

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL
UTILIZANDO PROTEÍNAS DE *Leishmania infantum*
COM FUNÇÃO DESCONHECIDA

ALIANI MOURA FONSECA

Belo Horizonte
2013

Aliani Moura Fonseca

**DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL
UTILIZANDO PROTEÍNAS DE *Leishmania infantum*
COM FUNÇÃO DESCONHECIDA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Protozoologia

Orientadora: Profa Dra Héliida Monteiro de Andrade

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
2013

043 Fonseca, Aliani Moura.

Diagnóstico da leishmaniose visceral utilizando proteínas de leishmania infantum com função desconhecida [manuscrito] / Aliani Moura Fonseca. - 2013.

74 f.: il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Héli da Monteiro de Andrade.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Leishmania infantum. 2. Proteína recombinante. 3. Teste imunoenzimático - Teses. 4. Anticorpos - Teses. 5. Parasitologia - Teses. I. Andrade, Héli da Monteiro de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576.88/.89

Dedico este trabalho aos meus pais, Alysson
e Anidia, e ao meu irmão, Ailton.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A Deus, primeiramente, pela saúde física e emocional.

À minha família, por todo o alicerce necessário para chegar até aqui.

Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia, do departamento de Parasitologia/UFMG, pela oportunidade de aprendizado e desenvolvimento do presente trabalho.

À Professora Héliida Monteiro de Andrade, minha orientadora, pelo acolhimento, pela confiança e pelos sábios conselhos. Uma verdadeira mãe dos integrantes do Laboratório de Leishmanioses.

Aos parceiros do Laboratório de Leishmanioses, João Carlos, Elaine, Jordanna, Simone, Angélica, Ana Paula, Luciano, Aretha, Bruna, Júnior, André, Naiara, Mariana e Janaína, pela convivência diária amigável e fraterna. Ao Prof. Wilson Mayrink pelo exemplo de dedicação ao estudo das leishmanioses.

Ao Dr. João Carlos França da Silva e ao bioterista Manoel Carlos Afonso, pela ajuda com o manuseio dos coelhos.

À Prof. Daniella Castanheira Bartholomeu, ao mestrando João Luís Reis Cunha, ao Prof. Ronaldo Alves Pinto Nagem e ao doutorando Rubens Daniel Miserani Magalhães, pela colaboração no processo de produção das proteínas recombinantes.

À Prof. Maria Norma Melo, à Dra. Eloísa de Freitas e ao Dr. Gabriel Grimaldi pela doação dos soros caninos. À Dra. Eliane da FUNED pela doação dos soros humanos.

Aos amigos da turma do Pepino, os mestrandos Bruna Soares, Bruna Torres, Ana Luiza, Aytube, Carina, Érica, Fabiana, Frederico, João Luís, Júlia, Júnior, Kleber, Lívia, Luciana Laranjo, Luciana Lima, Soraia, Thaís e Thaisa, além dos doutorandos Carolin, Pedro e Vitor, que tornaram este mestrado inesquecível.

Aos amigos da turma Cabritos Mochileiros, Andrea, Karina, Leonardo, Letícia, Gabriel e Maria Augusta, que me acompanham desde a graduação, pelos momentos de grande alegria.

Ao Beto, meu namorado, pelo carinho.

Às minhas amigas de infância, Izabella, Staël e Nicolle, pela presença constante na minha vida. Às outras amigas, Ana Celeste, Laura e Denise, pelo companheirismo.

Aos demais amigos da UFMG, Fernandes, Cíntia, Silmara, Tiago, Warrison e Eneida, pela ajuda quando solicitada.

Aos funcionários do Departamento de Parasitologia/UFMG, Sumara, Sibebe, Tatiana e Sr. Neri, pelo excelente serviço prestado.

COLABORADORES

Este trabalho contou com a colaboração da professora Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu, do mestrando João Luís Reis Cunha e do Dr. João Carlos França da Silva, do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG, do professor Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem e do doutorando Rubens Daniel Miserani Magalhães, do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG.

FINANCIADORES

Este trabalho foi financiado pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo INCTV (Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia aplicado à Vacina), pela FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) e pelo CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa).

RESUMO

Leishmania (Ross, 1903) é um parasito protozoário de grande importância médica e veterinária. A Leishmaniose Visceral (LV), também conhecida como Calazar, é caracterizada por febre alta, substancial perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia e anemia. Pode levar à morte se não tratada. A espécie causadora da doença no Brasil é *L. infantum* (*L. chagasi*). A LV era, primariamente, uma zoonose caracterizada como doença eminentemente rural. Nos últimos anos, vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte e se tornou crescente problema de saúde pública no Brasil. O cão é identificado como reservatório de *L. infantum*, devido a sua susceptibilidade para a infecção e pelo alto parasitismo na pele. O controle epidemiológico da LV no Brasil envolve a eliminação de cães soropositivos, uso de inseticida nas casas e regiões do peridomicílio e o tratamento sistemático de casos humanos. Os testes sorológicos usados freqüentemente para triagem dos cães são: o Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) e o Immunofluorescence Antibody Test (IFAT). Contudo, essas técnicas apresentam limitações quanto à reprodutibilidade e especificidade. Durante os últimos anos, nosso grupo vem desenvolvendo um estudo proteômico de *L. infantum* para a busca de novos antígenos para métodos diagnósticos que sejam mais específicos e capazes de detectar tanto a fase aguda quanto a crônica da infecção. Esse ensaio nos permitiu identificar, dentre outras, proteínas “hipotéticas” com potencial uso no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) que foram utilizadas para a realização do presente projeto. Foram selecionadas duas proteínas hipotéticas (C8 e C1) que foram produzidas de forma recombinante, utilizando como vetor o plasmídeo Pet-TeV e como sistema de expressão *Escherichia coli*, cepa BL-21. Após a purificação por cromatografia de afinidade, as proteínas foram utilizadas como antígenos no teste sorológico para LV por ELISA. No ELISA com soros caninos, o antígeno C8 apresentou sensibilidade de 75% e especificidade de 90%, enquanto o antígeno C1 apresentou sensibilidade de 80% e especificidade de 60%. Por outro lado, no ELISA com soros humanos, os antígenos não foram eficientes para diferenciar pacientes positivos de negativos. Além disso, por estarmos trabalhando com proteínas não caracterizadas de *Leishmania*, foram produzidos anticorpos policlonais em coelhos para serem utilizados posteriormente em ensaios de expressão e localização celular.

Palavras chave: *Leishmania infantum*, proteína recombinante, ELISA, anticorpos.

ABSTRACT

Leishmania (Ross, 1903) is a protozoan parasite of major medical and veterinary importance. Visceral Leishmaniasis (VL), also known as kala-azar, is characterized by high fever, substantial weight loss, splenomegaly, hepatomegaly and anemia. Can lead to death if untreated. The species causing the disease in Brazil are *L. infantum* (*L. chagasi*). The VL was primarily zoonosis characterized as rural disease. More recently, it is expanding into medium and large urban areas and has become increasing public health problem in Brazil. The dog is identified as reservoir for *L. infantum*, due to its susceptibility to infection and high parasitic skin. The epidemiological control of VL in Brazil involves the elimination of seropositive dogs, use of insecticide in houses and peridomestic regions and the systematic treatment of human cases. Serological tests frequently used for screening dogs are: Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Immunofluorescence Antibody Test (IFAT). However, these techniques have limitations regarding reproducibility and specificity. During the last years, our group has developed a proteomic study of *L. infantum* in the search for new diagnostic targets that are more sensitive and specific for detecting both acute and chronic infection. This assay allowed us to identify, among others, “hypothetical” proteins with potential use in the diagnosis of Canine Visceral leishmaniasis (CVL) that were used for the realization of this project. We selected two hypothetical proteins (C8, C1) were produced recombinantly, using as the vector plasmid Pet-TeV and expression system as *Escherichia coli*, BL-21 strain. After purification by affinity chromatography, proteins were used as antigens in serological testing for VL by ELISA. In ELISA with canine serum, C8 antigen had a sensitivity of 75% and specificity of 90%, while the C1 antigen had a sensitivity of 80% and specificity of 60%. On the other hand, in ELISA with human sera, antigens were not efficient to differentiate positive and negative patients. Furthermore, because we are working with uncharacterized proteins of *Leishmania*, polyclonal antibodies were produced in rabbits for later use in assays of expression and cellular localization.

Keywords: *Leishmania infantum*, recombinant protein, ELISA, antibodies.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Evolução da LVH em Belo Horizonte no período de 1994 a 2009. Fonte: GEEPI/GECOZ – SMSA/PBH..... **5**
- Figura 2** Esquema da inoculação das proteínas recombinantes em coelhos para a produção de anticorpos policlonais. Legenda: 1a, 2a e 3a = inoculações; S = sangria; T = tempo..... **22**
- Figura 3** Gel de agarose a 1% com os produtos da PCR de colônia correspondentes às proteínas C8 e C1. Legenda: PM = padrão de massa molecular em pares de bases (pb) e canaleta de 1 a 10 contendo os produtos da PCR. Em cada canaleta foi colocada uma colônia isolada no Agar. Foram destacados pelo quadrado branco os clones selecionados para dar sequência ao trabalho..... **29**
- Figura 4** Gel SDS-PAGE a 12,5% referente ao teste de expressão. Legenda: T0 = antes da adição do IPTG, T4 = 4 horas após a indução, Pe = pellet, So = sobrenadante, B1 = cepa BL-21 e PM = padrão de massa molecular em kDa..... **29**
- Figura 5** Gráfico da purificação da proteína C8 por cromatografia de afinidade, em uma coluna de níquel, no aparelho Akta. Legenda: linha azul = eluição da proteína, linha verde = concentração do imidazol, linha vermelha = condutância do aparelho..... **30**
- Figura 6** Gel SDS-PAGE a 12,5% referente aos processos de expressão e purificação da proteína C8. Legenda: T0 = antes da adição do IPTG, T4 = 4 horas após a indução, LISE = após a lise da bactéria, F11 a F17 = frações obtidas da cromatografia e PM = peso de massa molecular em kDa..... **30**
- Figura 7** Gráfico da purificação da proteína C1 por cromatografia de afinidade, em uma coluna de níquel, no aparelho Akta. Legenda: linha azul = eluição da proteína, linha verde = concentração do imidazol, linha vermelha = condutância do aparelho..... **31**
- Figura 8** Gel SDS-PAGE a 12,5% referente aos processos de expressão e purificação da proteína C1. Legenda: T0 = antes da adição do IPTG; T4 = 4 horas após

a indução; LISE = após a lise da bactéria; F2, F13 e F23 = frações obtidas da cromatografia e PM = peso de massa molecular em kDa..... 31

Figura 9 Gel SDS-PAGE a 12,5% com as proteínas após a purificação por cromatografia e membrana de nitrocelulose contendo as proteínas recombinantes e Western Blot revelado com anticorpo anti-his..... 32

Figura 10 Western Blot usando as proteínas recombinantes e os anticorpos de coelhos imunizados com cada uma, revelado por anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase na diluição de 1:20000. Legenda: PM = padrão de massa molecular em kDa; Ac = anticorpo purificado diluído a 1:125 e 1:100; So = soro de coelho diluído a 1:500..... 33

Figura 11 Gráficos do primeiro ensaio de padronização do ELISA. No eixo das ordenadas está a absorvância e no das abscissas as proteínas C8 e C1. Legenda: positivo dialisado = pool de soros positivos contra solução de antígeno dialisada; negativo dialisado = pool de soros negativos contra solução de antígeno dialisada; positivo não dialisado = pool de soros positivos contra solução de antígeno não dialisada; negativo não dialisado = pool de soros negativos contra solução de antígeno não dialisada..... 34

Figura 12 Gráficos do segundo ensaio de padronização do ELISA. No eixo das ordenadas está a absorvância e no das abscissas as diluições dos anticorpos primários (soro) e secundário (conj). Os melhores resultados estão destacados pelo círculo verde..... 35

Figura 13 Gráfico da absorvância dos soros caninos dos grupos controles e infectados contra o antígeno C8 e a sua respectiva curva ROC..... 37

Figura 14 Gráfico da absorvância dos soros caninos dos grupos controles e infectados contra o antígeno C1 e a sua respectiva curva ROC..... 38

Figura 15 Gráfico da absorvância dos soros humanos dos grupos controles e infectados contra o antígeno C8 e a sua respectiva curva ROC..... 40

Figura 16 Gráfico da absorvância dos soros humanos dos grupos controles e infectados contra o antígeno C1 e a sua respectiva curva ROC..... 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sequências de aminoácidos e nucleotídeos da proteína C8 - gi 146099283 ref XP_001468603.1 hypothetical protein [Leishmania infantum] Destacado, em vermelho, o peptídeo selecionado no estudo de Faria et. al (2011).....	16
Tabela 2	Sequências de aminoácidos e nucleotídeos da proteína C1 - gi 146094146 ref XP_001467184.1 hypothetical protein [Leishmania infantum JPCM5]. Destacados, em vermelho, os peptídeos selecionados no estudo de Faria et. al 2011.....	17
Tabela 3	Iniciadores desenhados para os genes relativos às proteínas C8 e C1.....	18
Tabela 4	Relação entre os reagentes, suas concentrações e quantidade em volume, utilizados para a realização da PCR.....	18
Tabela 5	Categorias de resultados de um teste diagnóstico em uma população de infectados e não infectados.....	26
Tabela 6	Número de epitopos, com score maior que 2, preditos pelos programas ABCPRED e BCPREDS para as proteínas C8 e C1.....	28
Tabela 7	Resultado do ELISA para cães utilizando o antígeno C8 em comparação com o padrão-ouro.....	36
Tabela 8	Resultado do ELISA para cães utilizando o antígeno C1 em comparação com o padrão-ouro.....	38
Tabela 9	Comparação do desempenho do ELISA para cães realizado com os antígenos C8 e C1.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Aminoácidos
APS	Persulfato de amônio
AUC	Área sob a curva ROC, acurácia
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
DAT	<i>Direct agglutination test</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DPP®	<i>Dual Path Platform</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
GEEPI	Gerência de epidemiologia e informação
GECOZ	Gerência de controle de zoonoses
GI	<i>NCBI general identification of proteins</i>
IFAT	<i>Immunofluorescence antibody test</i>
IgG	Imunoglobulina da classe G
IPTG	<i>Isopropyl-β-thiogalactopyranoside</i>
KDa	Quilodalton
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LV	Leishmaniose visceral

LVC	Leishmaniose visceral canina
LVH	Leishmaniose visceral humana
OD	Densidade ótica
OPD	Orto-fenilenodiamina
PA	<i>Pro analyse</i>
PB	Pares de bases
PBH	Prefeitura municipal de Belo Horizonte
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PM	Padrão de massa molecular
QSP	Quantidade suficiente para
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
RVN	Razão de verossimilhança negativa
RVP	Razão de verossimilhança positiva
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>SDS-polyacrylamide gel electroforesis</i>
SMSA	Secretaria municipal de saúde
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TEMED	<i>Tetramethylethylenediamine</i>
TM	<i>Temperature of melting</i> (temperatura de anelamento)
TRIS	Tris (hidroximetil) amino metano

UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. <i>Leishmania</i>	3
2.2. LEISHMANIOSE VISCERAL.....	4
2.3. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	8
2.3.1. Diagnóstico parasitológico.....	8
2.3.2. Sorologia.....	9
2.4. PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	11
3. JUSTIFICATIVA.....	14
4. OBJETIVOS.....	15
4.1. OBJETIVO GERAL.....	15
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
5.1. PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	16
5.1.1. Desenho dos iniciadores.....	17
5.1.2. Realização da PCR.....	18
5.1.3. Ligação dos genes ao vetor de expressão (Pet-TeV).....	19
5.1.4. Transformação da <i>Escherichia coli</i> cepa BL-21.....	19
5.1.5. Expressão das proteínas recombinantes.....	19
5.1.6. Purificação.....	20
5.1.7. Diálise.....	21
5.2. PRODUÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	21
5.2.1. Imunização dos coelhos.....	22
5.2.2. Purificação dos anticorpos policlonais.....	23

5.2.3. Western Blot.....	23
5.3. ELISA.....	24
5.3.1. Padronização da técnica.....	24
5.3.2. Amostras testadas.....	24
5.3.3. ELISA com as proteínas recombinantes.....	25
5.3.4. Avaliação do desempenho.....	26
6. RESULTADOS.....	28
6.1. PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	28
6.2. PRODUÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	32
6.3. ELISA.....	33
6.3.1. Padronização da técnica.....	33
6.3.2. ELISA com as proteínas recombinantes.....	36
7. DISCUSSÃO.....	41
8. CONCLUSÕES.....	47
9. PERSPECTIVAS.....	48
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
11. ANEXOS.....	57
11.1. Quadro de abreviaturas dos aminoácidos.....	57
11.2. Quadro de abreviaturas dos nucleotídeos.....	57
11.3. Certificado do CEUA.....	58

1. INTRODUÇÃO

Leishmania (Ross, 1903) pertence à ordem Kinetoplastida, à família Trypanosomatidae e é um parasito protozoário de grande importância médica e veterinária (Dantas-Torres 2006).

Atualmente, as leishmanioses são um sério problema de saúde pública e afetam em torno de 12 milhões de pessoas no mundo (WHO 2008). A doença pode apresentar quatro manifestações clínicas, de acordo com a espécie de *Leishmania* que infecta o hospedeiro, como: Leishmaniose Cutânea (LC), Mucocutânea (LMC), Cutânea Difusa (LCD) e Visceral (LV) (Silveira et al. 2004). No homem, a progressão da doença é determinada pela espécie do parasito, da cepa, da resposta imune e estado nutricional (Castellano 2005).

A Leishmaniose Visceral, também conhecida como Calazar, é caracterizada por febre alta, substancial perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia e anemia. Pode levar à morte, se não tratada (Desjeux 2004). A espécie causadora da doença no Brasil é: *L. chagasi* (Neuber 2008). Segundo Maurício et al. 2000, dados genéticos e enzimáticos são provas irrefutáveis de que as espécies *L. infantum* e *L. chagasi* podem ser consideradas sinônima.

No Brasil a LV era, primariamente, uma zoonose caracterizada como doença de caráter eminentemente rural. Mais recentemente, vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte e se tornou crescente problema de saúde pública no país e em outras áreas do continente americano, sendo uma endemia em franca expansão geográfica (Ministério da Saúde 2011).

O cão é identificado como reservatório de *L. infantum*, devido a sua susceptibilidade para a infecção e pelo alto parasitismo na pele. O relacionamento próximo entre o homem e o cão infectado é um importante fator de risco para a transmissão da LV para o homem (Ashford 1996).

Diagnóstico sorológico é largamente e frequentemente utilizado, mas, embora a resposta humoral específica em LV canina seja, em geral, muito intensa com elevados níveis de imunoglobulinas específicas, a taxa de infecção por *Leishmania* é subestimada em cães de áreas endêmicas (Alvar et al. 2004).

O Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) é o mais usado no sorodiagnóstico da LVC. É utilizado em análises laboratoriais ou aplicações em campo

para a triagem de um grande número de amostras num curto período de tempo, sendo de execução simples e facilmente adaptável a vários antígenos como proteínas totais brutas, proteínas purificadas, peptídeos sintéticos definidos e proteínas recombinantes (Maia et. al 2008).

O diagnóstico rápido e acurado do agente etiológico é a chave para uma conduta efetiva em doenças causadas por parasitos protozoários, evitando o uso desnecessário de medicamentos que poderiam resultar na seleção de cepas resistentes (Fernández-Robledo et al. 2010). Dessa forma, o presente trabalho visa contribuir com o avanço no diagnóstico da LV por meio da produção e teste de novos antígenos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Leishmania*

Leishmania (Ross, 1903) pertence à ordem Kinetoplastida, à família Trypanosomatidae e é um parasito protozoário de grande importância médica e veterinária (Dantas-Torres 2006), o qual é transmitido para os hospedeiros susceptíveis pela picada das fêmeas dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) dos gêneros *Phlebotomus* (no velho mundo) e *Lutzomyia* (no novo mundo). O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros que causam infecções em mamíferos, *Leishmania* e *Viannia*, baseado no padrão de desenvolvimento do parasito no intestino do inseto (Laison and Shaw 1987). Mais de 30 espécies de *Leishmania* são conhecidas até o momento e aproximadamente 20 espécies são patogênicas para os humanos. Em torno de 30 espécies de flebotomíneos são vetores comprovados (Ashford 2000; Desjeux 2004).

Os hospedeiros vertebrados naturais dos parasitos *Leishmania* são mamíferos pertencentes às ordens: Edentata (tatus e preguiças), Carnivora (cães e gatos), Rodentia (ratos), Primata (humanos e macacos), Marsupialia (gambás) e Perissodactyla (cavalos). Com algumas exceções, as leishmanioses são zoonoses e a infecção em humanos é acidental (Ashford 1996; Saliba et al. 1999; Gramiccia et al. 2005).

Leishmania mantém seu ciclo de vida através da transmissão entre os flebotomíneos e os mamíferos. A forma flagelada, móvel, é chamada de promastigota. Ela é encontrada dentro do flebotomíneo, no qual passa por processos de diferenciação e divisão até chegar à forma promastigota metacíclica, que não se divide e é infectante para o hospedeiro vertebrado. Esta é transmitida no momento da picada, quando a fêmea faz o repasto sanguíneo (Laison and Shaw 1978). Ao entrar na pele dos mamíferos, é rapidamente fagocitada pelos monócitos que são atraídos pela reação inflamatória formada no local da picada (Neuber 2008). Depois de se estabelecer no meio intracelular, a promastigota se transforma em amastigota, forma sem flagelo. A amastigota se divide dentro da célula hospedeira até rompê-la, permitindo a infecção dos macrófagos que estiverem no local. O ciclo se fecha quando os macrófagos infectados são capturados pelo flebotomíneo no momento do repasto sanguíneo e, em seguida, a amastigota se transforma em promastigota no intestino do inseto (Laison and Shaw 1978).

Atualmente, as leishmanioses são um sério problema de saúde pública e afetam em torno de 12 milhões de pessoas no mundo (WHO 2008). A doença pode apresentar quatro manifestações clínicas, de acordo com a espécie de *Leishmania* que infecta o hospedeiro, como: Leishmaniose Cutânea (LC), Mucocutânea (LMC), Cutânea Difusa (LCD) e Visceral (LV) (Silveira et al. 2004). No homem, a progressão da doença é determinada pela espécie do parasito, da cepa, da resposta imune e estado nutricional (Castellano 2005).

Na Leishmaniose Cutânea, normalmente as lesões aparecem em áreas expostas, como face, braços e pernas. Começam com uma área vermelha e inchaço no local da picada, que aumentam de tamanho, e depois de 3 a 4 semanas desenvolvem-se numa úlcera plana típica, com margem em relevo (semelhante a um vulcão). As lesões costumam curar dentro de poucos meses, mas deixam cicatrizes. As principais espécies causadoras da doença no Brasil são: *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* e *L. lainsoni*.

A Leishmaniose Cutânea Difusa produz lesões de pele crônicas e disseminadas, semelhantes às lesões da lepra lepromatosa. O tratamento é difícil. A principal espécie causadora da doença no Brasil é: *L. amazonensis*.

Na Leishmaniose Mucocutânea, após um intervalo assintomático de meses ou anos, as lesões podem destruir parcial ou totalmente a mucosa do nariz, da boca e da garganta. As principais espécies causadoras da doença no Brasil são: *L. braziliensis* e *L. guyanensis* (Silveira 2004).

A Leishmaniose Visceral, também conhecida como Calazar, é caracterizada por febre alta, substancial perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia e anemia. Pode levar à morte, se não tratada (Desjeux 2004). A espécie causadora da doença no Brasil é: *L. chagasi* (Neuber 2008).

2.2. LEISHMANIOSE VISCERAL

A maioria dos casos de Leishmaniose Visceral (LV) ocorre no subcontinente indiano (Índia, Nepal e Bangladesh) e no leste africano (Sudão, Etiópia e Quênia), onde o agente etiológico é a *Leishmania donovani*. Na Índia, a LV é considerada uma antroponose, sendo os humanos identificados como reservatórios. Outras áreas endêmicas incluem a bacia do Mediterrâneo, na qual a espécie envolvida é a *Leishmania*

infantum, e o Novo Mundo, a espécie é *Leishmania chagasi*. Em ambas as áreas os canídeos são considerados os reservatórios (Zijlstra 2003). Segundo Maurício et al. 2000, dados genéticos e enzimáticos são provas irrefutáveis de que as espécies *L. infantum* e *L. chagasi* podem ser consideradas sinonímia.

No Brasil a LV era, primariamente, uma zoonose caracterizada como doença de caráter eminentemente rural. Mais recentemente, vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte e se tornou crescente problema de saúde pública no país e em outras áreas do continente americano, sendo uma endemia em franca expansão geográfica (Ministério da Saúde 2011).

Segundo o Ministério de Saúde, no período entre 2003 e 2009 foram registrados 34583 casos de LV no país. Em 2009, a região Nordeste representou 47,5% dos casos, seguida pelas regiões Norte (19,2%), Sudeste (17,4%), Centro-Oeste (7,4%) e Sul (0,2%). Atualmente, está distribuída em 21 Unidades Federadas, atingindo as cinco regiões brasileiras. É mais frequente no sexo masculino (63,9%) e em crianças menores de 10 anos (48,9%).

Segundo os dados da Secretaria Municipal de Saúde (SMSA) da prefeitura de Belo Horizonte (PBH), a partir do primeiro caso de leishmaniose visceral humana (LVH), no ano de 1994, a doença apresentou processo de expansão territorial no município, como mostra a figura 1. As taxas de letalidade (número de óbitos pela doença em relação ao número de casos notificados da doença no período) são altas – média de 13% de 1994 a 2009 – sendo que em 2008 passou de 10,5% para 19,3% em 2009.

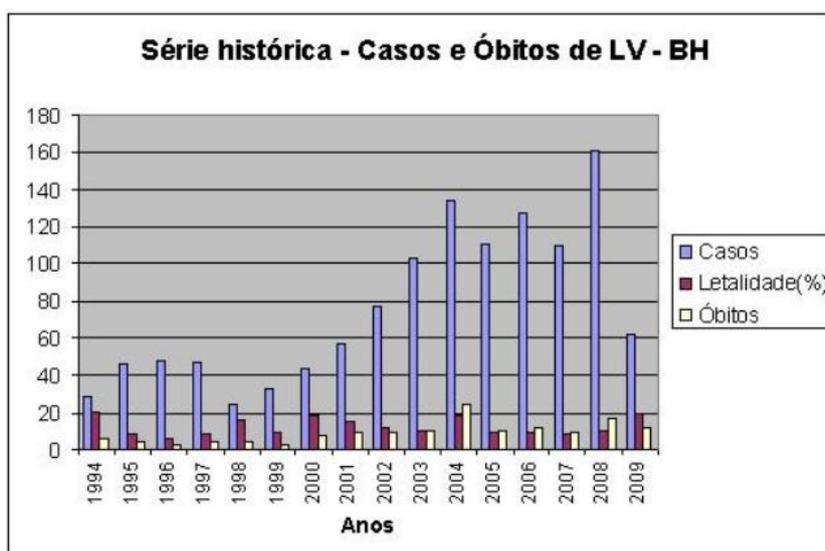


Figura 1: Evolução da LVH em Belo Horizonte no período de 1994 a 2009. Fonte: GEEPI/GECOZ – SMSA/PBH.

No período de 1994 a 2012, as regiões de Belo Horizonte que apresentaram, no total, as maiores taxas de LVH foram: nordeste – 311 casos; noroeste – 231 casos; venda nova – 210 casos; norte – 209 casos; leste – 206 casos.

O cão é identificado como reservatório de *L. infantum*, devido a sua susceptibilidade para a infecção e pelo alto parasitismo na pele. O relacionamento próximo entre o homem e o cão infectado é um importante fator de risco para a transmissão da LV para o homem (Ashford 1996). Além disso, foi demonstrado que cães assintomáticos podem transmitir o parasito para o vetor (Molina 1994).

O controle epidemiológico da LV no Brasil envolve a eliminação de cães soropositivos, uso de inseticida nas casas e regiões do peridomicílio e o tratamento sistemático de casos humanos (Tesh 1995).

Segundos os dados divulgados em 10 de dezembro de 2012 pela Gerência de Controle de Zoonoses (GECOZ) da SMSA/PBH, foram realizadas em Belo Horizonte, no mesmo ano, 183592 sorologias caninas, das quais 5998 amostras deram positivas. Foram eutanasiados no município 5220 cães e 64589 imóveis foram borrifados.

Os testes sorológicos usados frequentemente para triagem dos cães são: o Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) e o Immunofluorescence Antibody Test (IFAT). Contudo, essas técnicas apresentam limitações quanto à reprodutibilidade e especificidade (da Silva et al. 2006). Algumas vezes isso ocorre devido à reação cruzada com Doença de Chagas, Rickettsioses, Ehrlichioses e Toxoplasmose (Barbosa de Deus et al. 2002).

Para o diagnóstico humano, o Ministério da Saúde disponibiliza o teste sorológico IFAT. São considerados positivos os títulos a partir de 1:80. Títulos variáveis podem persistir positivos mesmo após o tratamento. Exames laboratoriais inespecíficos, como hemograma e dosagem de proteínas, são importantes devido às alterações que ocorrem nas células sanguíneas e no metabolismo de proteínas. Além disso, orientam o processo de cura do paciente.

O hemograma pode evidenciar uma pancitopenia (diminuição de hemáceas, leucopenia, com linfocitose relativa e plaquetopenia).

Na dosagem de proteína há forte inversão da relação albumina/globulina, com padrões tão acentuados quanto no mieloma múltiplo.

Pacientes com LV apresentam como sinais e sintomas da infecção sistêmica persistente: febre, fadiga, pouco apetite e substancial perda de peso. Conforme a doença avança, a esplenomegalia pode aumentar, causando distensão e dores abdominais, os

quais podem ser aumentados por concomitante hepatomegalia. Entretanto, os achados clínicos são inconclusivos e podem ser confundidos com os de outras doenças também endêmicas na região. O diagnóstico definitivo da LV é realizado pela demonstração direta do parasito em espécimes clínicos e por métodos moleculares específicos (Reus et al. 2005; Artan et al. 2006; Del Olmo et al. 2009).

Classicamente, a LVC apresenta lesões cutâneas, principalmente descamação e eczema, em particular, no espelho nasal e orelha, pequenas úlceras rasas, localizadas mais frequentemente ao nível das orelhas, focinho, cauda e articulações, além de pêlo opaco. Nas fases mais adiantadas da doença, observa-se, com grande frequência, onicogribose, esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatites, úlceras de pele, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, edema de patas e vômito, além de hiperqueratose. Entretanto, cães infectados podem permanecer sem sinais clínicos por longo período de tempo.

A classificação segundo os sinais clínicos apresentados nos cães, de acordo com Mancianti et. al 1988, pode ser verificada conforme demonstrado a seguir:

- Cães assintomáticos = ausência de sinais clínicos sugestivos da infecção por *Leishmania*;
- Cães oligossintomáticos = presença de adenopatia linfoide, pequena perda de peso e pelo opaco;
- Cães sintomáticos = todos ou alguns sinais mais comuns da doença como as alterações cutâneas (alopecia, eczema furfuráceo, úlceras, hiperqueratose), onicogribose, emagrecimento, ceratoconjuntivite e paresia dos membros inferiores.

No Brasil, os medicamentos utilizados para o tratamento da LVH são o Antimonial Pentavalente e a Anfotericina B. O Ministério da Saúde recomenda o Antimoniato de N-metil Glucamina como fármaco de primeira escolha para o tratamento; no entanto, a escolha de cada um deles deverá considerar a faixa etária, a presença de gravidez e co-morbidades.

O tratamento de cães não é medida recomendada, pois não diminui a importância do cão como reservatório do parasito. As tentativas de tratamento da LVC, por meio de drogas tradicionalmente empregadas (antimoniato de meglumina, anfotericina B, isotionato de pentamidina, alopurinol, cetoconazol, fluconazol, miconazol, itraconazol) tem apresentado baixa eficácia. O uso rotineiro de drogas em

cães induz à remissão temporária dos sinais clínicos, não previne a ocorrência de recidivas, tem efeito limitado na infectividade do flebotômíneo e levam ao risco de selecionar parasitos resistentes às drogas utilizadas para o tratamento humano. A Portaria Interministerial nº1426/2008 proíbe o tratamento de LVC com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

2.3. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL

2.3.1. Diagnóstico parasitológico

Devido à sua elevada especificidade, a Microscopia é considerada o padrão ouro para o diagnóstico das Leishmanioses (Herwaldt 1999). As formas amastigotas podem ser visualizadas em esfregaços teciduais de linfonodo, medula óssea ou baço. Em preparações coradas com Giemsa, o citoplasma aparece azul e o núcleo grande fica vermelho. No mesmo plano do núcleo, aparece o cinetoplasto corado em vermelho ou violeta. Amostras do baço apresentam sensibilidade de 93-98,7% (Ho Ea et al. 1948; Siddig et al. 1988; Zijlstra et al. 1992). 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. A desvantagem do método é que o aspirado de medula óssea ou de baço é uma técnica arriscada e dolorosa (Sundar et al. 2002).

O cultivo *in vitro* de diferentes tecidos pode melhorar a sensibilidade da detecção do parasito. Nem toda cepa de *Leishmania* cresce no mesmo ritmo e nem todo tecido ou órgão retirados do mesmo cão possuem carga parasitária similar (Evans 1989). Os meios para cultura podem ser monofásicos, como Schneider, M199, RPMI e Grace, ou bifásico, como o Novy-McNeal-Nicolle (NNN) com LIT (Liver Infusion Tryptose). 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 para contaminação microbiológica, à dependência da carga parasitária e, algumas vezes, à dificuldade de adaptação do isolado ao meio (Maia 2008).

Outra forma de detecção do parasito é por meio de métodos moleculares. A técnica mais utilizada é a PCR (Polymerase Chain Reaction) que permite a detecção do

DNA de *Leishmania* em diferentes espécimes clínicos – sangue total, medula óssea, linfonodo, pele e raspado conjuntival. O 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). Um único resultado negativo da PCR para um cão com suspeita clínica não é suficiente para dizer que não há infecção. Estudos avaliando a PCR em diferentes tecidos de cães infectados mostraram resultados variáveis e, às vezes, conflitantes (Baneth and Aroch 2008). 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).

2.3.2. Sorologia

Os métodos sorológicos são baseados na presença da resposta humoral específica (Herwaldt 1999). Uma gama de testes sorológicos, com variação na sensibilidade e especificidade, está disponível para o diagnóstico da LV.

Diagnóstico sorológico é largamente e frequentemente utilizado, mas, embora a resposta humoral específica em LVC seja, em geral, muito intensa com elevados níveis de imunoglobulinas específicas, a taxa de infecção por *Leishmania* é subestimada em cães de áreas endêmicas (Alvar et al. 2004). Apesar da produção de anticorpos ser baixa no início e na fase tardia ou em infecções assintomáticas, cães infectados geralmente desenvolvem um aumento gradual dos títulos de anticorpos ao longo do tempo (Oliva et al. 2006). Cães sintomáticos, independentemente das alterações hematológicas e protéicas, desenvolvem uma resposta humoral forte (Campino et al. 2000).

Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT): é considerado o padrão ouro entre os métodos sorológicos. O teste utiliza o próprio parasito como antígeno e é aplicado em estudos epidemiológicos, na prática clínica e no controle do tratamento (Gradoni 2002; Mancianti et al. 2002; Alvar et al. 2004). Contudo, sua aplicação requer elevado nível de habilidade e experiência, além de uma estrutura adequada de laboratório. Outra limitação da técnica é a diluição seriada do soro, a qual faz com que o teste fique laborioso e impraticável para analisar um grande número de amostras (Gradoni 2002). No estudo realizado por Maia et al. (2007), testando amostras de cães assintomáticos e

sintomáticos de uma área endêmica, a sensibilidade foi de 85,5% e a especificidade de 94%.

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA): é o método mais usado no sorodiagnóstico da LVC. É utilizado em análises laboratoriais ou aplicações em campo para a triagem de um grande número de amostras num curto período de tempo, sendo de execução simples e facilmente adaptável a vários antígenos como proteínas totais brutas, proteínas purificadas, peptídeos sintéticos definidos e proteínas recombinantes (Maia et. al 2008). A sensibilidade e a especificidade dependem do antígeno usado. Normalmente é realizado com o antígeno solúvel bruto. A sensibilidade varia de 80 a 100% (Sundar 2002). Por outro lado, Mettler et al. (2005) obtiveram elevada sensibilidade ao analisar amostras de cães assintomáticos (94,1-100%) e sintomáticos (100%) no ELISA com antígenos solúveis das formas promastigotas e amastigotas. Baleeiro et al. (2006) demonstraram que o uso de antígenos preparados com várias espécies de *Leishmania* têm uma influência significativa no resultado dos testes para o diagnóstico da LVC. O uso de preparações antigênicas a partir de *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* para diagnosticar infecção por *L. infantum* resulta num decréscimo da atividade dos anticorpos presentes nos soros dos animais analisados por ELISA. A utilização de antígeno bruto, ou extratos solúveis das formas promastigotas ou amastigotas, limita a especificidade. A tecnologia do DNA recombinante realizada a partir da clonagem molecular de genes selecionados para a codificação de proteínas antigênicas de *Leishmania* pode ser usada para o desenvolvimento de métodos sorológicos mais específicos (Maia et. al 2008). Um antígeno em teste é a proteína recombinante rK39. De acordo com Rosário et al. (2005), o antígeno rK39 apresenta sensibilidade variando entre 95-98% e especificidade de 100%. Os títulos de anticorpos contra este antígeno estão relacionados diretamente com a fase aguda da doença e possuem potencial para a monitoração da quimioterapia e na predição da recaída (Kumar et al. 2001).

O kit do teste imunocromatográfico rápido é bastante atrativo devido ao seu formato simples, à facilidade do uso e a rápida resposta do resultado, que permite uma intervenção imediata pelo veterinário, porém não é uma resposta muito confiável (Gradoni 2002). O teste disponível no mercado utiliza como antígeno o rK39, o qual é impregnado numa membrana de celulose adaptada para uso em campo. Para Reithinger et al. (2002) a maior desvantagem do teste com o antígeno rK39 é a baixa especificidade (61-75%), que gera uma elevada proporção de falsos positivos. Por outro lado, Mettler

et al. (2005) concluíram que o teste com o rK39 auxilia na confirmação dos casos com suspeita clínica devido à alta especificidade com animais sintomáticos. No Brasil os testes sorológicos ELISA e RIFI (disponíveis em kits específicos produzidos pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos e autorizados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) são recomendados e distribuídos pelo Ministério da Saúde para a avaliação da soroprevalência em inquéritos caninos. O teste de ELISA era recomendado para a triagem de cães e a RIFI para a confirmação dos cães reagentes ao teste de ELISA (Ministério da Saúde 2006). O Ministério da Saúde, através da Nota Técnica Conjunta 01/2011 substituiu o protocolo de diagnóstico da leishmaniose visceral canina, sendo utilizado o DPP® como teste de triagem e o ELISA como confirmatório.

O método Direct Agglutination Test (DAT) utiliza promastigotas em suspensão ou liofilizadas, coradas com Coomassie. É um teste barato e de fácil execução, sendo ideal para uso em laboratório e em campo (Meredith et. al 1995). Em vários estudos com cães de áreas endêmicas para LV, o DAT obteve 70,6% (Mohebalí et. al 2004) e 100% (Silva et. al 2006) de sensibilidade e 84,9% (Mohebalí et. al 2004) e 100% (Neogy et. al 1992; Schallig et. al 2002) de especificidade. O teste pode ser realizado com plasma ou soro. Apesar do fato de vários pesquisadores defenderem o uso em campo (Neogy et. al 1992; Schallig et. al 2002), uma das limitações do DAT é o longo tempo de incubação necessário (18 horas) e as várias diluições que devem ser feitas para o soro ou plasma, as quais deixam o teste laborioso e não adequado para a triagem de um grande número de amostras (Harith et. al 1989).

2.4. PROTEÍNA RECOMBINANTE

Proteínas recombinantes são proteínas produzidas a partir de expressão em bactérias ou outros organismos (como fungos) utilizando a tecnologia do DNA recombinante.

O sistema de expressão em *Escherichia coli* é normalmente o mais usado para a produção industrial de proteínas recombinantes para aplicações farmacêuticas. Organismos procarióticos crescem rapidamente e atingem densidade relativa alta no

meio de crescimento barato, são fáceis para transformar e podem produzir elevadas quantidades de produtos recombinantes solúveis (Terpe 2006).

Proteínas recombinantes de parasitos apresentam várias aplicações, como: desenvolvimento de métodos para diagnóstico, imunógenos para vacinação, análises de estrutura e função das proteínas de parasitos, e triagem e perfil de drogas candidatas ao tratamento (Fernández-Robledo et al. 2010).

Para o diagnóstico da LV existe em estudo uma variedade de proteínas produzidas de forma recombinante, as quais variam em sensibilidade e especificidade. Essas proteínas apresentam diferentes funções na *Leishmania*, como: proteínas relacionadas à cinesina, proteínas do choque térmico, enzimas e de função desconhecida (Srividya et. al 2011).

Entre as proteínas relacionadas à cinesina, estão em estudo a rK39 (já descrita anteriormente), a rK26 com sensibilidade e especificidade de 100% nos estudos realizados por Sundar et. al 2007 e Mohapatra et. al 2010, além da rK9 com 95% de sensibilidade e 100% de especificidade (Mohapatra et. al 2010).

Entre as proteínas do choque térmico, destaca-se a rHSP70, de *L. braziliensis*, com sensibilidade variando de 89 a 100% e especificidade de 100% para o diagnóstico das Leishmanioses Cutânea e Mucocutânea (Amorim et. al 1996; Perez-Alvarez et. al 2001).

Entre as enzimas, encontra-se em estudo a rLACK com 97% de sensibilidade e 84% de especificidade (Maalej ET al. 2003).

Por último, das proteínas com função desconhecida, destaca-se a rA2 com sensibilidade variando de 60 a 87% e especificidade de 100% (Carvalho et. al 2002).

A disponibilidade de sequências genômicas de vários parasitos levou a um exponencial progresso na compreensão da biologia destes e permitiu identificar potenciais alvos para intervenção (de Azevedo et al. 2009).

Leishmania infantum é uma célula diplóide que possui 36 pares de cromossomos e, aproximadamente, 8300 genes, dos quais 27 são genes espécie-específicos. Entre estes genes, 10 possuem função predita enquanto 17 são hipotéticos, ou seja, não possuem função conhecida (Smith et al. 2007). Além disso, em todo o genoma das espécies *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*, há falta de informação funcional para mais de 50% dos genes identificados (Peacock et al. 2007). Esses genes de proteínas hipotéticas são alvos interessantes para pesquisa, não só pela inexistência de dados a respeito das proteínas, como também especificamente para o nosso grupo, uma vez que

identificamos várias proteínas com alta expressão e reprodutibilidade nas formas amastigotas e promastigotas de *L. infantum* que eram consideradas “hipotéticas” (Costa et al. 2011).

3. JUSTIFICATIVA

O diagnóstico rápido e acurado do agente etiológico é a chave para uma conduta efetiva em doenças causadas por parasitos protozoários, evitando o uso desnecessário de medicamentos que poderiam resultar na seleção de cepas resistentes. O desenvolvimento de métodos diagnósticos exige uma quantidade substancial ou do parasito em um estágio particular do seu ciclo de vida ou da seleção de proteínas expressas em todos os estágios. Para a utilização de proteínas, a produção da proteína recombinante pode ser um representante acurado da nativa equivalente (Fernández-Robledo et al. 2010).

Considerando que a Leishmaniose Visceral é um crescente problema de saúde pública no Brasil, e que talvez um dos motivos da dificuldade no controle, seja escassez de testes diagnósticos eficientes, é necessária a busca por novos alvos diagnósticos que sejam mais sensíveis e específicos para detectar tanto a fase aguda quanto a crônica da infecção.

Durante os últimos anos, nosso grupo vem desenvolvendo um estudo proteômico de *L. infantum* para a identificação de novos antígenos com potencial uso no diagnóstico da LVC. Inicialmente, foi realizado Western Blot utilizando extratos protéicos de promastigotas fracionados por eletroforese bidimensional, soros de cães nas fases aguda e crônica da infecção e soros de animais sem infecção por *Leishmania*. Após a análise, excluindo as proteínas reconhecidas de forma inespecífica pelos soros de cães não infectados, aquelas reconhecidas somente por anticorpos de cães infectados foram retiradas do gel, analisadas por espectrometria de massa do tipo MALDI/ToF-ToF (Bruker - Auto Flex) e identificadas em banco de dados (Costa et al. 2011). Em seguida realizamos a predição para presença de epitopos B nas proteínas identificadas, sintetizamos os pepídeos preditos e avaliamos a reatividade destes frente a soros de cães com LV, inclusive em ensaios de ELISA (Costa et al. 2011; Faria et al. 2011). Esses ensaios nos permitiram identificar várias proteínas com potencial uso no diagnóstico da LVC e para o presente projeto, iremos focar em duas proteínas de função desconhecida que apresentam epitopos reativos frente a soros de cães infectados.

A produção dessas proteínas de forma recombinante permitirá sua caracterização e a avaliação como antígeno para diagnóstico e será uma importante forma de descrever novas moléculas que poderão contribuir com o avanço no diagnóstico da LV.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Testar, como antígenos, no diagnóstico sorológico da Leishmaniose Visceral, duas proteínas com função desconhecida de *Leishmania infantum* produzidas de forma recombinante.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir as proteínas hipotéticas a partir da tecnologia do DNA recombinante.
- Produzir anticorpos policlonais anti-proteína recombinante.
- Padronizar o ELISA usando essas proteínas como antígenos.
- Avaliar as proteínas recombinantes como antígeno no ELISA para diagnóstico da LVC.
- Avaliar as proteínas recombinantes como antígeno no ELISA para diagnóstico da LVH.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Para a realização deste trabalho foram selecionadas duas proteínas com função desconhecida que apresentaram peptídeos reativos frente a soros caninos infectados por *L. infantum* (e não reativos a soros infectados por *Trypanosoma cruzi* e nem a soros negativos para LVC) no trabalho de Faria et. al (2011). Além disso, essas proteínas foram avaliadas para as seguintes características: apresentar epitopos para células B preditos pelos programas de bioinformática ABCPRED e BCPREDS, não possuir peptídeo sinal e não ter sítio de restrição para as enzimas NheI e HindIII. A partir dessa análise, as proteínas “hipotéticas” que foram utilizadas no presente trabalho estão descritas nas tabelas 1 e 2:

Tabela 1: Sequências de aminoácidos e nucleotídeos da proteína C8 - gi|146099283|ref|XP_001468603.1| hypothetical protein [Leishmania infantum] Destacado, em vermelho, o peptídeo selecionado no estudo de Faria et. al (2011).

Proteína em formato FASTA (198 aa)	MPPRPSRDEYRRVREGRENDRPEGAENEVRVTATHGQHSYISYVIAVL NGEDGKTRND VKISGMGGAIYNAVNI AEIVKRRISGLHQVTELGSELVR DEYEPIDRTRNPENVVVERKVSTILITLSRNCLDKSNPGYQEPIDSEVTEQ ERRDPNMSRRGGRGGRGGRGGRGGRGGRGGRGGRGVA AIDRRDDREN
Gene em formato FASTA (597 pb)	ATGCCGCCACGTCCGTCTCGTGATGAGTACCGCCGCGTCCGCGAGGG CCGCGAGAATCGCGACCGCCCCGAGGGTGCTGAGAACGAGGTGCGTG TGACTGCTACCCATGGCCAGCACAGCTACATCTCGTACGTCATCGCCG TGCTGAACGGTGAAGATGGCAAGACGCGCAACGACACGGTAAAGATC AGCGGTATGGGCGGCGCCATCTACAACGCCGTCAACATCGCCGAAAT TGTGAAGCGCCGCATTTCTGGCCTGCACCAGGTCACTGAGCTGGGCTC TGAGCTGGTTCGCGACGAGTACGAGCCGATCGACCGACCCGGAACC CTGAGAACGTCGTGGTGGAGCGCAAGGTGTCCACAATCCTCATCAG TTGTCCCGTAACTGTTTGGACAAGTCCAACCCTGGTTACCAGGAGCCG ATTCCGGATAGCGAGGTGACGGAGCAGGAGAGGCGCGACCCCAATAT GAGCCGTCGCGGCGGTCTGTTGGCAGCCGTGGTGGCCGTGGTGGCA GCCGTGGTGGTCTGGCGGAAGCCGTGGTGGCCGCGGGGTAGCGGCC ATCGATCGCCGCGATGACCGCGAGAACTAG

Tabela 2: Sequências de aminoácidos e nucleotídeos da proteína C1 - gi|146094146|ref|XP_001467184.1| hypothetical protein [Leishmania infantum JPCM5]. Destacados, em vermelho, os peptídeos selecionados no estudo de Faria et. al 2011.

Proteína em formato FASTA (358 aa)	<pre> MMYTGEIENGQMHGRGCLIYPNKEYEGDWVYGKRHGHGVYTYADGS KYDGEWVEDKVHKGKTCYYASGNRYTGDWTFGRINGRGTLEYADGDR YDGEWKDGRMHGKGLYYYSNGDRYDGEWKDDKRHGKGTVTYAGPD GSVSEKFDGDWVEGRMQGWGKYYYADGGVYEGEWQDGKMHGKGTYI FPNGNKYEGEWCDLVKQGYGVLTYYVNGERYEGYWLDDKAHGTGLTY LQGDRYTG EWYQGKKHGRGTLAYSNKDTYEGEWRNDSATGRGVLEYA NGCRYEGDWLDDRRHGEQQLLPDGSSYEGGWVNGKKEGRARIILKCG AVFVGTWKDNRIVQGGEFYLSENCDLNPNPDY </pre>
Gene em formato FASTA (1077 pb)	<pre> ATGATGTATACAGGTGAAATCGAGAACGGCCAGATGCATGGCCGGGG CTGCCTCATCTACCCGAACAAGGAGAAGTACGAGGGCGACTGGGTGT ACGGCAAGCGTCACGGCCACGGCGTGTACACATACGCGGACGGTAGC AAGTACGATGGGGAGTGGGTGGAGGATAAAGGTGCACGGCAAGGGCA CATGCTACTACGCCAGCGGCAATCGCTACACCGGTGACTGGACGTTTG GCCGCATCAACGGCCCGCGGTACCCTCGAGTACGCCGACGGCGATCGC TACGACGGTGAGTGAAGGACGGCCGCATGCATGGCAAAGGTCTCTA CTACTACTCCAACGGCCGACCGCTACGACGGCGAGTGGAAGGATGATA AACGTCACGGAAAGGGTACGGTGACGTACGCCGGCCCCGACGGTAGC GTGTTCGGAGAAGTTCGACGGCGACTGGGTGGAGGGGCGCATGCAGGG CTGGGGTAAGTACTACTACGCCGACGGCGCGCTTTACGAGGGCGAGT GGCAGGATGGCAAGATGCACGGCAAGGGTACGTACATATTCCCAGAC GGCAACAATAACGAGGGTGAAGTGGTGCACGATGTGAAGCAGGGCT ACGGTGTGCTGACCTACGTCAACGGCGAGCGCTACGAGGGCTACTGG CTGGACGACAAGGCGCACGGCACCGGCACCCTCACCTACCTCCAGGG TGACCGCTATACAGGCGAGTGGTACCAGGGCAAGAAACACGGCCCGC GTACTCTGGCCTATAGCAACAAGACACGTATGAGGGCGAGTGGCGG AACGACAGCGCGACCGGCCGAGGTGTGCTCGAGTACGCGAATGGGTG CCGCTACGAGGGAGACTGGTTGGATGATAGGCGCCACGGCGAAGGCC AGCTGTTGCTACCGGACGGCTCCAGCTATGAGGGTGGGTGGGTGAAT GGCAAGAAGGAGGGCCGCGCCCGCATTATCCTCAAGTGGCGGCCGT CTTCGTGGGCACTTGAAGGACAACCGTATCGTGGGACAGGGCGAGT TCTACCTCTCCGAGAACTGCGACCTCAACAATCCCAGCTACTAG </pre>

5.1.1. Desenho dos iniciadores

Os iniciadores foram desenhados no programa Oligo Explore 2 utilizando as seqüências de nucleotídeos dos genes de cada proteína fornecidos pelo banco de dados Protein Database do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>).

Cada proteína possui duas seqüências de iniciadores, uma chamada Forward e a outra Reverse. Na Forward foi acrescentada a seqüência relativa ao sítio de restrição da enzima NheI (GCTAGC), enquanto na Reverse foi adicionada a seqüência para a enzima HindIII (AAGCTT). A tabela 3 mostra os iniciadores desenhados.

Tabela 3: Iniciadores desenhados para os genes relativos às proteínas C8 e C1.

Proteína	Nome do iniciador	Sequência do iniciador	TM
C8	PtnHip597F	5'-GCTAGCATGCCGCCACGTCCG-3'	61,2°C
	PtnHip597R	5'-AAGCTTCTAGTTCTCGCGGTCATCG-3'	58,7°C
C1	PtnHip1077F	5'-GCTAGCATGATGTATAACAGGTGAAATC-3'	51,1°C
	PtnHip1077R	5'-AAGCTTCTAGTAGTCGGGATTGTT-3'	52,3°C

TM = Temperatura de anelamento

5.1.2. Realização da PCR

Para a realização da PCR, foi extraído DNA de uma cultura de *Leishmania infantum* (MHOM/BR/1972/BH46) mantida no laboratório, utilizando o kit de extração QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN).

A PCR foi montada de acordo com a seguinte tabela:

Tabela 4: Relação entre os reagentes, suas concentrações e quantidade em volume, utilizados para a realização da PCR.

MIX		
Reagente	Concentração	Volume / tubo
Tampão GoTaq 5X c/ MgCl ₂ 7,5 mM	5X	6,0 µL
dNTP	2000 µmol/µL	1,0 µL
Iniciador Forward	10 pmol/µL	0,5 µL
Iniciador Reverse	10 pmol/µL	0,5 µL
Taq polimerase	5 U/µL	0,2 µL
H ₂ O dd	-----	20,8 µL
DNA	100 ng/µL	1,0 µL
Volume final por tubo 30 µL		

Após a preparação do mix, os tubos foram colocados no Termociclador (PTC-100™), utilizando o programa: Passo 1 – 94°C por 5 minutos; Passo 2 – 94°C por 1 minuto; Passo 3 – temperatura de anelamento específica de cada conjunto de iniciadores por 1 minuto; Passo 4 – 72°C por 1 minuto; Passo 5 – 25 ciclos voltando ao passo 2; Passo 6 – 72°C por 5 minutos; Passo 7 – 8°C por 24 horas.

Depois os produtos da PCR foram aplicados no gel de agarose a 1% [120 g de agarose, 120 mL de TBE (10,8 g/L Tris base, 5,5 g/L ácido bórico, 4,0 mL/L EDTA 0,5 M pH8,0 e água qsp 1L) e 6 µL de brometo de etídio a 10 mg/mL] e para a purificação

da banca dos genes no gel foi utilizado o kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

5.1.3. Ligação dos genes ao vetor de expressão (Pet-TeV)

O vetor de expressão Pet-TeV e os genes obtidos na PCR foram digeridos com as enzimas de restrição NheI e HindIII, antes de serem submetidos à ligação.

Para a linearização do vetor foram colocados em tudo Falcon[®] 50 ng do Pet-TeV, 1 µL de Hind III, 1 µL de Nhe I e 3 µL do tampão Tango. Para a digestão do produto da PCR foram colocados em tudo Falcon[®] 25 µL da PCR, 1 µL de Hind III, 1 µL de Nhe I e 3 µL do tampão Tango. Os tubos foram colocados em banho-maria a 37°C por 18 horas.

Após a digestão, o vetor e os genes foram aplicados no gel de agarose a 1% e, posteriormente, purificados pelo kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Então, os genes e o vetor digeridos foram colocados juntos e foi adicionada a enzima ligase para que ocorresse a ligação gene-vetor.

5.1.4. Transformação da *Escherichia coli* cepa BL-21

Na cubeta de eletroporação colocou-se 50 µL da bactéria *Escherichia coli*, cepa BL-21, e 2,5 µL da ligação vetor/gene. Esse procedimento é feito em ambiente esterilizado e no gelo. O choque foi realizado em 2,50 kV no eletroporador MicroPulser (Bio-Rad).

Depois a bactéria foi semeada em meio Ágar [1,5 g de Agar bacteriológico e 100 mL de meio 2XYT (16 g/L triptona, 10 g/L extrato de levedura, 5 g/L NaCl e água qsp 1L)] com Kanamicina (0,05 mg/ml de meio). Após 24 horas de crescimento, as colônias que apareceram na placa foram submetidas à PCR de colônia, utilizando os iniciadores do vetor, T7 Forward e T7 Reverse, para confirmar se houve a incorporação do vetor pela bactéria. Os produtos da PCR foram aplicados no gel de agarose a 1% para visualização das colônias positivas. As colônias positivas selecionadas foram colocadas para crescer em meio 2XYT para posterior sequenciamento do vetor e teste de expressão.

5.1.5. Expressão das proteínas recombinantes

Primeiramente foi realizado um teste de expressão para verificar se as proteínas ficariam presentes no sobrenadante - parte solúvel - ou no pellet - parte insolúvel. Foi feito inóculo em 10 mL do meio 2XYT para expressão e a densidade ótica (OD) monitorada. Quando a OD atingiu valor de 0,6, foi adicionado ao meio o IPTG 500 mM /1 mL meio e incubado a 37°C por 4 horas.

Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 10000 G por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi submetido à lise com lisozima. As amostras foram centrifugadas, novamente, a 10000 G por 30 minutos. Alíquotas obtidas durante esse processo foram aplicadas em gel SDS-PAGE a 12,5% [para 1 gel: 1,25 mL de Tris 1,5M pH8,8, 2,0 mL de Bisacrilamida 30%, 50 µL de APS 10%, 50 µL de SDS 10%, 5 µL TEMED e água qsp 5,0 mL / gel stack: 500 µL de Tris 0,5M pH6,8, 260 µL de Bisacrilamida 30%, 20 µL de APS 10%, 20 µL de SDS 10%, 2 µL TEMED e água qsp 2,0 mL] representando os tempos antes da adição do IPTG (T0), 4 horas após a indução (T4), pellet (Pe), sobrenadante (So) e a cepa BL-21 (Bl).

Para realizar a expressão em 1 litro de meio 2XYT, foi necessário fazer um pré-inóculo no dia anterior, deixando a bactéria transformada crescer em 20 mL de meio, sob leve agitação (shaker) a 37°C por 18 horas. Esse pré-inóculo foi vertido em 1 L de meio para expressão e a densidade ótica (OD) monitorada. Quando a OD atingiu valor de 0,6, foi adicionado ao meio o IPTG 500 mM /1 mL meio e incubado a 37°C por 4 horas.

Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 10000 G por 30 minutos em refrigeração a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet guardado no freezer a -20°C.

5.1.6. Purificação

Antes de iniciar a purificação, deve-se lisar as bactérias. Para isso, o pellet foi descongelado e ressuspenso em 25 mL da solução tampão Akta A [50 mL de tampão fosfato de sódio 200 mM (0,456 g de fosfato monobásico de sódio, 2,299 g de fosfato dibásico de sódio e água mili-Q qsp 100 mL), 2,92 g de NaCl, 240,24 g ureia, água mili-Q qsp 500 mL e pH7,4]. As amostras passaram por 5 ciclos no Homogeneizador. Depois foram centrifugadas a 10000 G por 15 minutos a 4°C, para a separação das porções pellet e sobrenadante. Este foi centrifugado novamente sob as mesmas

condições, para a retirada dos últimos restos celulares, e o sobrenadante resultante foi filtrado e purificado em cromatografia de afinidade por níquel na resina sepharose-Ni²⁺ (GE Healthcare), no aparelho Akta. Para a eluição da amostra foi utilizado um tampão com imidazol, tampão Akta B [30 mL de tampão fosfato de sódio 200 mM, 1,75 g de NaCl, 144,14 g ureia, 10,21 g imidazol, água mili-Q qsp 300 mL e pH7,4].

Para verificar a expressão e o processo de purificação foi feito um gel SDS-PAGE a 12,5%, no qual foram aplicadas alíquotas dos tempos antes da adição do IPTG (T0), 4 horas após a indução (T4), após a lise da bactéria (LISE) e das frações obtidas da cromatografia.

Posteriormente, alíquotas das proteínas purificadas foram aplicadas em um gel SDS-PAGE a 12,5% e este transferido para uma membrana de nitrocelulose.

Essa membrana foi incubada com anticorpo anti-His, para o reconhecimento das proteínas, as quais são expressas com cauda de histidina. Para a revelação, foi utilizado anti-antiHis (IgG) conjugado com peroxidase (Figura 9). Esse Western Blot foi realizado com o Kit Western Breeze[®] - Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit.

5.1.7. Diálise

Foram colocados dentro das membranas de diálise, com poro de 12400 Da, 5 mL de cada amostra de proteína após a purificação.

No primeiro dia, as membranas foram colocadas em água mili-Q com uma troca após 4 horas. No final do dia, a água foi trocada por PBS 0,15 M pH7,4 [0,476 g de fosfato monobásico de potássio (KH₂PO₄), 10,17 g de fosfato dibásico de sódio (NaHPO₄), 8,5 g de NaCl e água qsp 1 L] e este deixado overnight.

No segundo dia, o PBS foi trocado por novo PBS. As amostras foram recolhidas no final do dia. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas.

5.2. PRODUÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Esse projeto foi submetido e aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UFMG, protocolo nº 98/2012 (Anexo 11.3).

5.2.1. Imunização de coelhos

O soro policlonal de coelhos foi produzido pela inoculação de 200 µg do antígeno [800 µg antígeno liofilizado dissolvido em 2,0 mL de PBS 0,15 M pH7,4] - 0,5 ml da solução com 0,5ml do Adjuvante Completo de Freund - pela via subcutânea, dividida em 3 pontos nas costas do animal. Foram utilizados dois coelhos machos, um para cada proteína, da raça Nova Zelândia. Antes da primeira inoculação, 3 mL de sangue foi retirado para servir de controle pré-imune (T0).

Quinze dias após a primeira imunização 3 mL de sangue foi retirado (T1) e realizada a segunda imunização, porém usando o Adjuvante Incompleto de Freund (0,5 ml da solução do antígeno com 0,5ml do Adjuvante Incompleto de Freund)

Quinze dias após a segunda imunização 3 mL de sangue foi retirado (T2) e realizada a terceira imunização - 0,5 ml da solução do antígeno com 0,5ml do Adjuvante Incompleto de Freund.

Dez dias após a terceira imunização 3 mL de sangue foi retirado (T3). Sete dias após foram retirados mais 3 mL (T4). E por fim, sete dias após foi realizada a sangria total do animal, sem levá-los à morte – retirada de 50 mL de sangue por punção cardíaca.

Todo o esquema das inoculações dos antígenos e coletas das amostras está resumido na figura 2.

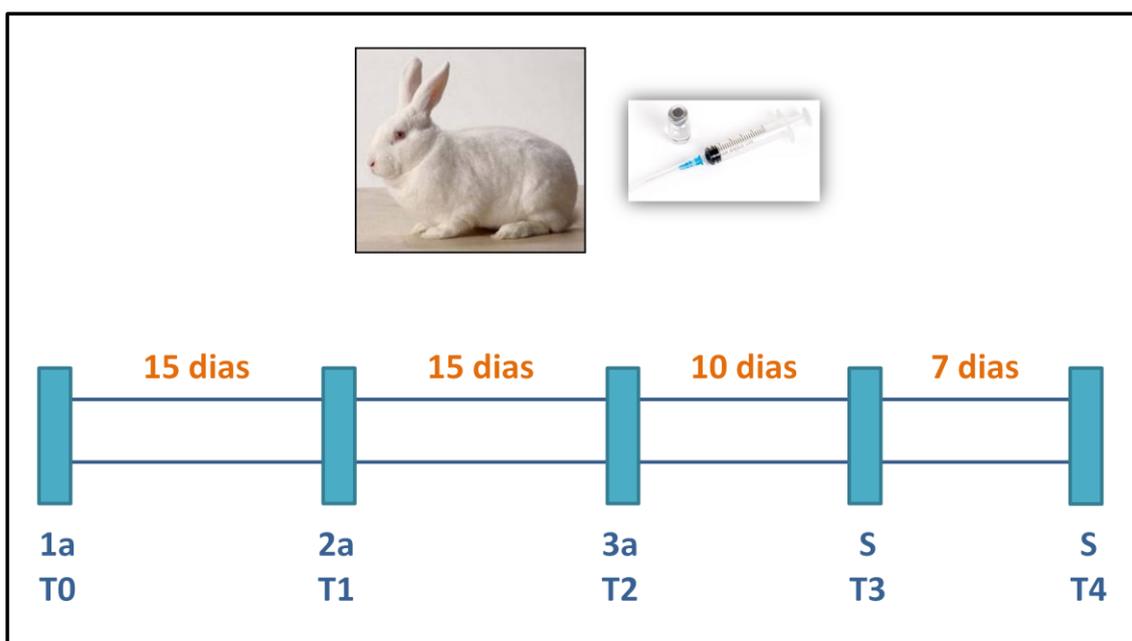


Figura 2: Esquema da inoculação das proteínas recombinantes em coelhos para a produção de anticorpos policlonais. Legenda: 1a, 2a e 3a = inoculações; S = sangria; T = tempo.

Todas as amostras foram centrifugadas logo após a coleta para a obtenção do soro e este titulado e, posteriormente, congelado. No ELISA para a titulação, as placas foram sensibilizadas com 0,5 µg/mL da proteína recombinante dissolvida em Tampão Bicarbonato pH9,6.

5.2.2. Purificação dos anticorpos policlonais

Foi realizado um gel SDS-PAGE a 12,5% de canaleta única para cada proteína, no qual foram aplicados 250 µg de proteína recombinante e, posteriormente, esse foi transferido para uma membrana de nitrocelulose.

Os soros obtidos dos coelhos foram diluídos a 1:5 em PBS 0,15 M pH7,4 com 0,25% de caseína. As membranas foram então incubadas com os soros diluídos por 1 hora à temperatura ambiente.

Foram realizadas três lavagens de 5 minutos com PBS 0,15 M pH7,4. Depois as membranas foram tratadas com 1 mL do tampão de eluição (glicina-HCl 0,1 M pH2,5). Os sobrenadantes contendo os anticorpos purificados foram recolhidos e neutralizados com PBS 0,15 M pH7,4. Os anticorpos purificados foram congelados.

5.2.3. Western Blot

Foi realizado um gel SDS-PAGE a 12,5% para cada proteína, no qual foram aplicados 2 µg de proteína recombinante por canaleta e, posteriormente, esse foi transferido para uma membrana de nitrocelulose.

As membranas foram incubadas com o tampão de bloqueio (PBS 1X, Tween 20 0,1% e leite desnatado Molico 5%) a 4°C por 18 horas.

Os soros e os anticorpos purificados foram diluídos no tampão de bloqueio para serem incubados juntos com as membranas por 1 hora à temperatura ambiente.

Foram realizadas três lavagens de 10 minutos com tampão de lavagem (PBS 1X, 0,5% Tween 20).

O conjugado anti-IgG de coelho ligado à peroxidase foi diluído no tampão de bloqueio para ser incubado junto com as membranas por 1 hora à temperatura ambiente.

Foram realizadas três lavagens de 15 minutos com tampão de lavagem (PBS 1X, 0,5% Tween 20) e uma última lavagem com PBS 1X.

Para a revelação foi utilizado ECLTM (quimioluminescência) e as membranas ficaram em exposição por 20 minutos.

5.3. ELISA

5.3.1. Padronização da técnica

O primeiro ensaio de padronização realizado foi para determinar em qual tampão - Bicarbonato em pH 9,6 ou PBS 1X em pH 7,4 - os antígenos produzidos apresentariam melhores resultados e se seria melhor utilizar a solução da proteína não dialisada (rica em ureia) ou a solução dialisada. O ELISA foi realizado utilizando os antígenos a 2,0 µg/mL, os anticorpos primários (pool de soros caninos positivos e negativos) diluídos a 1:100 e o secundário a 1:2500.

O segundo ensaio de padronização realizado foi para determinar a melhor concentração do antígeno (0,5 µg/mL ou 1,0 µg/mL), a melhor diluição do anticorpo primário (1:40, 1:100, 1:200, 1:500) e do secundário (1:1000, 1:2500, 1:5000, 1:10000). Esse ELISA também foi realizado com pool de soros caninos positivos e negativos.

5.3.2. Amostras testadas

O laboratório conta com o seguinte banco de soros:

- 10 amostras de soros de cães saudáveis, com exames parasitológicos e sorológicos negativos.
- 31 amostras de soros de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, com exames parasitológicos e sorológicos positivos, provenientes de Belo Horizonte.
- 14 amostras de soros de cães assintomáticos e 12 amostras de cães sintomáticos, com exame parasitológico positivo, sintomatologia clínica definida e ao menos um teste sorológico positivo (ELISA com antígeno bruto, rK39, A2 e rK26).
- 10 amostras de soros humanos saudáveis.
- 80 amostras de soros humanos com LV (clínico, parasitológico e sorológico), gentilmente cedidas pela Dra Eliane da FUNED.

5.3.3. ELISA com as proteínas recombinantes

Foram colocados 100 µL/well da solução da proteína recombinante não dialisada, a 1,0 µg/mL, em Tampão Bicarbonato pH9,6 (1,59 g de Na₂CO₃, 2,93 g de NaHCO₃ e água qsp 1L). A placa foi incubada overnight (+/- 18h) a 4°C.

Foram realizadas três lavagens com solução de lavagem [50 µL de Tween 20 em 100 mL de PBS 1X (8,0 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na₂HPO₄, 0,24 g de KH₂PO₄, água qsp 1L e pH7,4)] .

Para a realização do bloqueio, utilizou-se 100 µL/well da solução de 5% de leite desnatado em PBS/Tween 0,05%. A placa foi incubada por 1 hora a 37°C. Depois a solução de bloqueio foi desprezada.

Procedeu-se, então, à diluição dos anticorpos primários, definidos a partir da padronização, de acordo com o seguinte esquema:

- Soros caninos contra o antígeno C1 – 1:100;
- Soros caninos contra o antígeno C8 – 1:200;
- Soros humanos contra os antígenos C1 e C8 – 1:200.

Solução diluente utilizada: solução de 0,5% de leite desnatado Molico em PBS/Tween 0,05%. A placa foi incubada por 1 hora a 37°C.

Foram realizadas três lavagens com solução de lavagem.

Procedeu-se, então, à diluição dos anticorpos primários de acordo com o seguinte esquema:

- Anti-IgG canino ligado à peroxidase – 1:2500;
- Anti-IgG humano ligado à peroxidase – 1:1000.

Solução diluente utilizada: solução de 0,5% de leite desnatado Molico em PBS/Tween 0,05%. A placa foi incubada por 1 hora a 37°C.

Foram realizadas três lavagens com solução de lavagem.

Procedeu-se, então, ao preparo do substrato: um tablete de OPD e um tablete de H₂O₂ (SIGMAFAST™ OPD) diluídos em 20 mL de água destilada. Foram colocados 100 µL/well. A placa foi incubada no escuro por 30 minutos em temperatura ambiente. Para interromper a reação foram utilizados 25 µL de H₂SO₄ 4N (106 mL ácido sulfúrico PA em água qsp 1L). A leitura da absorvância foi realizada em 492 nm.

5.3.4. Avaliação do desempenho

Para avaliar o desempenho das proteínas recombinantes no ELISA para diagnóstico da LVC, foram calculados os parâmetros sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), razão de verossimilhança positiva (RVP) e razão de verossimilhança negativa (RVN), a partir da tabela 5 seguinte:

Tabela 5: Categorias de resultados de um teste diagnóstico em uma população de infectados e não infectados.

		Presença da infecção		TOTAL
		Presente	Ausente	
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)

$$\text{Especificidade} - E = D / (B + D)$$

$$\text{Sensibilidade} - S = A / (A + C)$$

$$\text{Valor Preditivo Positivo} - VPP = A / (A + B)$$

$$\text{Valor Preditivo Negativo} - VPN = D / (C + D)$$

$$\text{Razão de Verossimilhança Positiva} - RVP = S / (1 - E)$$

$$\text{Razão de Verossimilhança Negativa} - RVN = (1 - S) / E$$

As categorias de resultados de um teste diagnóstico significam: verdadeiro positivo = presença de infecção e teste positivo; falso positivo = ausência de infecção e teste positivo; falso negativo = presença de infecção e teste negativo; verdadeiro negativo = ausência de infecção e teste negativo.

A presença da infecção foi determinada pelo diagnóstico considerado padrão-ouro (parasitológico microscópico).

O cálculo da especificidade determina a probabilidade de um teste dar negativo na ausência da doença, isto é, avalia a capacidade do teste afastar a doença quando ela está ausente.

Por outro lado, a sensibilidade determina a probabilidade de um teste dar positivo na presença da doença, isto é, avalia a capacidade do teste detectar a doença quando ela está presente.

O valor preditivo positivo é a proporção de verdadeiros positivos entre todos os indivíduos com teste positivo. Expressa a probabilidade de um paciente com teste positivo ter a doença.

O valor preditivo negativo é a proporção de verdadeiros negativos entre todos os indivíduos com teste negativo. Expressa a probabilidade de um paciente com teste negativo não ter a doença.

A razão de verossimilhança é definida como a razão entre a probabilidade de um determinado resultado de um teste diagnóstico em indivíduos portadores da doença e a probabilidade do mesmo resultado em indivíduos sem a doença.

A razão de verossimilhança para o teste positivo expressa quantas vezes é mais provável encontrar um resultado positivo em pessoas doentes quando comparado com pessoas não doentes.

A razão de verossimilhança para o teste negativo expressa quantas vezes é mais provável encontrar um resultado negativo em pessoas doentes quando comparado com pessoas não doentes.

Além disso, a acurácia (AUC), determinada pela área sob a curva ROC, indica a proporção de todos os resultados corretos de um teste, ou seja, os “verdadeiros-positivos” e os “verdadeiros-negativos”.

6. RESULTADOS

6.1. PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Inicialmente, antes do desenho dos iniciadores, as proteínas selecionadas para este projeto foram submetidas à predição de epitopos para células B (produtoras de anticorpos), a qual foi realizada pelos programas de bioinformática ABCPRED e BCPREDS. O resultado apontou a proteína C1 apresentando pelo programa ABCPRED 27 epitopos e pelo BCPREDS 12 epitopos, enquanto a proteína C8 apresenta 12 e 6 epitopos pelos programas ABCPRED e BCPREDS respectivamente (tabela 6).

Tabela 6: Número de epitopos, com score maior que 2, preditos pelos programas ABCPRED e BCPREDS para as proteínas C8 e C1.

Programas	Nº de epitopos preditos das proteínas selecionadas	
	C8	C1
ABCPRED	12	27
BCPREDS	6	12

Posteriormente, procedeu-se ao processo de produção das proteínas de acordo com a tecnologia do DNA recombinante.

Para confirmar se houve a incorporação do vetor pela bactéria, foi realizado um gel de agarose a 1% com os produtos obtidos da PCR das colônias que cresceram após a semeadura em Agar. Houve o aparecimento de bandas correspondentes aos tamanhos esperados para o vetor-gene de cada proteína, o que pode ser visualizado na figura 3. Para a proteína C8, o tamanho da banda é de 5954 pb (597 pb gene + 5357 pb vetor). Para a proteína C1, o tamanho da banda é de 6434 pb (1077 pb gene + 5357 pb vetor).

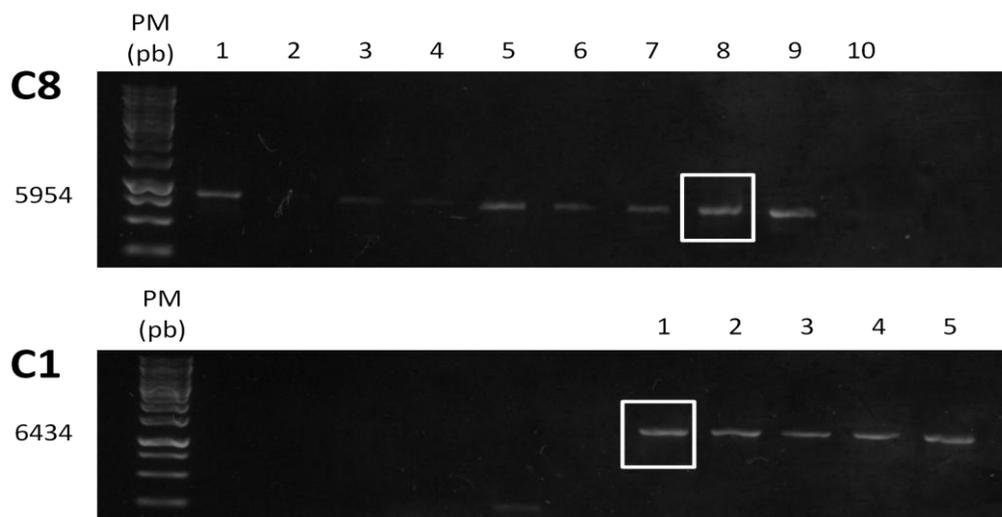


Figura 3: Gel de agarose a 1% com os produtos da PCR de colônia correspondentes às proteínas C8 e C1. Legenda: PM = padrão de massa molecular em pares de bases (pb) e canaleta de 1 a 10 contendo os produtos da PCR. Em cada canaleta foi colocada uma colônia isolada no Agar. Foram destacados pelo quadrado branco os clones selecionados para dar sequência ao trabalho.

Foram selecionados um clone de cada proteína para dar sequência ao processo de expressão.

Para a visualização do resultado do teste de expressão foi realizado um gel SDS-PAGE a 12,5%, no qual foram aplicadas as alíquotas obtidas durante todo o processo, como mostra a figura 4 abaixo. As duas proteínas apresentaram-se insolúveis, pois foram encontradas no pellet.

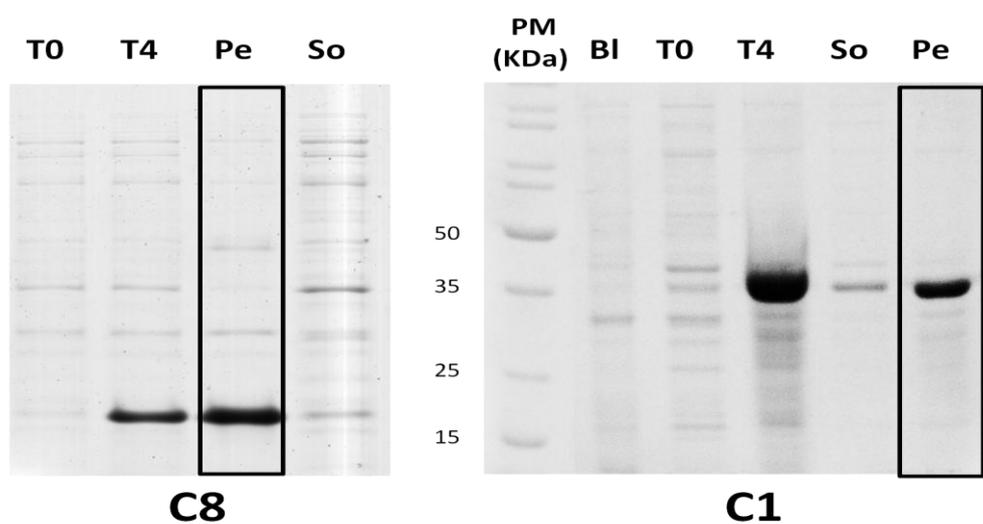


Figura 4: Gel SDS-PAGE a 12,5% referente ao teste de expressão. Legenda: T0 = antes da adição do IPTG, T4 = 4 horas após a indução, Pe = pellet, So = sobrenadante, Bl = cepa BL-21 e PM = padrão de massa molecular em kDa.

A proteína recombinante C8 foi purificada por cromatografia de afinidade, em coluna de níquel, no aparelho Akta, no qual apresentou o seguinte gráfico de eluição:

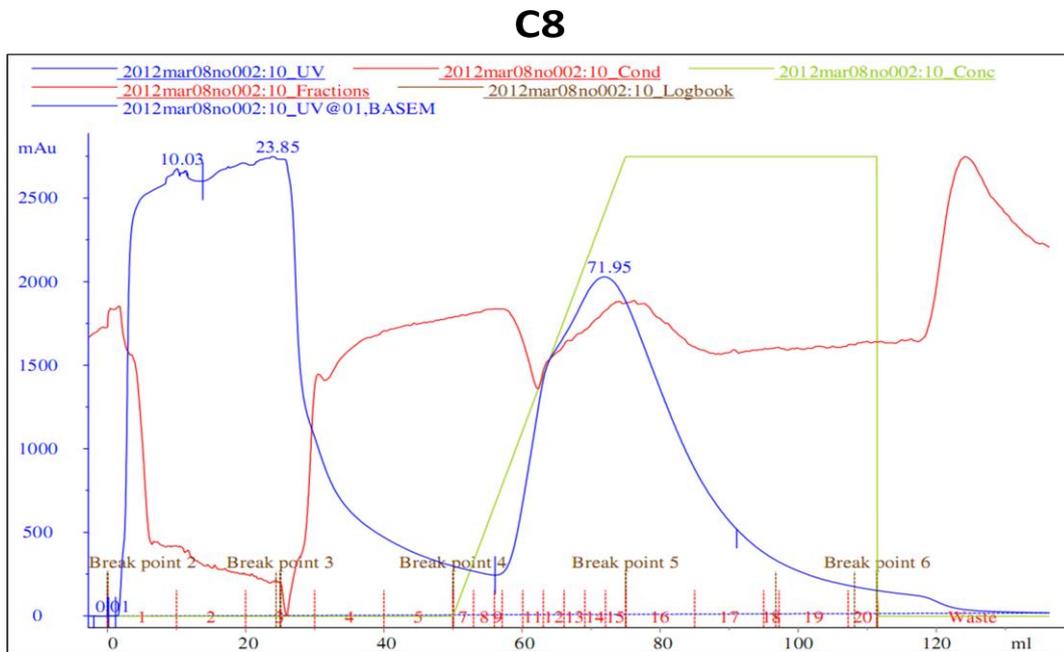


Figura 5: Gráfico da purificação da proteína C8 por cromatografia de afinidade, em uma coluna de níquel, no aparelho Akta. Legenda: linha azul = eluição da proteína, linha verde = concentração do imidazol, linha vermelha = condutância do aparelho.

Ao realizar o cálculo da área sob a curva referente à eluição da proteína e utilizando a fórmula de Lambert-Beer, pode-se obter a quantidade de proteína purificada que foi igual a 509 mg. Para verificar a presença da proteína nas frações recolhidas na cromatografia, foi realizado um gel SDS-PAGE a 12,5% corado por Coomassie R250, onde observou-se a presença da proteína produzida por apresentar massa molecular correspondente ao esperado quando comparado ao padrão.

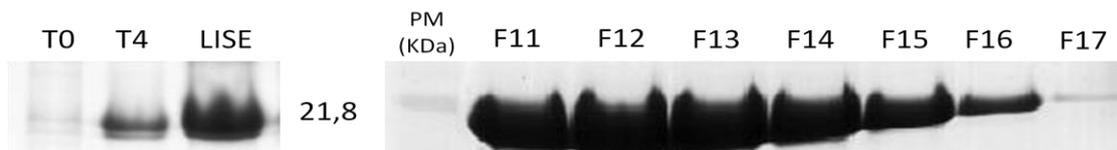


Figura 6: Gel SDS-PAGE a 12,5% referente aos processos de expressão e purificação da proteína C8. Legenda: T0 = antes da adição do IPTG, T4 = 4 horas após a indução, LISE = após a lise da bactéria, F11 a F17 = frações obtidas da cromatografia e PM = peso de massa molecular em kDa.

A proteína recombinante C1 também foi purificada por cromatografia de afinidade, em coluna de níquel, no aparelho Akta, no qual apresentou o seguinte gráfico de eluição:

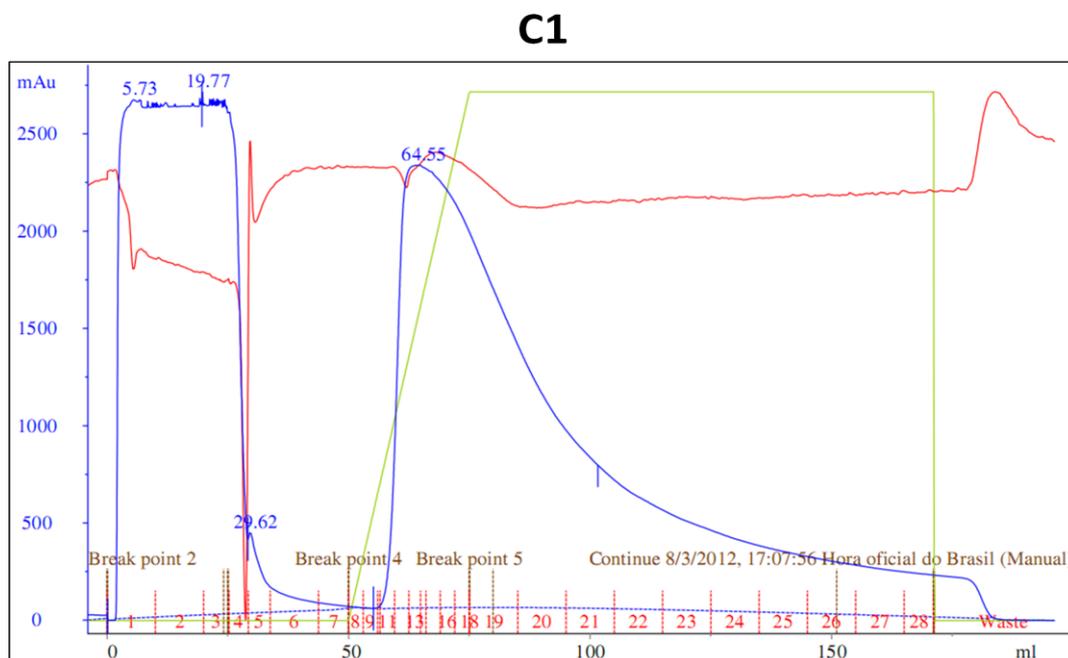


Figura 7: Gráfico da purificação da proteína C1 por cromatografia de afinidade, em uma coluna de níquel, no aparelho Akta. Legenda: linha azul = eluição da proteína, linha verde = concentração do imidazol, linha vermelha = condutância do aparelho.

Procedendo-se ao mesmo cálculo realizado anteriormente, pode-se obter a quantidade de proteína purificada que foi igual a 97 mg. Para verificar a presença da proteína nas frações recolhidas na cromatografia, foi realizado um gel SDS-PAGE a 12,5% corado por Coomassie R250, onde observou-se a presença da proteína produzida por apresentar massa molecular correspondente ao esperado quando comparado ao padrão.

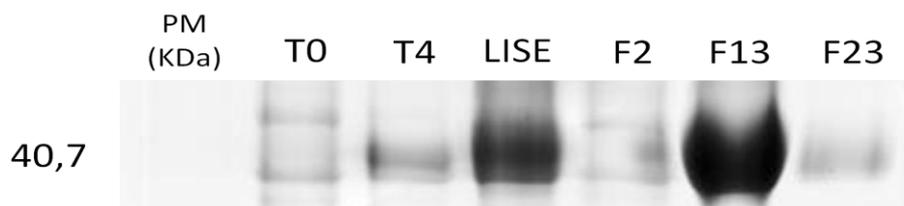


Figura 8: Gel SDS-PAGE a 12,5% referente aos processos de expressão e purificação da proteína C1. Legenda: T0 = antes da adição do IPTG; T4 = 4 horas após a indução; LISE = após a lise da bactéria; F2, F13 e F23 = frações obtidas da cromatografia e PM = peso de massa molecular em kDa.

Para verificar se as proteínas expressas e purificadas correspondiam com as proteínas esperadas, foi realizado um Western Blot, no qual as membranas foram incubadas com anticorpo anti-His. Na revelação, as bandas que apareceram correspondiam às respectivas massas moleculares considerando o padrão utilizado, como mostra a figura 9.

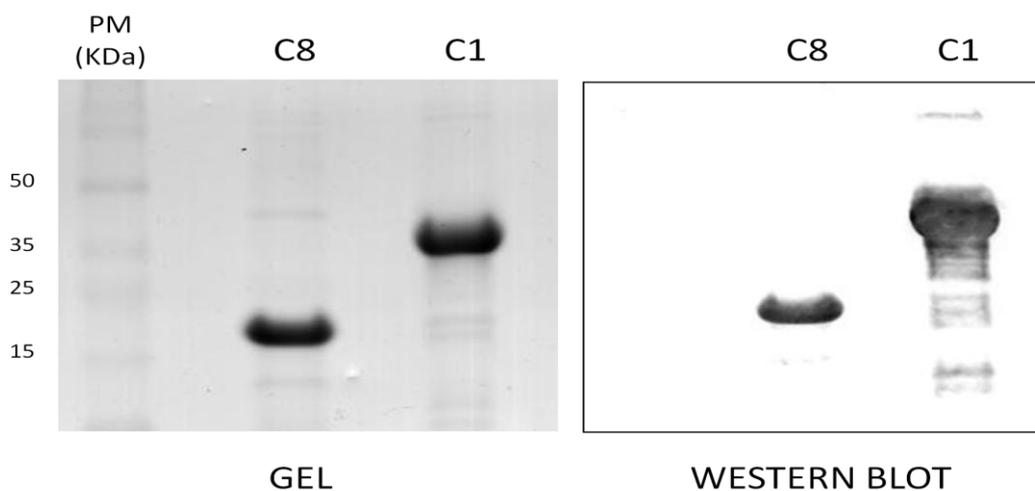


Figura 9: Gel SDS-PAGE a 12,5% com as proteínas após a purificação por cromatografia e membrana de nitrocelulose contendo as proteínas recombinantes e Western Blot revelado com anticorpo anti-his.

6.2. PRODUÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Após as imunizações e titulação dos anticorpos obtidos, observou-se que C8 mostrou-se muito imunogênica, com o soro do coelho apresentando, no tempo T4, o título de 1:40000.

Por outro lado, a proteína C1 mostrou-se pouco imunogênica, uma vez que os títulos apresentados pelo soro nos tempos T1 a T4 foram bastante oscilantes, ora aumentando ora diminuindo. Por isso, foi necessário realizar nova inoculação do antígeno com o Adjuvante Completo de Freund, seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente. Quinze dias após foram coletados 3 mL de sangue (T5) e foram esperados mais quinze dias para realizar a sangria total (T6). No final desse processo, o soro apresentou o título de 1:4000.

Para verificar se os anticorpos produzidos reconheciam corretamente as proteínas que foram utilizadas na imunização, além da titulação em ELISA, foi realizado um Western Blot. Neste, as membranas de nitrocelulose foram incubadas, separadamente, com os soros obtidos dos coelhos e com os anticorpos purificados, como mostra a figura 10. Nota-se que no processo de purificação ocorre muita perda de anticorpo, uma vez que o título caiu no mínimo cinco vezes.

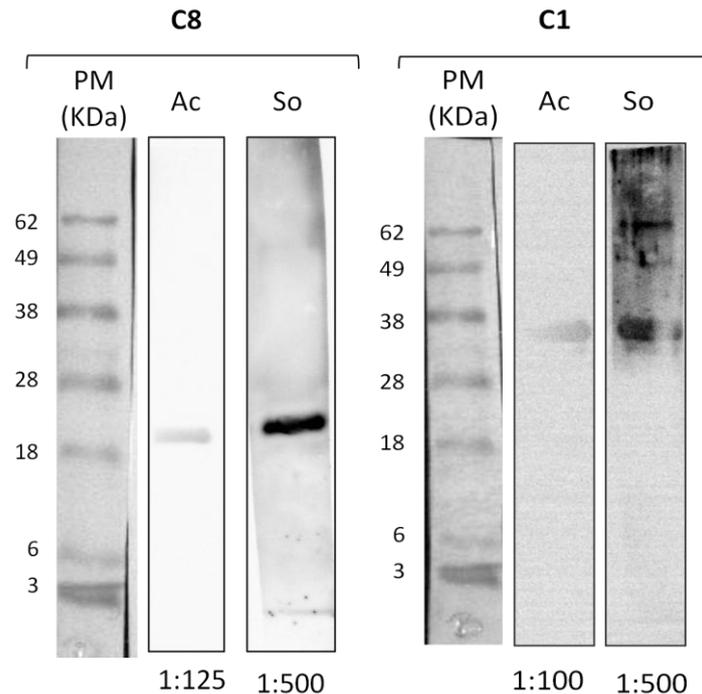


Figura 10: Western Blot usando as proteínas recombinantes e os anticorpos de coelhos imunizados com cada uma, revelado por anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase na diluição de 1:20000. Legenda: PM = padrão de massa molecular em kDa; Ac = anticorpo purificado diluído a 1:125 e 1:100; So = soro de coelho diluído a 1:500.

6.3. ELISA

6.3.1. Padronização da técnica

O primeiro ensaio de padronização foi realizado para determinar em qual tampão - Bicarbonato em pH 9,6 ou PBS em pH 7,4 - os antígenos produzidos apresentariam melhores resultados e se seria melhor utilizar a solução da proteína não dialisada (rica em ureia) ou a solução dialisada.

Através da análise dos gráficos apresentados na figura 11, pode-se concluir que os melhores resultados ocorreram na utilização do tampão Bicarbonato em pH 9,6 e da solução da proteína não dialisada, porque foram nessas condições que ocorreram as maiores distâncias entre o pool de soros positivos e o pool de soros negativos.

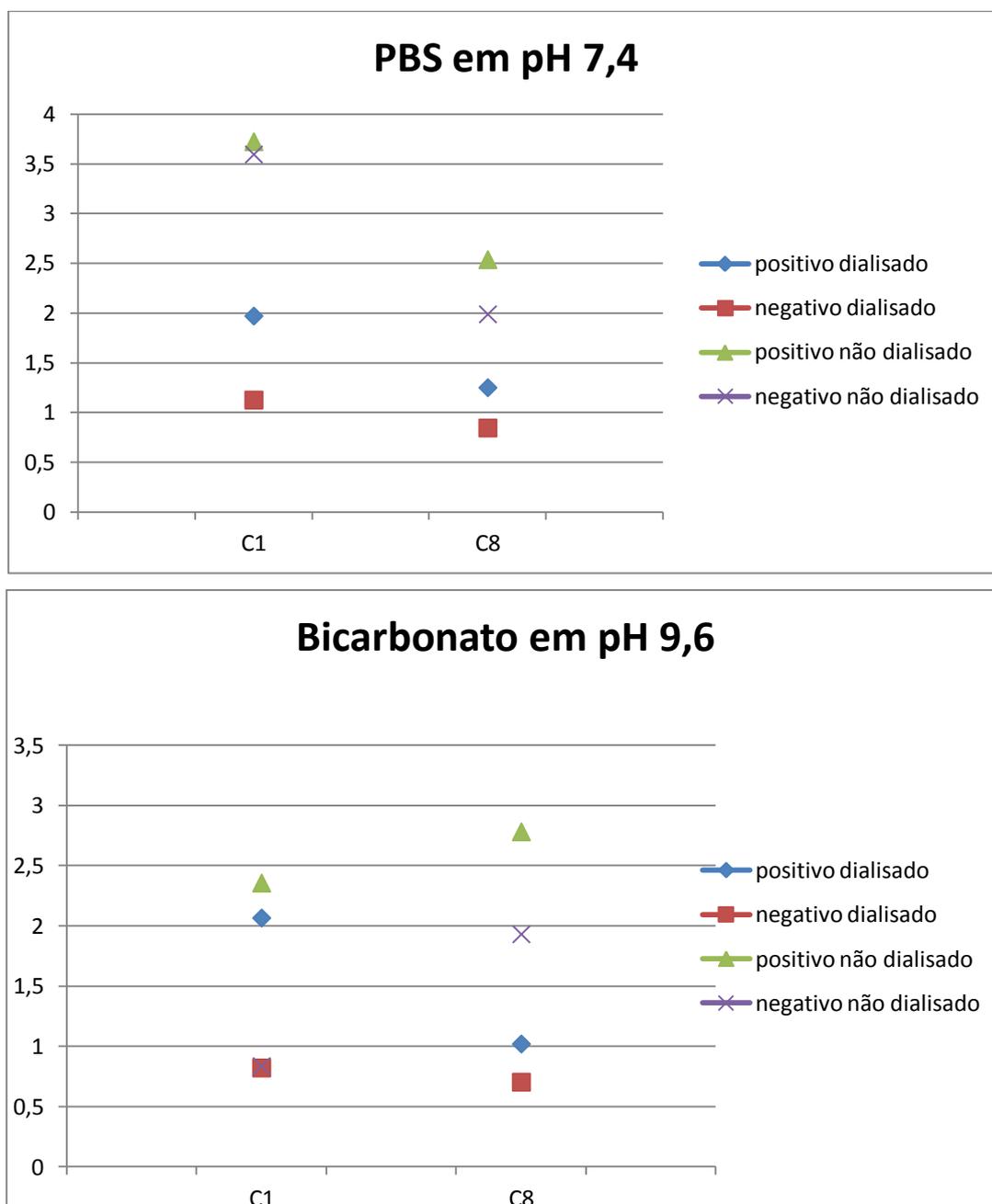


Figura 11: Gráficos do primeiro ensaio de padronização do ELISA. No eixo das ordenadas está a absorvância e no das abcissas as proteínas C8 e C1. Legenda: positivo dialisado = pool de soros positivos contra solução de antígeno dialisada; negativo dialisado = pool de soros negativos contra solução de antígeno dialisada; positivo não dialisado = pool de soros positivos contra solução de antígeno não dialisada; negativo não dialisado = pool de soros negativos contra solução de antígeno não dialisada.

O segundo ensaio de padronização realizado foi para determinar a melhor concentração do antígeno (0,5 µg/mL ou 1,0 µg/mL), a melhor diluição do anticorpo primário (1:40, 1:100, 1:200, 1:500) e do secundário (1:1000, 1:2500, 1:5000, 1:10000).

Através da análise dos gráficos apresentados na figura 12, pode-se concluir que os melhores resultados ocorreram na concentração de 1,0 µg/mL para ambos os antígenos, a diluição do anticorpo primário contra C8 foi 1:200 e contra C1 foi 1:100 e a diluição do secundário ideal contra ambos os antígenos foi 1:2500. Esses valores foram determinados pelas maiores distâncias entre o pool de soros positivos e o pool de soros negativos.

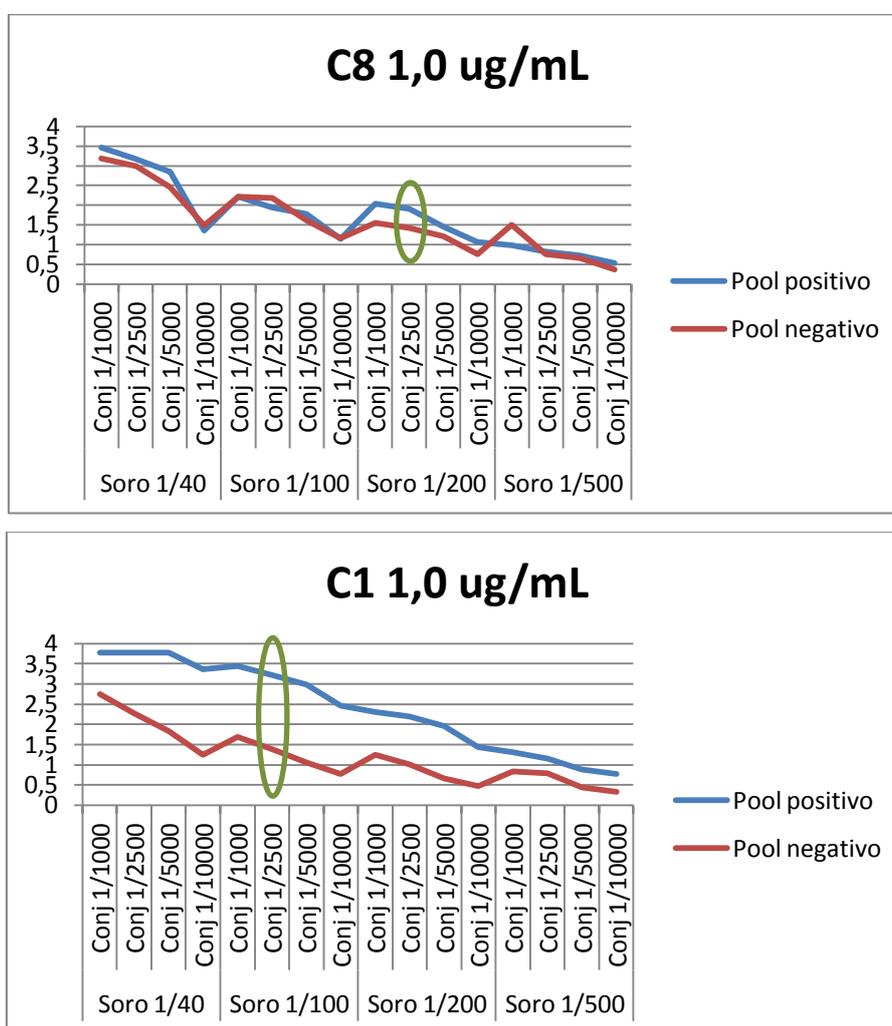


Figura 12: Gráficos do segundo ensaio de padronização do ELISA. No eixo das ordenadas está a absorvância e no das abscissas as diluições dos anticorpos primários (soro) e secundário (conj). Os melhores resultados estão destacados pelo círculo verde.

6.3.2. ELISA com as proteínas recombinantes

A) Avaliação as proteínas recombinantes como antígeno no ELISA para LVC

Primeiramente, foi realizado o ELISA das proteínas recombinantes contra os soros caninos, de acordo com o procedimento descrito anteriormente. A Tabela 7 resume os resultados observados.

Tabela 7: Resultado do ELISA para cães utilizando o antígeno C8 em comparação com o padrão-ouro.

		Presença da infecção		TOTAL
		Presente	Ausente	
Resultado do ELISA	Positivo	43	1	44
	Negativo	14	9	23
TOTAL		57	10	67

Para o antígeno C8 foram obtidos os seguintes resultados, calculados conforme a tabela 7:

- Especificidade = 90% e Sensibilidade = 75%;
- VPP = 0,97 e VPN = 0,39;
- RVP = 7,5 e RVN = 0,28.

Baseando-se no gráfico e na curva ROC, elaborados no programa GraphPad Prism 5.0 e apresentados na figura 13, pode-se obter os seguintes resultados:

- Acurácia = 0,86;
- Pvalor = 0,00029;
- Cut off = 1,30.

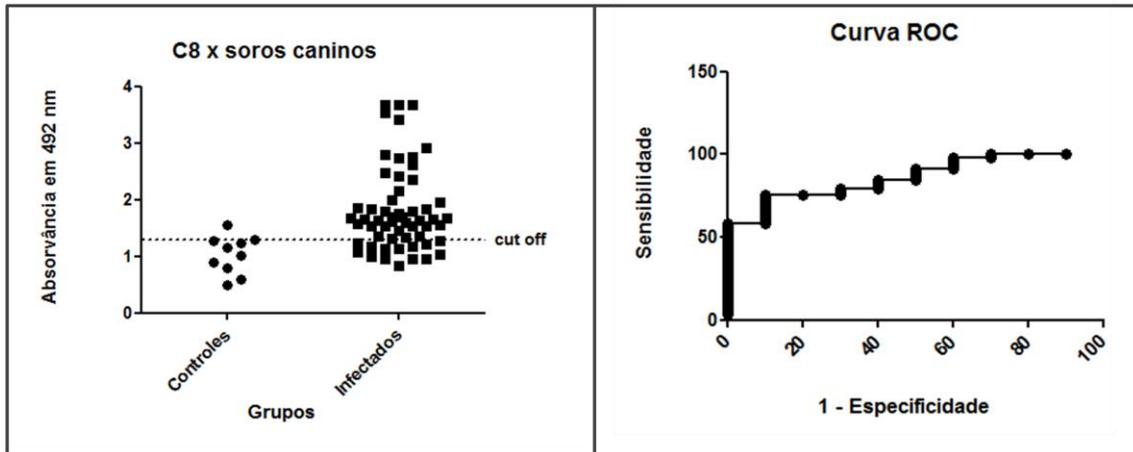


Figura 13: Gráfico da absorvância dos soros caninos dos grupos controles e infectados contra o antígeno C8 e a sua respectiva curva ROC.

Como o Pvalor foi menor que 0,05 (0,00029), concluímos que houve diferença significativa entre os grupos controles e infectados. Foi determinado o cut off de 1,30, no qual obteve-se um elevado valor de especificidade (90%).

Analisando separadamente os grupos de amostras testados, observamos que:

- entre os 14 cães doentes assintomáticos, foram identificados como positivos 11 (78%);
- entre os 12 cães doentes sintomáticos, foram identificados como positivos 7 (58%);
- entre os 31 cães infectados, foram identificados como positivos 25 (81%);
- entre os 10 cães negativos, foram identificados como negativos 9 (90%).

Com isso observamos que o ELISA com o antígeno C8 apresenta alguns resultados falsos negativos, mas o teste apresentou elevada especificidade sendo útil para determinar os verdadeiros negativos.

A Tabela 8 resume o resultado observado do ELISA realizado com o antígeno C1.

Tabela 8: Resultado do ELISA para cães utilizando o antígeno C1 em comparação com o padrão-ouro.

		Presença da infecção		TOTAL
		Presente	Ausente	
Resultado do ELISA	Positivo	46	4	50
	Negativo	11	6	17
TOTAL		57	10	67

Para o antígeno C1 foram obtidos os seguintes resultados, calculados conforme a tabela 8:

- Especificidade = 60% e Sensibilidade = 80%;
- VPP = 0,92 e VPN = 0,35;
- RVP = 2 e RVN = 0,33.

Baseando-se no gráfico e na curva ROC, elaborados no programa GraphPad Prism 5.0 e apresentados na figura 14, pode-se obter os seguintes resultados:

- Acurácia = 0,76;
- Pvalor = 0,00086;
- Cut off = 0,98.

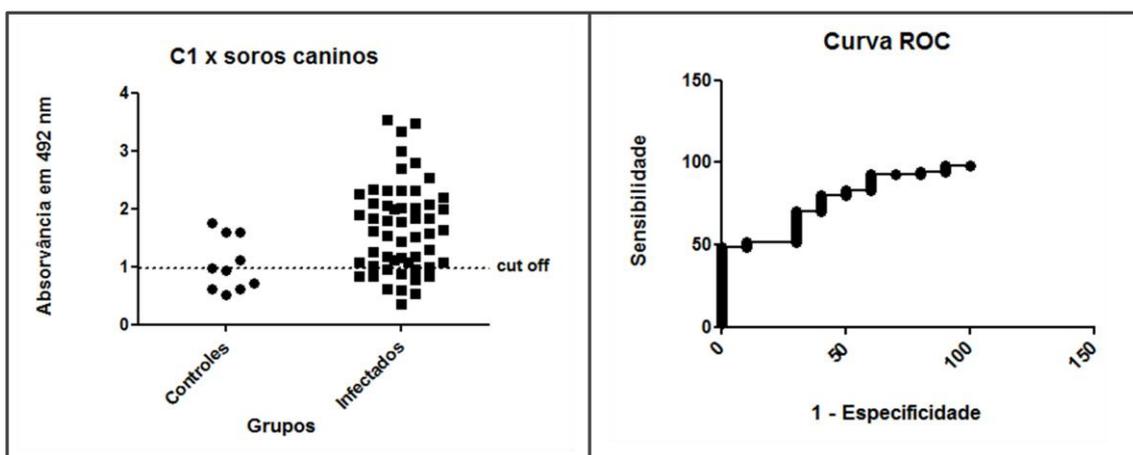


Figura 14: Gráfico da absorvância dos soros caninos dos grupos controles e infectados contra o antígeno C1 e a sua respectiva curva ROC.

Como o Pvalor foi menor que 0,05 (0,00086), concluímos que houve diferença significativa entre os grupos controles e infectados. Foi determinado o cut off de 0,98, no qual obteve-se um excelente valor de sensibilidade (80%).

Analisando separadamente os grupos de amostras testados, observamos que:

- entre os 14 cães doentes assintomáticos, foram identificados como positivos 14 (100%);
- entre os 12 cães doentes sintomáticos, foram identificados como positivos 10 (83%);
- entre os 31 cães infectados, foram identificados como positivos 22 (71%);
- entre os 10 cães negativos, foram identificados como negativos 6 (60%).

Com isso observamos que o ELISA com o antígeno C1 apresenta alguns resultados falsos positivos, mas o teste apresentou elevada sensibilidade sendo útil para determinar os verdadeiros positivos.

Para visualizar melhor a comparação entre os dois antígenos testados, foi elaborada a seguinte tabela (tabela 9):

Tabela 9: Comparação do desempenho do ELISA para cães realizado com os antígenos C8 e C1.

Antígeno	Cut off	E (%)	S (%)	AUC	As (n=14)	Sin (n=12)	In (n=31)
C8	1,30	90	75	0,86	11 (78%)	7 (58%)	25 (81%)
C1	0,98	60	80	0,76	14 (100%)	10 (83%)	22 (71%)

E = especificidade; S = sensibilidade; AUC = acurácia; As = cães assintomáticos; Sin = cães sintomáticos; In = cães infectados.

B) Avaliação as proteínas recombinantes como antígeno no ELISA para LVH

Posteriormente, foi realizado o ELISA das proteínas recombinantes contra os soros humanos, de acordo com o procedimento descrito anteriormente.

Para o antígeno C8 não houve diferença significativa entre os grupos controles e infectados, como mostra a figura 15, pois o Pvalor foi 0,82 (maior que 0,05). Além disso, a acurácia foi de 0,53 – muito baixa.

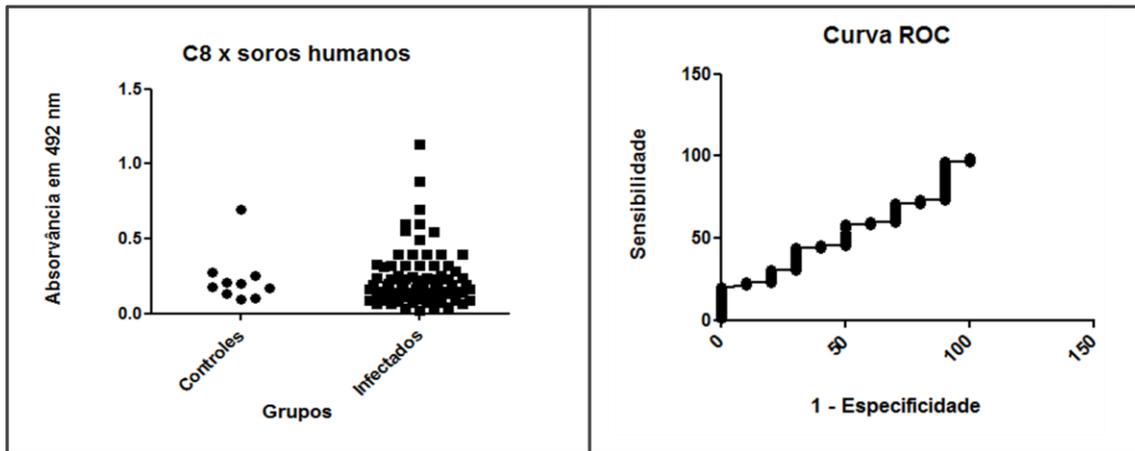


Figura 15: Gráfico da absorvância dos soros humanos dos grupos controles e infectados contra o antígeno C8 e a sua respectiva curva ROC.

Para o antígeno C1 também não houve diferença significativa entre os grupos controles e infectados, como mostra a figura 16, pois o Pvalor foi 0,058 (maior que 0,05). Além disso, a acurácia foi de 0,68 – também muito baixa.

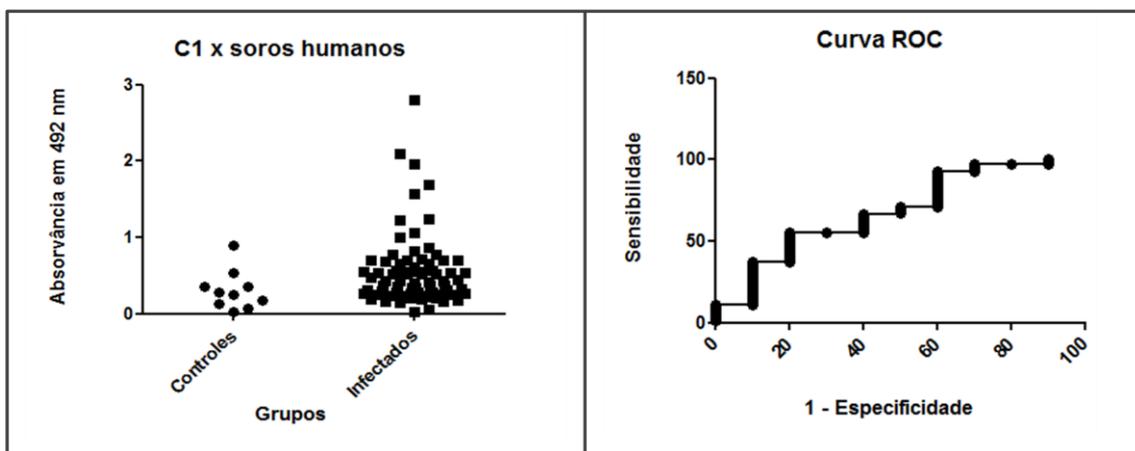


Figura 16: Gráfico da absorvância dos soros humanos dos grupos controles e infectados contra o antígeno C1 e a sua respectiva curva ROC.

Portanto, as proteínas recombinantes em estudo não são bons antígenos em um teste de ELISA para detectar a leishmaniose visceral humana.

7. DISCUSSÃO

Leishmaniose visceral é uma doença parasitológica potencialmente fatal que ocorre nos países tropicais e subtropicais, causada por membros do complexo *Leishmania donovani* – *L. donovani* no leste africano e no subcontinente indiano e *L. infantum* na Europa, norte africano e na América Latina. Por ano, são estimados 0,5 milhões de novos casos e mais de 50 mil mortes por LV (Desjeux 2004).

Com o aumento da incidência de resistência aos medicamentos nas áreas endêmicas, o diagnóstico preciso e a detecção dos casos na fase inicial para a realização do tratamento efetivo são componentes essenciais para o controle da LV, o qual é necessário para interromper o ciclo vicioso de transmissão (Srivastava et. al 2011).

Para o diagnóstico, até recentemente, eram utilizadas técnicas complexas e invasivas (exame microscópico direto de aspirados de baço, linfonodo e medula óssea). Os avanços tecnológicos têm levado a significativas melhorias no desenvolvimento de novos instrumentos de diagnóstico que são úteis na rápida avaliação da doença com o objetivo de permitir o desenho racional de estratégias de controle (Boelaert et. al 2008).

Idealmente, um teste deve fazer a distinção entre a doença na fase aguda e uma infecção assintomática. Além disso, esses testes devem ser altamente sensíveis e específicos, simples e acessíveis (Srivastava et. al 2011).

A disponibilidade de sequências genômicas de vários parasitos de importância médica levou ao progresso exponencial da compreensão da biologia e da identificação de potenciais alvos para intervenção (de Azevedo et. al 2009). Além disso, avanços contínuos na tecnologia de sequenciamento do genoma é uma grande promessa para a realização de objetivos semelhantes para praticamente qualquer parasito de interesse (Coombs A 2008).

O desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico para doenças causadas por protozoários requer quantidades substanciais ou do parasito em estágios particulares do ciclo de vida ou a seleção de proteínas expressas nas fases do ciclo. Para a seleção de proteínas, a proteína recombinante deve representar precisamente a equivalente nativa, caso contrário, o desenvolvimento do teste pode ser comprometido. O diagnóstico sorológico para tripanosomíase, babesiose, malária e leishmaniose depende de antígenos recombinantes (Fernández-Robledo et al. 2010).

Para a obtenção das proteínas recombinantes deste estudo foi utilizado o plasmídeo Pet-Tev, que expressa a proteína fusionada com uma cauda de histidina. A

cauda de histidina facilita a purificação da proteína através da utilização de colunas de Níquel Sepharose (Hwang and Chung 2002). Posteriormente, as proteínas recombinantes purificadas foram testadas em Western Blot com anti-His para verificar se os processos de produção e purificação foram corretos, como comprova a figura 9.

O sistema de expressão em *E. coli* é o mais comumente utilizado para a produção industrial de proteínas recombinantes para diversas aplicações farmacêuticas. Organismos procarióticos crescem rapidamente e em altas densidades em meio de crescimento relativamente barato, são fáceis de transformar e podem produzir grandes quantidades de produtos recombinantes solúveis. Além disso, vários vetores para o acoplamento do gene correspondente à proteína e células hospedeiras estão disponíveis (Terpe 2006).

A produção das proteínas do presente trabalho de forma recombinante se mostrou prática e eficiente, uma vez que foi desnecessário realizar o passo de clonagem inicial, ou seja, os produtos da PCR foram ligados diretamente no vetor de expressão – Pet-TeV. Além disso, foi de elevada produtividade, pois com apenas 1 litro de meio para expressão obtivemos grande quantidade das proteínas – C8 com 509 mg e C1 com 97 mg.

As limitações do sistema de expressão procariótico incluem a ausência de modificações pós-transcricionais, substituições ou modificações de aminoácidos, produtos heterogêneos, contaminação com endotoxina e acúmulo do produto recombinante como corpo de inclusão. Para as proteínas de protozoários, as taxas globais de sucesso para obter o produto recombinante solúvel em sistema procariótico permanecem baixas (Fernández-Robledo et al. 2010).

Como os nossos produtos recombinantes ficaram acumulados em corpos de inclusão, ou seja, foram expressos de forma insolúvel, para a purificação das proteínas produzidas foi necessário utilizar ureia, um composto solubilizante. Mas, mesmo a ureia sendo uma substância desnaturante, a sua presença na solução não atrapalhou os ensaios do ELISA. Os corpos de inclusão não significaram uma limitação para o nosso trabalho. Li et. al (2004) afirmaram que existem vantagens para a expressão em corpos de inclusão, entre elas: os níveis de expressão são frequentemente mais altos, as proteínas são protegidas da degradação proteolítica e os corpos de inclusão são facilmente separados das proteínas solúveis.

Por sua vez, para a imunização dos coelhos foi necessário realizar a retirada da ureia da solução, através da diálise, pois a ureia é uma substância muito tóxica para os

animais. Com esse procedimento, ocorreu a precipitação das proteínas, o que não foi um empecilho para a inoculação nos animais, pois foi preparada uma suspensão com o auxílio do adjuvante.

A ausência de modificações pós-transcricionais, inicialmente, não foi uma preocupação para o nosso grupo, pois, um dos critérios de seleção das proteínas foi a predição de epítopos lineares para células B (células produtoras de anticorpos). Para isso, os programas de bioinformática utilizados consideram certas propriedades físico-químicas dos aminoácidos, como: hidrofobicidade e flexibilidade, além da localização do epítopo linear dentro da sequência proteica (El-Manzalawy et. al 2008).

Os epítopos para células B podem ser classificados em dois tipos: linear (contínuo) ou conformacional (descontínuo). Epítopos lineares são peptídeos pequenos, correspondendo a um fragmento de sequência contínua de aminoácidos em uma proteína. Em contraste, epítopos conformacionais são compostos por aminoácidos que não estão em sequência na estrutura primária, mas estão localizados em proximidade estreita na estrutura secundária da proteína. Mesmo acreditando que a maioria dos epítopos para células B sejam descontínuos, a identificação experimental tem focado principalmente em epítopos lineares, pois o desenvolvimento dos programas de predição tem sido um desafio para a biologia computacional e a bioinformática (El-Manzalawy et. al 2008).

Porém, contrariando as análises realizadas pelos programas de bioinformática, as quais apontaram a proteína C1 como a que possui mais epítopos lineares para células B preditos (ABCPRED = 27 e BCPREDS = 12), e pelo trabalho de Faria et. al 2011, no qual a proteína C1 aparece como a que possui mais peptídeos reativos especificamente contra soros caninos com LV (3 peptídeos), no processo de imunização dos coelhos, foi a proteína C8 que estimulou a maior produção de anticorpos. Isso foi observado na titulação dos soros dos coelhos e no Western Blot. E essa revelação realizada com os soros dos coelhos mostrou claramente que os anticorpos produzidos eram específicos contra as proteínas recombinantes utilizadas na inoculação. Possivelmente, como já referido, os epítopos conformacionais foram mais importantes nesse processo do que os epítopos lineares preditos.

Posteriormente, foi realizada a padronização do ELISA, utilizando como antígenos as proteínas recombinantes produzidas. Para isso, foi feita uma busca na literatura quanto aos tampões, concentrações dos antígenos e dos anticorpos primário (pool dos soros positivos e negativos) e secundário (conjugado) mais utilizados. Após a

análise do resultado, os melhores valores foram usados para montar o protocolo para a utilização do ELISA com os soros individuais.

As proteínas recombinantes em estudo, ao serem testadas em ELISA para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana, não apresentaram resultados significativos para diferenciar os pacientes infectados dos saudáveis. Por isso, não foram consideradas bons antígenos para esse método de diagnóstico. Na literatura não é frequente publicações de proteínas recombinantes em diagnóstico de LV humana.

Por outro lado, ao serem testadas em ELISA para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, as proteínas recombinantes apresentaram resultados significativos. Essas proteínas foram selecionadas a partir de estudos de triagem realizados apenas com soros caninos por Costa et al. (2011) e Faria et al. (2011). Além disso, o processamento e a apresentação de antígenos ocorrem de maneira diferente entre as espécies de hospedeiros. 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). Os MHCs são variáveis dentro e entre as diferentes espécies de mamíferos, assim em humanos o MHC é denominado HLA (Antígenos Leucocitários Humanos) e em caninos DLA (Antígenos Leucocitários de Cães). Essas moléculas são variáveis principalmente em relação à região de ligação do antígeno, que se dá por complementariedade das sequências de aminoácidos (Tizard 2009).

O trabalho de Faria et al. (2011) consistiu na identificação, produção e teste em ELISA de peptídeos sintéticos como novos antígenos para o diagnóstico da LVC. Nesse trabalho foram selecionados 2 peptídeos da proteína C8 e 8 peptídeos da proteína C1, sendo que após seleção por testes de especificidade 1 peptídeo da proteína C1 foi testado em ELISA contra 20 soros negativos para LVC e 62 soros com LVC, sendo 39 de cães assintomáticos e 23 sintomáticos. Os resultados foram analisados por curva ROC, apresentando AUC de 0,797, especificidade de 70% e sensibilidade de 75,8%, com identificação de 92,3% dos cães assintomáticos.

Como antígeno no ELISA, a proteína C1 apresentou 60% de especificidade e 80% de sensibilidade, comparando como os dados obtidos por Faria et al., (2011) em relação ao peptídeos dessa proteína, os valores de sensibilidade foram muito semelhantes (75,8% e 80%) e a especificidade do peptídeo foi maior do que o da proteína. Em geral, o uso de peptídeos sintéticos aumenta a especificidade de imunoenaios (Ferrer et al. 2003). Porém, vale destacar que a C1 conseguiu identificar

100% dos cães assintomáticos enquanto a C8 identificou apenas 78% destes. Por outro lado, a proteína recombinante C8 apresentou 75% de sensibilidade e 90% de especificidade, que são considerados valores bons. No estudo realizado por Ribeiro et. al (2011), os valores médios das absorvâncias obtidos para a detecção de IgG e as subclasses IgG1 e IgG2 em cães sintomáticos naturalmente infectados foram mais elevados do que em cães assintomáticos, em ELISA utilizando antígeno bruto de *L. infantum*, uma observação que também foi relatada por Iniesta et. al (2005). Isso demonstra o quanto é difícil fazer o diagnóstico sorológico de cães assintomáticos com leishmaniose visceral.

Outras proteínas recombinantes muito estudadas para o diagnóstico da LVC, como a rK39 e a rK26, apresentam valores de sensibilidade e especificidade maiores do que os encontrados aqui. No trabalho realizado por Rosário et. al 2005, utilizando amostras de 106 cães de Janaúba positivos para LV e 25 cães criados no canil do departamento de Parasitologia/UFMG negativos para LV, para a rK39 os resultados foram de 98,1% (92,7-99,7%) e 100 (83,4-100), respectivamente, e para a rK26 foram de 99,1 (94,1-100) e 96 (77,7-99,8), respectivamente. Além disso, para a detecção de cães assintomáticos elas também apresentaram valores elevados, sendo a que rK39 identificou 93,7% dos cães enquanto a rK26 identificou 98%.

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. A expressão foi realizada em *Escherichia coli*, na qual obtiveram 10 mg da proteína por litro de indução. Como antígeno no teste de ELISA, as placas foram sensibilizadas com uma solução da proteína quimérica na concentração de 0,5 µg/mL. Os resultados apresentados foram: especificidade de 99% para ambos os grupos controles de amostras humanas (n = 180) e caninas (n = 343), enquanto a sensibilidade foi maior para o grupo canino com LV (96%, n = 213) do que o grupo humano com LV (82%, n = 185).

Comparando os resultados obtidos do valor preditivo positivo dos antígenos em teste, que é a proporção de verdadeiros positivos entre todos os indivíduos com teste positivo, o C8 apresentou resultado igual a 97% enquanto o do C1 foi 92%. Esse parâmetro expressa a probabilidade de um paciente com teste positivo ter a doença. Então conclui-se que o antígeno C8 tem o melhor resultado.

Corroborando com o resultado do valor preditivo positivo tem a razão de verossimilhança para o teste positivo (RVP) que expressa quantas vezes é mais provável encontrar um resultado positivo em pessoas doentes quando comparado com pessoas

não doentes. O resultado para o antígeno C8 foi 7,5 enquanto para o C1 foi 2,0, ou seja, o resultado do C8 foi 3,75 vezes maior que do C1.

A curva ROC tem se mostrado uma ferramenta bastante útil na avaliação de métodos diagnósticos, pois estes fornecem dados de distribuição assimétrica, o que torna necessário o uso de ferramentas que considerem vários parâmetros simultaneamente. Por ser bidimensional, a curva ROC plota os valores de sensibilidade no eixo X (também chamados de verdadeiros positivos) e valores complementares da especificidade ($1 - \text{especificidade}$) no eixo Y (também chamados de falsos positivos). Dessa maneira, em cada cut off escolhido, tem-se valores correspondentes de sensibilidade e especificidade. Além disso, outro parâmetro importante fornecido pela curva ROC é a AUC (área sob a curva), que permite que sejam sumarizadas todas as possíveis combinações de sensibilidade e especificidade num único valor, que varia de 0,0 a 1,0. Consequentemente, é possível comparar diferentes métodos diagnósticos através da transformação da curva ROC em um único valor escalar: AUC (Greiner et. al 2000).

Comparando, então, os valores da AUC apresentados pelos antígenos C8 (0,86) e C1 (0,76), podemos concluir que o antígeno C8 foi o melhor. Isso indica que no diagnóstico realizado com C8, ocorre a melhor proporção de todos os resultados corretos de um teste, ou seja, os “verdadeiros-positivos” e os “verdadeiros-negativos”.

8. CONCLUSÕES

- A produção das proteínas C8 e C1 de forma recombinante foi prática, eficiente e de elevada produtividade.
- A produção de anticorpos contra a proteína recombinante C8 foi mais eficiente, uma vez que esta se mostrou mais imunogênica em comparação com a proteína recombinante C1.
- No ELISA com soros caninos, o antígeno C8 obteve elevada especificidade (90%), o qual seria ideal para compor um teste confirmatório. Além disso, este é o antígeno que no método diagnóstico em teste apresenta os resultados mais confiáveis para os “verdadeiros-positivos” e os “verdadeiros-negativos”.
- No ELISA com soros caninos, o antígeno C1 identificou todos os cães infectados assintomáticos, apresentando para este grupo sensibilidade de 100%.
- No ELISA com soros humanos, os antígenos não foram eficientes para diferenciar pacientes positivos e negativos para leishmaniose visceral humana.

9. PERSPECTIVAS

- Utilizar os anticorpos policlonais produzidos nos coelhos em ensaios de localização celular das proteínas na *L. infantum*, através da técnica de microscopia confocal.
- Utilizar os anticorpos policlonais para avaliar o nível de expressão das proteínas nas espécies de *Leishmania* mais frequentes no Brasil, como *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*.
- Avaliar a possibilidade de reações cruzadas dos antígenos em ELISA com amostras de cães infectados por *Trypanosoma cruzi*, *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e *L. braziliensis*.
- Validar o ELISA com os antígenos em estudo, testando-os contra um banco de soros maior e oriundos de diferentes áreas endêmicas.
- Testar os dois antígenos juntos no mesmo ELISA.
- Testar o antígeno C8 como vacina.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J 2004. Canine Leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* 57, 1-88.
- Amorim AG, Carrington M, Miles MA, Barker DC, de Almeida ML 1996. Identification of the C-terminal region of 70 kDa heat shock protein from *Leishmania (Viannia) braziliensis* as a target for the humoral immune response. *Cell Stress Chaperon* 1, 177-187.
- 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.
- Artan R, Yilmaz A, Akçam M, Aksoy NH 2006. Liver biopsy in the diagnosis of visceral leishmaniasis. *J Gastroenterol Hepatol.* 21: 299-302.
- Ashford RW 1996. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin. Derm.* 14, 523-532.
- Ashford RW 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30, 1269-1281.
- Baleeiro C, Paranhos-Silva M, Santos J, Oliveira G, Nascimento E, Carvalho L, Santos W 2006. Montenegro's skin reactions and antibodies against different *Leishmania* species in dogs from a visceral leishmaniasis endemic area. *Vet Parasitol.* 139, 21-28.
- Baneth G, Aroch I 2008. Canine leishmaniasis – a diagnostic and clinical challenge. *Vet. J.* 175, 14-15.
- Barbosa De Deus R, Mares-Guia ML, Nunes AZ, Costa KM, Junqueira RG, Mayrink W, Genaro O, Tavares CAP 2002. *Leishmania major* like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *Clin. Diag. Lab. Immun.* 9, 1356-1361.
- 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.
- Boelaert M, El-Safi S, Hailu A, Mukhtar M, Rijal S, Sundar S, Wasunna M, Aseffa A, Mbui J, Menten J, Desjeux P, Peeling RW 2008. Diagnostic tests for

kala-azar: a multi-centre study of the freeze-dried DAT, rK39 strip test and KAtex in East Africa and the Indian subcontinent. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102, 32-40.

- Campino L, Santos-Gomes G, Riça-Capela M, Cortes S, Abranches P 2000. Infectivity of promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum* in canine model for leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 97, 269-275.
- 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.
- Castellano RL 2005. Resposta immune anti-*Leishmania* e mecanismos de evasão. *Vitae Academia Biomédica Digital*, n.25.
- Coombs A 2008. The sequence shakeup. *Nat. Biotechnol.* 26, 1109-1112.
- 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 MM, Andrade HM, Bartholomeu DC, Freitas LM, Pires SF, Chapeaurouge AD, Perales J, Ferreira AT, Giusta MS, Melo MN, Gazzinelli RT 2011. Analysis of *Leishmania infantum* by 2-D Difference Gel Electrophoresis (2-D DIGE) and Immunoproteomic: Identification of Novel Candidate Antigens for Diagnostic Tests and Vaccine. *J. Proteome Res.* 10, 2172-2184.
- da Silva ES, van der Meide WF, Schoone GJ, Gontijo CMF, Schaling HDFH, Brazil RP 2006. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assay. *Vet. Res. Commun.* 30, 637-643.
- Dantas-Torres F 2006. Leishmune vaccine: the newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniasis and its potential as transmission-blocking vaccine. *Vet. Parasitol.* 141, 1-8.
- de Azevedo WF, Jr and Soares MB 2009. Selection of targets for drug development against protozoan parasites. *Curr. Drug Targets* 10, 193-201.

- Del Olmo ML, Aller de la Fuente R, Velayos Jiménez B, Fernández Salazar L, González Hernández JM 2009. Visceral leishmaniasis diagnosed by duodenal biopsy. *Ver Esp Enferm Dig.* 101: 439-440.
- Desjeux P 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 305-318.
- El-Manzalawy Y, Dobbs D, Honavar V 2008. Prediction linear B-cell epitopes using string Kernels. *J. Mol. Recog.* 21(4): 243-255.
- Evans D 1989. Handbook on Isolation Characterization and Cryopreservation of *Leishmania*. World Health Organization, Geneva, Switzerland, pp 45.
- 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, no. 5.
- 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.
- Ferrer E, Benitez L, Foster-Cuevas M, Bryce D, Wamae LW, Onyango-Abuje JA et al 2003. Taenia saginata derived synthetic peptides with potential for the diagnosis of bovine cysticercosis. *Vet. Parasitol.* 111, 83-94.
- 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.
- 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 bv, Sevilha, Spain, pp. 7-14.
- Gramiccia M, Gradoni L 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int. J. Parasitol.* 35, 1169-1180.
- Greiner M, Pfeiffer D, Smith RD 2000. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev Vet Med* 45: 23-41.

- 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.
- Herwaldt BL 1999. Leishmaniasis. *Lancet* 354, 1191-1199.
- 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.
- Hwang HS, Chung HS 2002. Preparation of active recombinant cathepsin K expressed in bacteria as inclusion body. *Protein Expr. Purif.* 25(3), 541-546.
- Iniesta L, Gállego M, Portús M 2005. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 103:77-81.
- 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.
- Lainson R, Shaw JJ 1978. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. *Nature* 22; 273: 595-600.
- Lainson R, Shaw JJ 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W., Killick-Kendrick, R. (Eds.), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, 1. Academic Press, London, pp. 1-120.
- Li M, Su ZG, Janson JC 2004. In vitro protein refolding by chromatographic procedures. *Protein Expr. Purif.* 33, 1-10.
- Maalej IA, Chenik M, Louzir H, Ben Salah A, Bahloul C, Amri F, Dellagi K 2003. Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68, 312-320.
- Maia C, Campino L 2008. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet. Parasitol.* 158, 274-287.
- Maia C, Cristóvão J, Ramada J, Rolão N, Campino L 2006. Diagnóstico da leishmaniose canina pela técnica de PCR aplicada a sangue periférico em papéis de filtro resultados preliminares. *Vet. Med.* 47, 29-33.
- Maia C, Ramada J, Cristóvão J, Campino L 2007. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet. J.*, doi:10.1016/j.tvjl.2007.08.009.

- Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S 1988. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82:566-567.
- Mancianti F, Tardoni S, Melosi M 2002. Evaluation of the effectiveness of commercial immunomigration tests in the diagnosis of canine leishmaniasis. *Parasitologia* 44, 99.
- Maurício IL, Stothard JR, Miles MA 2000. The strange case of *Leishmania infantum*. *Parasitol. Today*, vol. 16, no. 5.
- Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P 2005. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dog. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5515-5519.
- Ministério da Saúde. Brasil. 2006. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, Brasília, 120 p.
- Ministério da Saúde Jan 2011. Leishmaniose Visceral - http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1561
- Mohapatra TM, Singh DP, Sen MR, Bharti K, Sundar S 2010. Comparative evaluation of rK39, rK26 and rK39 antigens in the serodiagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dev. Ctries* 4, 114-117.
- Mohebbali M, Taran M, Zarei Z 2004. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rK39 test and direct agglutination. *Vet. Parasitol.* 121, 239-245.
- Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andrés M, González F, Castillo JÁ, Lucientes J, Alvar J 1994. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 88(4): 491-493.
- Neogy A, Vouldoukis J, Silva O, Tselentis Y, Lascombe J, Segalen T, Rsepka D, Monjour L 1992. Serodiagnosis and screening of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Corsica: applicability of a direct agglutination test and immunoblot analysis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47, 772-777.

- Neuber H 2008. Leishmaniasis. *Academy*, doi: 10.1111/j.1610-0387.2008.06809.x
- Oliva G, Scalone A, Manzillo F, Gramiccia M, Pagano A, Muccio T, Gradoni L 2006. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naïve dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1318-1322.
- Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC et al. 2007. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause human disease. *Nat Genet.* 39(7): 839-847.
- Perez-Alvarez MJ, Larreta R, Alonso C, Requena JM 2001. Characterisation of a monoclonal antibody recognising specifically the HSP70 from *Leishmania*. *Parasitol. Res.* 87, 907-910.
- 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.
- Reus M, García B, Vázquez V, Morales D, Fuster M, Sola J 2005. Visceral leishmaniasis: diagnosis by ultrasound-guided fine needle aspiration of an axillary node. *Br J Radiol.* 78: 158-160.
- Ribeiro FC, Schubach AO, Mouta-Confort E, Pacheco TMV, Madeira MF, Abboud LCS, Honse CO, Alves AS, Marzochi MCA 2011. Use of ELISA employing homologous and heterologous antigens for the detection of IgG and subclasses (IgG1 and IgG2) in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Rev. Inst. Med. Trop.* 53(5): 283-289.
- Rosário E, Genaro O, França-Silva J, Costa R, Mayrink W, Reis A, Carneiro M 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, 197-203.
- Saliba EK, Oumeish YO 1999. Reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis. *Clin. Dermatol.* 17, 275-277.

- Schallig H, Canto-Cavalheiro M, Silva E 2002. Evaluation of the direct agglutination test and the rK39 dipstick test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 1015-1018.
- 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*, 82:66-68.
- Silva E, Van der Meide W, Schoone G, Gontijo C, Schallig H, Brasil R 2006. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. *Vet. Res. Commun.* 30, 637-643.
- Silveira FT, Lainson R, Corbett C 2004. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil – A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 99(3):239-251.
- Smith DF, Peacock CS, Cruz AK 2007. Comparative genomics: from genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. *Inter. J. Parasitol.* 37, 1173-1186.
- 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.
- 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.
- Sundar S, Rai M 2002. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 9:951-958.
- Sundar S, Singh RK, Bimal Sk, Gidwani K, Mishra A, Mauya R, Singh SK, Manandhar KD, Boelaert M, Rai M 2007. Comparative evaluation of parasitology and serological tests in the diagnosis of visceral leishmaniasis in India: a phase III diagnostic accuracy study. *Trop. Med. Int. Health* 12, 284-289.
- Tavares CAP, Fernandes AP, Melo MN 2003. Molecular diagnosis of leishmaniasis. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 3, 657-667.
- Terpe K 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 211-222.

- Tesh R 1995. Control of zoonotic visceral leishmaniasis is it time to change strategies? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52, 287-292.
- Tizard IR 2009. *Veterinary immunology: an introduction*. 8th ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 574p.
- WHO 2008. Leishmaniasis – <http://www.who.int/tdr/diseases-topics/leishmaniasis/en/index.html>
- Zijlstra EE, AN MS, el-Hassan AM, el-Toum IA, Satti M, Ghalib HW, et al. 1992. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 86:505-507.
- Zijlstra EE, Musa AM, Khalil EA, el-Hassan AM 2003. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*, 3:87-98.

11. ANEXOS

11.1. Quadro de abreviaturas dos aminoácidos

Animoácido	Abreviatura com 3 letras	Abreviatura com 1 letra
Glicina	Gly	G
Alanina	Ala	A
Leucina	Leu	L
Valina	Val	V
Isoleucina	Ile	I
Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe	F
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Cisteína	Cys	C
Tirosina	Tyr	Y
Asparagina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q
Aspartato ou Ácido aspártico	Asp	D
Glutamato ou Ácido glutâmico	Glu	E
Arginina	Arg	R
Lisina	Lys	K
Histidina	His	H
Triptofano	Trp	W
Metionina	Met	M

11.2. Quadro de abreviaturas dos nucleotídeos

Nucleotídeo	Abreviatura
Adenina	A
Citosina	C
Guanina	G
Timina	T

11.3. Certificado do CEUA

 UFMG	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CERTIFICADO Certificamos que o Protocolo nº. 98 / 2012, relativo ao projeto intitulado "DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA UTILIZANDO PROTEÍNAS DE Leishmania chagasi COM FUNÇÃO DESCONHECIDA", que tem como responsável Helida Monteiro de Andrade, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de	
Notice (8): Undefined variable: data_aprovacao [APP/views/elements/email/html/decisao_certificado_aprovacao.ctp, line 5] . Este certificado espira-se em 03/05/2017.	
CERTIFICATE We hereby certify that the Protocol nº. 98 / 2012, related to the Project entitled "DIAGNOSIS OF CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS USING PROTEIN OF UNKNOWN FUNCTION FROM Leishmania chagasi", under the supervision of Helida Monteiro de Andrade, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in	
Notice (8): Undefined variable: data_aprovacao [APP/views/elements/email/html/decisao_certificado_aprovacao.ctp, line 11] . This certificates expires in 03/05/2017.	
Notice (8): Undefined variable: nome_cordenador [APP/views/elements/email/html/decisao_certificado_aprovacao.ctp, line 15]	
Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 03/05/2012.	
Atenciosamente.	
Sistema CEUA-UFMG http://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ccua/	
Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br	