-positive patients in northeast Iran: a preliminary study. . *Travel Med Infect Dis*;12:, 173e8.

Sherlock IA . (1996). Ecological interactions of visceral leishmaniasis in Bahia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 91, 671-683.

Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi Jr G. (1984.). Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. . *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 79 (4), 511.

Shio M T, Eisenbarth S C, Savaria M et al., “Malarial hemozoin activates the NLRP3 inflammasome through Lyn and Syk kinases,” *PLoS Pathogens*, vol. 5, no. 8.

Siddig M, Ghalib H, Shillington DC, Petersen EA . (1988.). Visceral leishmaniasis in the Sudan: comparative parasitological methods of diagnosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82(1), 66-8.

Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS, Brazil RP. (2004). Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. . *Genetics and Molecular Research* 2, 251-257.

Silveira FT, Lainson R, Corbett CE . (2004). Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99, 239-251.

Singh S, Sivakumar R . (2003). Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. . *J. Postgrad. Med.* 49(1), 55-60.

Singh, S. B., A. S. Davis, G. A. Taylor, and V. Deretic. (2006.). Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science* 313:, 1438– 1441.

Stephen R. Sprang. (1997) G PROTEIN MECHANISMS: Insights from Structural Analysis *Annual Review of Biochemistry* Vol. 66:639-678

Srivastava, P., Mehrotra, S., Tiwary, P., Chakravarty, J., Sundar, S., 2011. Diagnosis of Indian visceral leishmaniasis by nucleic acid detection using PCR. *PLoS One*. 29, 6:e19304. doi: 10.1371/journal.pone.0019304.

Srivastava P, Mehrotra S, Tiwary P, Chakravarty J, Sundar S (2011). Diagnosis of Indian visceral leishmaniasis by nucleic acid detection using PCR. *PLoS One* 6:e19304.

Stertz, S., Reichelt, M., Krijnse-Locker, J., Mackenzie, J., Simpson, J.C., Haller, O., and Kochs, G. (2006). Interferon-induced, antiviral human MxA protein localizes to a distinct subcompartment of the smooth endoplasmic reticulum. *J. Interferon Cytokine Res.* 26, 650–660.

Strauss-Ayali D, Jaffe C, Burshtain O, Gonen L, Baneth G . . (2004). Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. . *J. Infect. Dis.* 189,, 1729-1733.

Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gürtler RE, McKerrow J, Reed S, Tarleton R . (2008.). Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *Journal of Clinical Investigation* 118, 1301–1310.

Sundar S, Rai M. 2002. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Clin Diag Lab Immunol.* 9 (5): 951–958.

Tafuri WL, Santos RL, Arantes RM, Gonçalves R, De Melo MN, Michalick MS, Tafuri WL . (2004.). An alternative immunohistochemical method for detecting

Leishmania amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. . *J. Immunol. Methods.* 292(1-2), 17-23.

Takai, Y. et al. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol. Rev.* 81,, 153–208.

Tália Santana Machado de Assis e colaboradores (2008). Validação do teste rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. *Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília, 17(2):107-116.

Tavares CAP, Fernandes AP, Melo MN (2003). Molecular diagnosis of leishmaniasis. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 3, 657-667.

Taylor, G. A., C. G. Feng, and A. Sher. . (2004). p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 100–109.

Taylor, G.A. et al. ((2004)). P47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. . *Nat. Rev. Immunol.* 4, 100–109.

Taylor, G.A. et al. . (1997). The inducibly expressed GTPase localizes to the endoplasmic reticulum, independently of GTP binding. . *J. Biol. Chem.* 272,, 10639–10645.

Tolezano JE, Macoris SA, Dinis JMP. (1980). Modificação na epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Vale da Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. . *Revista do Instituto Adolfo Lutz.* 40:, 49-54.

Tizard IR (2009). Veterinary immunology: an introduction. 8th ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 574p.

Tonks, N. K. and Neel, B. G. . (1996). From form to function: signaling by protein tyrosine phosphatases. *Cell* 87, 365–368.

Turetz ML, Machado PR, Ko AI. (2002). Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. . *J. Infect. Dis.* 186, 1829-34.

Ushiro, H. and Cohen, S. (1980.). Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A– 431 cell membranes. . *J. Biol. Chem.* 255, 8363– 8365.

Uthaiyah, R.C. et al. . (2003). IIGP1, an interferon-g-inducible 47-kDa GTPase of the mouse, showing cooperative enzymatic activity and GTP-dependent multimerization. . *J. Biol. Chem.* 278, 29336–29343.

Van der Meide WF, Schoone GJ, Faber WR, Zeegelaar JE, De Vries HJC, Ozbel Y, Lai a Fat RFM, Coelho LIARC, Kasi M, Shallig HDFH. (2005). Quantitative nucleic acid sequence-based assay as a new molecular tool for detection and quantification of Leishmania parasites in skin biopsy samples. . *J. Clin. Microbiol.* 43(11), 5560-5566.

Van der Auwera, G., Ravel, C., Verweij, J.J., Bart, A., Schönian, G., Felger, I., 2014. Evaluation of four single-locus markers for Leishmania species discrimination by sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 52,1098-104.

Van Lochem EG, Van der Velden VHJ, Wind HK, Te Marvelde JG, Westerdaal NAC, Van Dongen JJM. (2004) Immunophenotypic Differentiation Patterns of Normal Hematopoiesis in Human Bone Marrow: Reference Patterns for Age-Related Changes And Disease-Induced Shifts. *Cytometry – Part B Clinical Cytometry*; 60B:1-13.

Vasconcelos, E.G., Ferreira, S.T., Carvalho, T.M.U., De Souza, W., Kettlun, A.M., Mancilla, M., Valenzuela, M.A., Verjovski-Almeida, S. (1996). Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* 36, 22139±45.

Vasconcelos, E.G., Nascimento, P.S., Meirelles, M.N.L., Verjovski- Almeida, S., Ferreira, S.T., (1993). Characterization and localization of an ATP diphosphohydrolase on the external surface of tegument of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 58, 2005-14.

Vasconcellos SEG, Acosta CC, Gomes LL, Conceição EC, Lima KV, et al. (2014) Strain Classification of Mycobacterium tuberculosis Isolates in Brazil Based on Genotypes Obtained by Spoligotyping, Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Typing and the Presence of Large Sequence and Single Nucleotide Polymorphism. *PLoS ONE* 9(10): e107747

Vera LA, Santos JB, Macêdo VO, Magalhães AV, Ciuffo IA, Santos CG . (2001.). Avaliação da influência da infecção bacteriana secundária na evolução da leishmaniose cutânea em Corte de Pedra, Bahia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 34(3), 233-237.

Vetter, I.R. and Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotidebinding switch in three dimensions. *Science* 294,, 1299–1304.

Voller A, Bidwell DE, Barlett A (1976). Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull. World Health Organ.* 53: 55-65.

Walton, K. M. and Dixon, J. E. (1993). Protein tyrosine phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 101–120.

Weitzel T, Muhlberger N, Jelinek T, Schunk M, Ehrhardt S, Bogdan C, et al. . (2005). Imported leishmaniasis in Germany 2001e2004: data of the SIMPID surveillance network. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis e Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*;24, 471e6.

Wen L, Roberts SJ, Viney JL, Wong FS, Mallick C, Findly RC (1994). Immunoglobulin synthesis and generalized autoimmunity in mice congenitally deficient in alpha beta(+) T cells. *Nature*; 369:654-8

WHO - World Health Organization. (s.d.). *WHO*. Acesso em 4 de janeiro de 2016, disponível em World Health Organization: http://www.who.int/Leishmaniasis/em_

WHO. (2014). *World Health Organization*. Acesso em 2016, disponível em World Health Organization: <http://www.who.int/tdr/diseases-topics/leishmaniasis/en/index.html>

WHO. (s.d.). *World Health Organization* . Acesso em Novembro de 2015, disponível em www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en

Wright NA, Davis LE, Aftergut KS, et al. (2008). Cutaneous leishmaniasis in Texas: a northern spread of endemic areas. *J Am Acad Dermatol* , 650–2.

Young, D. G. and M. A. Duncan. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem. Am. Entomol. Inst* 1994. 54:1–881

Yeung G, Mulero JJ, McGowan DW, Bajwa SS, Ford JE (2000) CD39L2, a gene encoding a human nucleoside diphosphatase, predominantly expressed in the heart. *Biochemistry* 39:12916–12923

Yokoyama K, et al. (1998) Overproduction of DnaJ in *Escherichia coli* improves in vivo solubility of the recombinant fish-derived transglutaminase. *Biosci Biotechnol Biochem* 62(6):1205-10

Zanette MF, Lima VMF de, Laurenti MD, Rossi CN, Vides JP, Vieira RF da C, Biondo AW, Marcondes M, Zanette MF, Lima VMF de, Laurenti MD, Rossi CN, Vides JP, Vieira RF da C, Biondo AW, Marcondes M. (2014). Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. . *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 47, 105–107.

Zhang Y, et al. (2002) Noc3p, a bHLH protein, plays an integral role in the initiation of DNA replication in budding yeast. *Cell* 109(7):849-60

Zijlstra EE, Ali MS, el-Hassan AM, el-Toum IA, Satti M, Ghalib HW, Kager PA. (1992). Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. . *Trans. R. Trop. Med. Hyg.* 86 (5), 505-7.

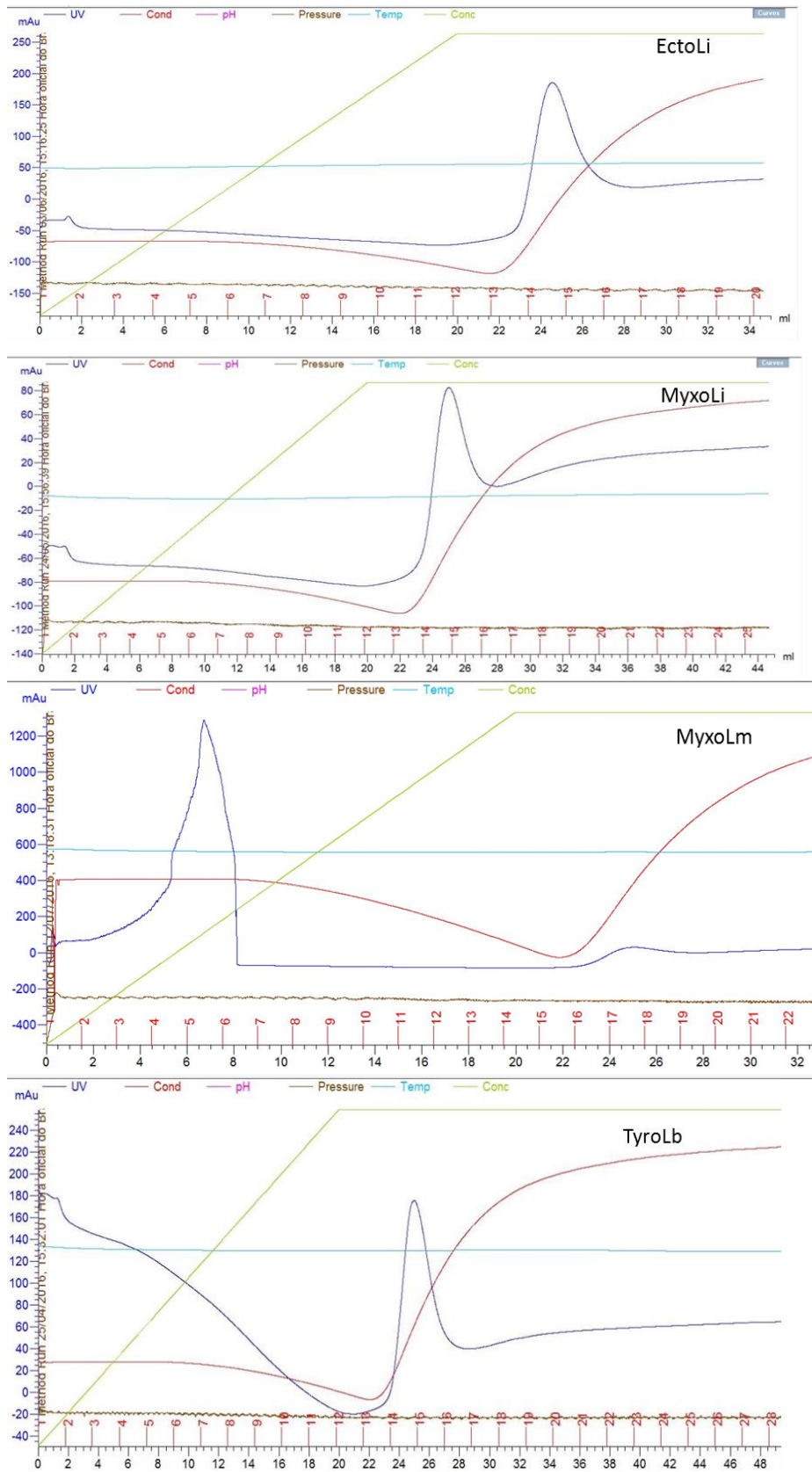
Zijlstra EE, Musa AM, Khalil EA, el-Hassan AM (2003). Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*, 3:87-98.

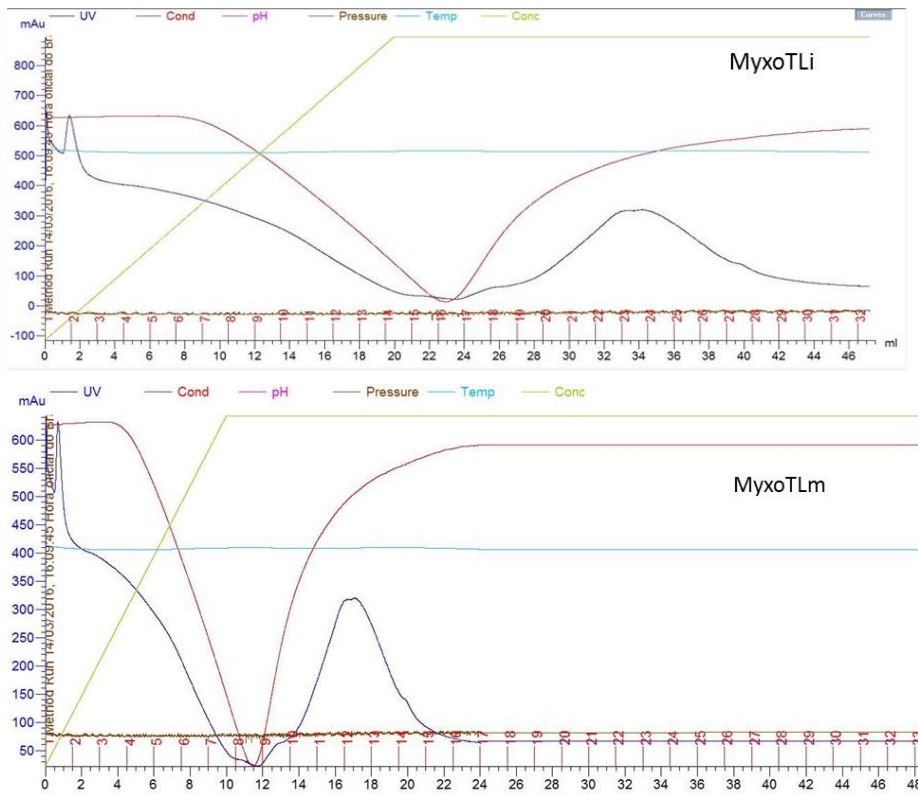
Zimmermann, H. (1996.). Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. . *Prog. Neurobiol.* 49, 589± 618.

Zimmermann, H., Braun, N., Kegel, B., Heine, P. (1998). New insights into molecular structure and function of ecto-nucleotidases in the nervous system. . *Neurochem. Int.* 32, 421±5.

10. ANEXOS

Anexo I - Purificação por cromatografia de afinidade das proteínas recombinantes





Purificação por cromatografia de afinidade das proteínas recombinantes LinJ.15.0030 (EctoLi), LinJ.29.2310 (MyxoLi e MyxoTLi) de *L. infantum*, LmxM.08_29.2200 (MyxoLm e MyxoTLM) de *L. mexicana* e LbrM.35.5630 (TyroLb) de *L. braziliensis*. No eixo das ordenadas está evidenciado a escala de valores em mili unidades de absorvância (mAu) de UV do material eluído da coluna de afinidade HisTrap HP de 5 mL. No eixo das abscissas, em preto está a quantidade de mL de tampão de eluição que passou pela coluna de afinidade, e em vermelho está o número das frações de 1,8 mL coletadas durante a purificação para a obtenção da proteína recombinante. A linha azul escura corresponde a absorvância em mAu do material eluído. A linha em verde corresponde à concentração de imidazol no tampão de eluição, que inicia com uma concentração de 30 mM e cresce em escala linear até atingir o platô em 500 mM. A linha em vermelho corresponde à condutância do tampão utilizado na eluição, que é correspondente a quantidade de sal na solução. A linha azul clara corresponde à temperatura do sistema. A linha em marrom corresponde à pressão do sistema. Acima de cada gráfico pode ser observado o código da proteína recombinante purificada.

Anexo II: Patentes geradas no projeto depositadas pelo CTIT junto ao INPI



14/03/2017 870170016848
16:31
00.000.2.2.16.0621597.8

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

Número do Processo: BR 10 2017 005135 8

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: Universidade Federal de Minas Gerais

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 17217985000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: Brasil

Telefone: (31) 34094774

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): "MÉTODO, KIT PARA DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSES E USO"

Resumo: A presente invenção trata de um método e kit para diagnóstico de leishmanioses em cães e humanos utilizando proteína recombinante desenvolvida a partir de técnica de imunogenômica, possibilitando alta especificidade na detecção de espécies do gênero Leishmania em amostras humanas ou caninas.



14/03/2017 870170016644
11:56
00.000.2.2.16.0621603.6

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

Número do Processo: BR 10 2017 005068 8

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: Universidade Federal de Minas Gerais

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 17217985000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: Brasil

Telefone: (31) 34094774

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

Anexo III: Patentes geradas em trabalhos de colaboração durante o doutorado

“PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE LEISHMANIA E USO EM KIT PARA DIAGNÓSTICO E VACINA CONTRA LEISHMANIOSES”.



WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION

Receipt of Electronic Submission

The Receiving Office (RO/IB) acknowledges the receipt of a PCT International Application filed using ePCT-Filing. An Application Number and Date of Receipt have been automatically assigned (Administrative Instructions, Part 7).

Submission Number:	060937		
Application Number:	PCT/IB2013/060937		
Date of Receipt:	13 December 2013		
Receiving Office:	International Bureau of the World Intellectual Property Organization		
Your Reference:	HSP-MAPK		
Applicant:	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG		
Number of Applicants:	2		
Title:	PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE LEISHMANIA E USO EM KIT PARA DIAGNÓSTICO E VACINA CONTRA LEISHMANIOSES		
Documents Submitted:			
	HSPMAPK-appb-000002.pdf (REIVINDICAÇÕES.pdf)	169419	13 December 2013 19:18:58
	HSPMAPK-requ.xml	10460	13 December 2013 19:18:58
	HSPMAPK-appb-000004.pdf (FIGURAS.pdf)	202205	13 December 2013 19:18:58
	HSPMAPK-appb-000003.pdf (RESUMO.pdf)	83965	13 December 2013 19:18:58
	HSPMAPK-fees.xml	1796	13 December 2013 19:18:58
	HSPMAPK-appb.xml	840	13 December 2013 19:18:58
	HSPMAPK-seq1-000001.zip (HSP-MAPK_ST25.zip)	549	13 December 2013 19:18:58
	HSPMAPK-appb-000001.pdf (relatorio.pdf)	253651	13 December 2013 19:18:58
	HSPMAPK-dpcf-000001.zip (Fee-reduction-information.zip)	32106	13 December 2013 19:18:58
	HSPMAPK-poa-000001.pdf (Power-of-attorney.PDF)	31576	13 December 2013 19:18:58

Mapping B-Cell Epitopes for the Peroxidoxin of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and Its Potential for the Clinical Diagnosis of Tegumentary and Visceral Leishmaniasis



Daniel Menezes-Souza¹, Tiago Antônio de Oliveira Mendes¹, Ronaldo Alves Pinto Nagem²,
Thaís Teodoro de Oliveira Santos¹, Ana Luíza Teixeira Silva¹, Marcelo Matos Santoro²,
Silvio Fernando Guimarães de Carvalho³, Eduardo Antônio Ferraz Coelho⁴,
Daniella Castanheira Bartholomeu¹, Ricardo Toshio Fujiwara^{1*}

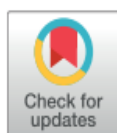
1 Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, **2** Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, **3** Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, Brazil, **4** Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina and Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil



RESEARCH ARTICLE

Safety evaluation of a vaccine: Effect in maternal reproductive outcome and fetal anomaly frequency in rats using a leishmanial vaccine as a model

Rafaienne Q. Moraes-Souza¹✉, Ana Paula Reinaque²✉, Thaigra S. Soares¹, Ana Luíza T. Silva², Rodolfo C. Giunchetti³, Maria A. S. Takano⁴, Milena A. Akamatsu⁴, Flávia S. Kubrusly⁴, Fernanda Lúcio-Macarini⁴, Isaias Raw⁴, Dmitri Iourtov⁴, Paulo Lee Ho⁴, Lillian L. Bueno², Ricardo T. Fujiwara², Gustavo T. Volpato^{1*}



1 Laboratory of System Physiology and Reproductive Toxicology, Institute of Biological and Health Sciences, Federal University of Mato Grosso (UFMT) - Barra do Garças, Mato Grosso State, Brazil, **2** Laboratory of Immunology and Genomics of Parasites, Department of Parasitology, Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais (UFMG) Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil, **3** Laboratory of Cell-Cell Interactions, Morphology Department, Institute of Biological Science, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **4** Division of Technological Development and Production (DDTP), Butantan Institute, São Paulo, Brazil