

GUILHERME RAFAEL GOMIDE PINHEIRO

**NOVO ANTÍGENO RECOMBINANTE PARA DIAGNÓSTICO
SOROLÓGICO DA TRIPANOSSOMOSE BOVINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Renato de Lima Santos

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Belo Horizonte

Escola de Veterinária da UFMG

2018

P654n Pinheiro, Guilherme Rafael Gomide, 1987-
Novo antígeno recombinante para diagnóstico sorológico da tripanossomose bovina /
Guilherme Rafael Gomide Pinheiro. – 2018.
57 p. : il.

Orientador: Renato de Lima Santos
Co-orientador: Ricardo Toshio Fujiwara
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Bovino – Doenças – Diagnóstico – Teses. 2. Tripanossomose em bovino – Teses.
3. Sorodiagnóstico – Teses. 4. Antígenos recombinantes – Teses. I. Santos, Renato de
Lima. II. Fujiwara, Ricardo Toshio. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de
Veterinária. IV. Título.

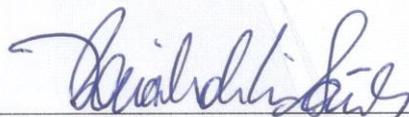
CDD – 636.208 96

FOLHA DE APROVAÇÃO

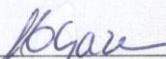
GUILHERME RAFAEL GOMIDE PINHEIRO

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS.

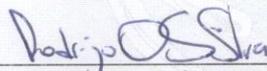
Aprovada em 02 de Fevereiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:



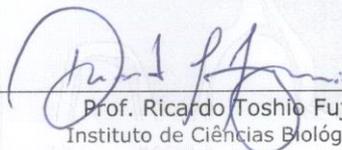
Prof. Renato de Lima Santos
Presidente - Orientador



Dr^a. Soraya Torres Gaze Jangola
Fundação Oswaldo Cruz - Instituto René Rachou - FIOCRUZ



Prof. Rodrigo Otávio Silveira Silva
Escola de Veterinária - UFMG



Prof. Ricardo Toshio Fujiwara
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

“Se você não é apaixonado
pelo que faz, deveria tentar
fazer outra coisa.”

Steve Jobs

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha querida família que sempre me apoiou e vibrou com as minhas conquistas.

Aos meus pais e a minha irmã, exemplos de força e determinação. Obrigado pelo amor e pelo total apoio de todos vocês.

Aos Professores e amigos Ricardo Toshio Fujiwara e Renato de Lima Santos pela orientação, pela oportunidade concedida, pela confiança e pelos conselhos e ensinamentos.

Às professoras Daniella Castanheira Bartholomeu, Lilian Lacerda Bueno e Tatiane Alves da Paixão pelos ensinamentos, amizade e disponibilidade para esclarecer minhas dúvidas.

À Dra. Mariana Santos Cardoso, ao Dr. João Luis Reis Cunha e ao Dr. Diego Felipe Alves Batista pela amizade e contribuição para a realização de trabalhos, sempre com profissionalismo, competência e muita disponibilidade em ajudar.

Aos professores Edmundo Carlos Grisard, Luiz Claudio Milette e Álvaro Ferreira Júnior pela disponibilidade, pelo apoio e colaboração.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e pelas contribuições, sem as quais esta dissertação não estaria completa.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (ICB/UFMG) e do Laboratório de Patologia Molecular (EV/UFMG) pela amizade, companheirismo e ajuda durante todo o trabalho.

À amiga Michele Silva de Matos pela amizade, pelo apoio, compreensão e companheirismo.

Aos amigos Alexandro, Rogério, Rosilene e Fernanda pela amizade, compreensão e companheirismo.

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da EV-UFMG, pela oportunidade de crescimento profissional.

Ao Colegiado de pós-graduação em Ciência Animal pela presteza e pela oportunidade de realização deste curso.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A todos os amigos que partilham do meu percurso acadêmico e profissional meu eterno obrigado.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVO GERAL	14
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 CICLO BIOLÓGICO	14
3.2 SINAIS CLÍNICOS	15
3.3 EPIDEMIOLOGIA	15
3.4 IMPACTO ECONÔMICO DA TRIPANOSSOMOSE BOVINA.....	17
3.5 DIAGNÓSTICO.....	17
3.6 PROTEÍNA RECOMBINANTE MYXOTLM	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 APROVAÇÃO DO PROJETO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	19
4.2 SOROS BOVINOS.....	20
4.3 ALINHAMENTOS ENTRE OS BANCO DE DADOS E AS SEQUÊNCIAS PROTEICAS DE LIGAÇÃO AO GTP DE <i>L. MEXICANA</i> (MYXOLM) GERADOS NO PROGRAMA BLASTP	20
4.4 VETOR DE EXPRESSÃO CONTENDO O GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA MYXOTLM.....	20
4.5 TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS POR ELETROPORAÇÃO	21
4.6 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS CLONADAS NO VETOR PET28A-TEV	22
4.7 EXPRESSÃO HETERÓLOGA	22
4.7.1 INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	22
4.7.2 LISE DAS BACTÉRIAS E TESTE DE SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	22
4.7.3 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS (SDS-PAGE)	23
4.7.4 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE.....	23
4.8 PREPARAÇÃO DE ANTÍGENO BRUTO.....	24
4.9 DOSAGEM DAS PROTEÍNAS	24
4.10 ELISA.....	24
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
5. RESULTADOS	26
5.1 ALINHAMENTOS ENTRE O BANCO DE DADOS DO NCBI E AS SEQUÊNCIAS PROTEICAS DE LIGAÇÃO AO GTP DE <i>LEISHMANIA MEXICANA</i> (MYXOLM) GERADOS NO PROGRAMA BLASTP	26
5.2 CLONAGEM DO AMPLICON MYXOTLM NO VETOR PET28A-TEV	26
5.3 SEQUENCIAMENTO DO GENE MYXOTLM CLONADO EM PET-28A-TEV	27
5.4 EXPRESSÃO HETERÓLOGA	27
5.5 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	29
5.6 ELISA.....	30
5.6.1 AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE COMO ANTÍGENO NO ELISA ANTI-IGM PARA TRIPANOSSOMATÍDEOS.....	30

5.6.2 AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE COMO ANTÍGENO NO ELISA ANTI-IGG PARA TRIPANOSSOMATÍDEOS	32
6. DISCUSSÃO	34
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
9. ANEXOS	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relatos de surtos de tripanossomose bovina no Brasil e os respectivos testes diagnósticos utilizados	16
Tabela 2: Prevalência da tripanossomose bovina em estados do Brasil e os respectivos testes diagnósticos utilizados	16
Tabela 3: Categorias de resultados de um teste diagnóstico em uma população de infectados e não infectados	25
Tabela 4: Grau de identidade entre a proteína recombinante MyxoTLm e o proteoma predito dos demais hemoparasitos bovinos	26
Tabela 5: Comparação de resultados de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia entre o ELISA anti-IgM com a proteína recombinante e o antígeno bruto de <i>Trypanosoma</i> sp.	32
Tabela 6: Concordância dos testes de ELISA anti-IgM com a proteína recombinante e o antígeno bruto de <i>Trypanosoma</i> sp.	32
Tabela 7: Comparação de resultados de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia entre o ELISA anti-IgG com a proteína recombinante e o antígeno bruto de <i>Trypanosoma</i> sp.	34
Tabela 8: Concordância dos testes de ELISA anti-IgG com a proteína recombinante e o antígeno bruto de <i>Trypanosoma</i> sp.	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sequência da proteína recombinante MyxoTLm.....	19
Figura 2: Vetor de clonagem pET28a-TEV.....	21
Figura 3: Análise eletroforética em gel de agarose 1,0% dos produtos amplificados a partir da PCR de colônia, utilizando os primers T7 Fwd e Rev para confirmação da clonagem do <i>amplicon</i> MyxoTLm no vetor pET28a-TEV.	27
Figura 4: SDS-PAGE da expressão em bactéria da proteína recombinante MyxoTLm	28
Figura 5: SDS-PAGE do teste de solubilidade da proteína recombinante	28
Figura 6: Purificação por cromatografia de afinidade da proteína recombinante LmxM.08_29.2200 (MyxoTLm) de <i>L. mexicana</i>	29
Figura 7: SDS-PAGE das frações da purificação por cromatografia de afinidade da proteína recombinante LmxM.08_29.2200 (Myxo Lm).	30
Figura 8: Comparação da reatividade da proteína MyxoTLm e sua respectiva curva ROC dos testes de ELISA anti-IgM com soros bovinos.	31

Figura 9: Comparação da reatividade da proteína MyxoTLm e sua respectiva curva ROC dos testes de ELISA anti-IgG com soros bovinos.33

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Termo de anuência da UNIUBE	42
Anexo 2: Termo de anuência da UDESC	43
Anexo 3: Termo de anuência da UFSC	44
Anexo 4: Certificado de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA – UFMG)	45
Anexo 5: Depósito da Patente	46
Anexo 6: Comprovante de Cadastro no SisGen	47
Anexo 7: Alinhamentos entre os bancos de dados utilizados e as sequências proteicas de ligação ao GTP de <i>L. mexicana</i> (MyxoLm) gerados no programa BLASTp	48
Anexo 8: Alinhamento gerado no programa BLASTn entre as sequências nucleotídicas obtidas do sequenciamento do inserto presente no plasmídeo pET28a-TEV e a respectiva sequência depositada no banco de dados do NCBI	57

RESUMO

As tripanossomoses são infecções parasitárias de homens e animais, causadas por protozoários do gênero *Trypanosoma*. A tripanossomose bovina (TB) é causada pelos protozoários *T. vivax*, *T. congolense* e *T. brucei*. Quadros agudos dessa doença são caracterizados inicialmente por hipertermia, seguida de anemia moderada a intensa, edema subcutâneo, letargia, redução na produção de leite, perda de peso progressiva, aumento de volume de linfonodos e distúrbios reprodutivos. A fase crônica ocorre quando os animais sobrevivem à fase aguda, começam a recuperar-se e tornam-se assintomáticos. O exame parasitológico direto (técnica de Woo ou esfregaços sanguíneos) é o método de diagnóstico utilizado na rotina por médicos veterinários, pois é rápido e apresenta baixo custo. Apesar disso, ambos apresentam baixa sensibilidade, impossibilitando estudos epidemiológicos eficazes, principalmente quando aplicado em animais cronicamente infectados, uma vez que apresentam baixa parasitemia e são os principais reservatórios desses protozoários. As técnicas sorológicas utilizando antígeno bruto têm sido frequentemente empregadas em estudos epidemiológicos da TB, e com base no estado imunológico dos animais é possível definir a situação epidemiológica das diferentes regiões de ocorrência dessas parasitoses. O objetivo deste trabalho foi desenvolver ferramentas de diagnósticos sorológicos mais específicos e sensíveis para a TB. Para isso, um gene conservado entre os tripanossomatídeos (MyxoTLM) foi expresso em sistema heterólogo, utilizando como vetor o plasmídeo pET28a-TEV e como sistema de expressão *Escherichia coli* cepa BL21 Star. A proteína heteróloga foi purificada por cromatografia de afinidade e aplicada como antígeno no teste sorológico por ELISA. Os ELISAs indiretos anti-IgM e anti-IgG, padronizados a partir do antígeno recombinante, apresentaram alto poder discriminatório quando testou-se soros de animais saudáveis (controle negativo) e com TB, atingindo especificidade de 91,30% e 95,65% e sensibilidade de 82,35% e 88,23%, respectivamente. Além disso, o antígeno demonstrou um bom desempenho para ELISA indireto anti-IgM, com área sob a curva ROC de 0,8568, e um excelente desempenho para ELISA indireto anti-IgG, com área sob a curva ROC de 0,9565. Por sua vez, o antígeno bruto usado no ELISA indireto anti-IgM atingiu sensibilidade de 70,58% e especificidade de 78,26%, e apresentou baixo desempenho no teste, com área sob a curva ROC de 0,7363. Por sua vez, para ELISA indireto com anti-IgG, o antígeno bruto atingiu sensibilidade de 82,35% e especificidade de 69,56%, e também apresentou baixo desempenho no teste, com área sob a curva ROC de 0,7570. Assim, conclui-se que a proteína recombinante desenvolvida nesse estudo é promissora se aplicada ao imunodiagnóstico e demonstrou potencial para ser utilizada no diagnóstico sorológico da TB.

Palavras-chave: Gênero *Trypanosoma*; Tripanossomose bovina; sorodiagnóstico; antígeno recombinante.

ABSTRACT

Trypanosomes are parasitic infections of humans and animals, caused by protozoa of the genus *Trypanosoma*. Bovine trypanosomiasis (BT) is caused by the protozoa *T. vivax*, *T. congolense* and *T. brucei*. BT acute infections are characterized initially by hyperthermia, followed by moderate to severe anemia, subcutaneous edema, lethargy, reduced milk production, progressive weight loss, enlarged lymph nodes and reproductive disorders. The chronic phase occurs in those animals that survive the acute phase and begin to recover of infection becoming asymptomatic. Direct parasitological examination (Woo technique or blood smears) is the diagnostic method used routinely by veterinarians as it is a quick and inexpensive method. However, the low sensitivity of this technique limits its use in epidemiological studies, since chronically infected animals present low parasitemia and are considered the main reservoirs of these protozoa. Serological techniques using crude antigen have often been used in epidemiological studies of BT, and based on the immunological status of the animals it is possible to determine the epidemiological situation in different regions in which such parasitoses take place. The objective of this study was to develop more specific and sensitive serological diagnostic tools for the diagnosis of bovine trypanosomiasis. For this, a gene conserved among trypanosomatids (MyxoTLM) was expressed in a heterologous system by using pET28a-TEV plasmid as vector and *Escherichia coli* BL21 Star strain as expression system. The expressed protein was purified by affinity chromatography and used as antigen in an ELISA test. Indirect anti-IgM and anti-IgG ELISAs assembled with the recombinant antigen showed high discriminatory power when sera from healthy (negative control) and diseased (BT) animals were tested as they reached 91.30% and 95.65% specificity, and 82.35% and 88.23% sensitivity, respectively. In addition, recombinant protein demonstrated a good performance to detect IgM, with the area under the ROC curve of 0.8568, and excellent performance to detect IgG, with area under the ROC curve of 0.9565. The crude antigen used in the indirect anti-IgM ELISA reached 70.58% sensitivity and 78.26% specificity, and presented low test performance, with area under the ROC curve of 0.7363. When applied to the anti-IgG indirect ELISA, the crude antigen reached 82.35% sensitivity and 69.56% specificity, also presenting a low performance with area under the ROC curve of 0.7570. Therefore, the recombinant protein used in this study is promissory to be applied in the immunodiagnosis and demonstrated great potential to be utilized in BT serological diagnosis.

Key words: *Trypanosoma* genus; bovine trypanosomiasis; serodiagnosis; recombinant antigen.

1. INTRODUÇÃO

As tripanossomoses são infecções parasitárias, causadas por protozoários da ordem Kinetoplastida, membros da família Trypanosomatidae e do gênero *Trypanosoma* (HOARE, 1972). *Trypanosoma vivax*, *T. congolense* e *T. brucei* são as espécies que acometem bovinos e são responsáveis por grandes perdas na bovinocultura (GONZATTI *et al.*, 2014), devido à redução no ganho de peso e na produção de leite, às altas taxas de mortalidade e aos gastos com tratamentos (CUGLOVICI-ABRAAO *et al.*, 2009).

Na África, esses parasitos são transmitidos biologicamente por moscas tsé-tsé (*Glossina* spp.). No entanto, *T. vivax* também pode ser transmitido mecanicamente por insetos hematófagos, permitindo a disseminação da doença em áreas livres de tsé-tsé (FIKRU *et al.*, 2012). A transmissão transplacentária também é possível em *T. vivax* e pode representar um fator importante na epidemiologia da doença (SILVA *et al.*, 2013).

Os tripanossomatídeos podem ser detectados a partir de amostras de sangue, linfonodos, líquido, secreções genitais e esfregaço de órgãos. No entanto, a sensibilidade desses métodos depende do estágio da doença, sendo bastante reduzida em quadros crônicos (DESQUESNES, 2004). Em geral, o diagnóstico parasitológico é o método mais aplicado para identificar *T. vivax* no campo (GONZATTI *et al.*, 2014). No entanto, o exame direto de um material fresco possui baixa sensibilidade, além de nem sempre permitir a identificação da espécie do parasito com base em sua morfologia (DESQUESNES, 2004).

O diagnóstico molecular é altamente sensível e permite realizar diagnóstico espécie-específico de infecções por *Trypanosoma* spp. No entanto, nem todas as infecções podem ser detectadas pela PCR, especialmente durante a ausência de parasitemia (DESQUESNES e DÁVILA, 2002).

Por sua vez, a detecção de anticorpos é uma ferramenta importante para avaliar a epidemiologia da doença pois permite avaliar animais que se infectaram mesmo na ausência de parasitemia. Antígenos comuns às diversas espécies de *Trypanosoma* são utilizados, não representando métodos espécie-específicos. O diagnóstico sorológico utilizando antígeno bruto é frequentemente realizado por métodos indiretos de ELISA e imunofluorescência (GONZATTI *et al.*, 2014).

Segundo GONZATTI *et al.* (2014), há necessidade urgente de desenvolver testes simples, eficazes e específicos para diagnóstico laboratorial e a campo, que permitam estudos epidemiológicos em áreas geográficas amplas. Dessa maneira, a utilização de proteínas recombinantes surge como uma alternativa ao uso de antígenos brutos nos diagnósticos sorológicos.

Estudos prévios demonstraram que fatores de virulência e genes constitutivos têm um elevado potencial para o sorodiagnóstico de tripanossomatídeos (MENEZES-SOUZA *et al.*, 2014). Em 2017, SILVA *et al.* desenvolveram um novo antígeno recombinante, MyxoTLM, que se mostrou promissor para uso em testes diagnósticos para triagem de tripanossomatídeos em bancos de sangue. Por conseguinte, a presente dissertação avaliou o uso da proteína MyxoTLM em testes de diagnóstico sorológico de fase aguda e crônica para a tripanossomose bovina (TB).

2. OBJETIVO GERAL

Desenvolver um ensaio de imunoabsorção enzimática mais específico e sensível para o diagnóstico dos agentes causadores da tripanossomose bovina.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expressar a proteína MyxoTLM em *Escherichia coli* cepa BL-21Star eletrocompetentes.
- Padronizar um ELISA com antígeno recombinante de detecção de IgM para diagnóstico precoce da tripanossomose bovina em fase aguda.
- Padronizar um ELISA com antígeno recombinante de detecção de IgG para diagnóstico epidemiológico da tripanossomose bovina em fase crônica.
- Avaliar o potencial uso da proteína MyxoTLM para o desenvolvimento de testes para diagnóstico sorológico da tripanossomose bovina.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CICLO BIOLÓGICO

Membros do gênero *Trypanosoma* são parasitas digenéticos, ou seja, envolvem dois hospedeiros no seu ciclo biológico. Os hospedeiros definitivos são os animais vertebrados, enquanto diversos insetos hematófagos atuam como hospedeiros intermediários.

Três espécies de *Trypanosoma* spp. são as principais causadoras da tripanossomose bovina (TB), sendo eles *T. vivax*, *T. congolense* e *T. brucei*. Na África, elas são transmitidas biologicamente por moscas tsé-tsé (*Glossina* spp.) (FORD, 2007). *T. vivax*, em especial, pode ser transmitido mecanicamente por outros insetos hematófagos (DESQUESNES e DIA, 2004; CHERENET *et al.*, 2006), ou de forma iatrogênica por meio de agulhas e instrumentos durante os períodos de vacinação e tratamentos em massa (JONES e DAVILA, 2001; FRANGE *et al.*, 2016; BASTOS *et al.*, 2017). Por esse motivo, essa espécie é encontrada em áreas livres de tsé-tsé (FIKRU *et al.*, 2012).

As formas sanguíneas de *Trypanosoma* spp. no hospedeiro infectado são ingeridas e se instalam no esôfago e faringe da tsé-tsé (MOLOO e GRAY, 1989), onde se transformam em formas epimastigotas. Posteriormente, os protozoários migram em direção ao canal alimentar, onde se multiplicam intensamente nas paredes do aparelho bucal, e em seguida, migram em direção à hipofaringe, onde se transformam em formas tripomastigotas metacíclicas. Ao fazer o repasto sanguíneo, o inseto injeta o parasito na forma de tripomastigota metacíclica no hospedeiro mamífero, onde a reprodução de *Trypanosoma* spp. ocorre por meio de fissão binária (SILVA *et al.*, 2002).

3.2 SINAIS CLÍNICOS

Na América Latina, a TB causada por *T. vivax* manifesta-se geralmente como uma doença crônica (OSÓRIO *et al.*, 2008). O parasito usualmente se encontra na corrente circulatória e leva ao desenvolvimento de quadros discretos a intensos da doença (GONZATTI *et al.*, 2014). Em regiões endêmicas, as infecções são principalmente assintomáticas e com baixas parasitemias (MADRUGA *et al.*, 2006). No entanto, nas regiões não endêmicas e na presença do parasito e vetores, episódios de surtos são comuns e geralmente são acompanhados de elevada mortalidade (CUGLOVICI *et al.*, 2010; CADIOLI *et al.*, 2012).

De acordo com ANOSA (1988), três estágios podem ser reconhecidos na TB: o primeiro deles é denominado de período pré-patente, quando não existem manifestações clínicas da doença. Essa etapa inicia-se com a transmissão do parasita pelo vetor e termina no momento em que os parasitas são detectados no sangue animal; o segundo estágio ou fase aguda da infecção, se inicia quando há a visualização de parasitas no sangue em exames laboratoriais e pode durar por até três meses. Nesse estágio, observa-se inicialmente hipertermia, seguida de anemia moderada a intensa, edema subcutâneo, letargia, redução na produção de leite, perda de peso progressiva, aumento de volume de linfonodos e distúrbios reprodutivos, como inibição transitória ou permanente da espermatogênese em machos ou anestro e abortos em fêmeas. A taxa de mortalidade varia significativamente, dependendo do isolado, do grau de estresse do hospedeiro, da raça e da espécie animal acometida (HOARE, 1972; DESQUESNES, 2004; OSÓRIO *et al.*, 2008). O terceiro estágio ou período crônico da infecção ocorre quando os animais que sobreviveram à fase aguda mantêm baixa parasitemia, começam a recuperar dos sinais clínicos da fase aguda e se tornam portadores assintomáticos. No entanto, diferentes tipos de estresse (alimentos escassos, seca, etc.) podem desencadear o reaparecimento da parasitemia (DESQUESNES, 2004).

3.3 EPIDEMIOLOGIA

As tripanossomoses são infecções parasitárias, causadas por protozoários do gênero *Trypanosoma* (HOARE, 1972). *T. congolense*, *T. brucei*, *T. vivax* e *T. theileri* são as espécies que acometem os bovinos. As duas primeiras espécies são exóticas no Brasil, enquanto *T. vivax* está disseminada por todo o país, podendo gerar grandes prejuízos em rebanhos susceptíveis. *T. theileri* é um parasita cosmopolita encontrado em bovinos de todos os continentes, em búfalos da Ásia e América do Sul e em antílopes na África). No entanto, as infecções causadas por esse protozoário geralmente são assintomáticas (DESQUESNES, 2004).

Na África, *T. vivax* infecta várias espécies de ungulados, como bovinos, ovinos, caprinos e camelídeos. Nas espécies citadas, o parasita é patogênico, embora, em certos animais selvagens, como várias espécies de antílopes, a infecção é assintomática (HOARE, 1972). Na América do Sul, *T. vivax* ocorre em bovinos e bubalinos (SHAW e LAINSON, 1972) e é patogênico para ambas espécies.

Não há evidências de reservatórios selvagens efetivos na América Latina. Portanto, pode-se assumir que o estabelecimento de *T. vivax* é dependente de seus hospedeiros domésticos (DESQUESNES, 2004).

O primeiro registro oficial de tripanossomose por *T. vivax* no Brasil foi no estado do Pará, quando SHAW e LAINSON (1972) relataram a ocorrência da doença em búfalos. Desde então, surtos foram relatados em diversas regiões do país, como demonstrado na **Tabela 1**. No entanto, poucos estudos epidemiológicos foram desenvolvidos no país, conforme demonstrado na **Tabela 2**.

Tabela 1. Relatos de surtos de tripanossomose bovina no Brasil e os respectivos testes diagnósticos utilizados.

Estado	Ano do surto	Teste diagnóstico	Referência
São Paulo	2008	Esfregaço sanguíneo	CADIOLI <i>et al.</i> , 2012
Pará	1967	Esfregaço sanguíneo	SHAW e LAINSON, 1972
Amapá	1981	Esfregaço sanguíneo	SERRA-FREIRE, 1981
Mato Grosso	1995	Teste de Woo	SILVA <i>et al.</i> , 1996
Mato Grosso do Sul	1997	Esfregaço sanguíneo	PAIVA <i>et al.</i> , 1997
Paraíba	2002	PCR	BATISTA <i>et al.</i> , 2007
Maranhão	2003	Esfregaço sanguíneo	GUERRA <i>et al.</i> , 2008
Tocantins	2006	<i>Buffy coat</i> *	LINHARES <i>et al.</i> , 2006
Minas Gerais	2007	Esfregaço sanguíneo	CARVALHO <i>et al.</i> , 2008
Rio Grande do Sul	2008	Esfregaço sanguíneo e PCR	SILVA <i>et al.</i> , 2009
Pernambuco	2010	Esfregaço sanguíneo e PCR	PIMENTEL <i>et al.</i> , 2012
Goias	2015	Teste de Woo	BASTOS <i>et al.</i> , 2017

* O teste *Buffy Coat* foi executado conforme descrição de MURRAY *et al.* (1977).

Tabela 2. Prevalência da tripanossomose bovina em estados do Brasil e os respectivos testes diagnósticos utilizados.

Estado	Prevalência (%)	Teste diagnóstico	Observação	Referência
Maranhão	0 a 3,39	<i>Buffy coat</i> *	-	MELO <i>et al.</i> , 2011
Mato Grosso	54	RIFI	Antígeno bruto de <i>Trypanosoma</i> sp.	WELLS <i>et al.</i> , 1977
Mato Grosso	56	ELISA indireto	Antígeno bruto de <i>Trypanosoma</i> sp.	MADRUGA <i>et al.</i> , 2006
Mato Grosso do Sul	52,6	ELISA indireto	Antígeno bruto de <i>Trypanosoma</i> sp.	MARTINS <i>et al.</i> , 2008
Minas Gerais	7,4 a 63	RIFI	Antígeno bruto de <i>Trypanosoma</i> sp.	FRANGE <i>et al.</i> , 2016 GERMANO <i>et al.</i> , 2017 FRANGE, 2013
Minas Gerais	35,7	PCR	-	CUGLOVICI <i>et al.</i> , 2010
Pará	30,7 a 93,1	ELISA indireto	Antígeno bruto de <i>Trypanosoma</i> sp.	MADRUGA <i>et al.</i> , 2006 GUEDES-JUNIOR <i>et al.</i> , 2008
Paraíba	0	RIFI	Antígeno bruto de <i>Trypanosoma</i> sp.	COSTA <i>et al.</i> , 2013
Paraíba	13,3 a 80	<i>Buffy coat</i> *	-	BATISTA <i>et al.</i> , 2012
Paraná	0	RIFI	Antígeno bruto de <i>Trypanosoma</i> sp.	SNAK, 2017
Pernambuco	11,90 a 15,99	RIFI	Antígeno bruto de <i>Trypanosoma</i> sp.	GUERRA <i>et al.</i> , 2013
Sergipe	80	PCR	-	VIEIRA <i>et al.</i> , 2017

* O teste *Buffy Coat* foi executado conforme descrição de MURRAY *et al.* (1977).

3.4 IMPACTO ECONÔMICO DA TRIPANOSSOMOSE BOVINA

Na África Subsaariana, as perdas econômicas pecuárias associadas à TB atingem 1,2 bilhão de dólares por ano (FAO, 2004). *T. vivax* é considerado um dos principais agentes patogênicos associados a diminuição da produção pecuária na América do Sul (DESQUESNES, 2004), mas há uma escassez de informação relativa ao impacto econômico desta parasitose no continente sul-americano.

Em um estudo realizado no Pantanal brasileiro e nas terras baixas da Bolívia, o custo dessa doença foi estimado em 63,76 dólares por animal (SEIDL *et al.*, 1999). No primeiro relato de *T. vivax* em Minas Gerais calculou diminuição de 27% na produção de leite e redução de 45% nas taxas de prenhez (CUGLOVICI-ABRAO *et al.*, 2009). Na Guiana Francesa, o custo econômico de um surto de tripanossomose bovina foi estimado em 3,3% do peso do animal vivo. Extrapolando para o valor de mercado do animal, isso equivaleria a uma perda de € 30,00 (trinta euros), mais um adicional de € 3,00 (três euros) por animal para tratamento terapêutico (DESQUESNES, 2004).

Uma avaliação econômica completa deve levar em conta a complexa situação epidemiológica na região, onde bovinos, caprinos, ovinos e cavalos podem ser infectados e em que foram relatados os surtos recorrentes e esporádicos de *T. vivax*. Além disso, as infecções bovinas de por *T. vivax* são muitas vezes acompanhadas por outros patógenos hemotrópicos que podem contribuir para a morbidade, mortalidade e infertilidade do gado, com o conseqüente impacto sobre a produtividade. A quantificação das perdas econômicas devido a *T. vivax* deve incluir outros custos, como tratamentos curativos ou profiláticos, assistência veterinária e o impacto indireto.

3.5 DIAGNÓSTICO

Após a descoberta de *Trypanosoma* spp. causando doença em bovinos na África, o refinamento do diagnóstico clínico logo foi seguido pelo desenvolvimento de métodos parasitológicos. Mais tarde, os diagnósticos sorológicos e moleculares apareceram, mas esses métodos geralmente não estão disponíveis fora do meio acadêmico (GONZATTI *et al.*, 2014).

Na rotina dos veterinários de campo, o diagnóstico parasitológico é o método mais aplicado para identificar *T. vivax* (MADRUGA, 2004; GONZATTI *et al.*, 2014). No entanto, a sensibilidade desses métodos é variável e depende do estágio da doença, sendo bastante reduzida em quadros crônicos (DESQUESNES, 2004).

A técnica de esfregaço sanguíneo é um método parasitológico, que consiste na observação dos parasitas por meio de microscópio em amostras frescas. Esse teste de permite um diagnóstico definitivo, no entanto, possui sensibilidade muito baixa (DESQUESNES, 2004).

A técnica parasitológica mais utilizada no diagnóstico da tripanossomose bovina (MADRUGA, 2004) é a técnica de centrifugação de hematócrito ou técnica de Woo (WOO, 1969), que consiste na centrifugação de sangue em tubos capilares e, posteriormente,

visualização microscópica da região da capa leucocitária. Esse método permite observar a movimentação dos parasitos na amostra, bem como determinar o hematócrito do animal infectado (DESQUESNES, 2004). No entanto, a técnica de Woo apresenta baixa sensibilidade, principalmente na fase crônica da doença (MASAKE *et al.*, 1994).

Em 1977, Murray *et al.* (1977) publicaram uma modificação da técnica de Woo, chamada de *Buffy coat*. Por meio desse método, e com auxílio de um microscópio, é possível avaliar a capa leucocitária em lâminas após a centrifugação do hematócrito, de modo a visualizar as formas tripomastigotas, mesmo após não observar movimentos dos parasitos na técnica de Woo. Esta técnica possui sensibilidade superior a um esfregaço sanguíneo, porém inferior à técnica de Woo.

A detecção de anticorpos é outra estratégia diagnóstica, sendo uma ferramenta importante para avaliar animais que se infectaram, mesmo na ausência de parasitemia. Técnicas indiretas de ELISA e de imunofluorescência são frequentemente utilizadas no diagnóstico sorológico das tripanossomoses (SILVA, *et al.*, 2002; GONZATTI *et al.*, 2014). Nestas técnicas são utilizados antígenos comuns às diversas espécies de *Trypanosoma* spp., pois o antígeno bruto destes parasitos não permite diagnóstico espécie-específico (DESQUESNES, 2004).

Para a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é necessário obter antígeno de *T. vivax*. Para isso, um animal ruminante deverá ser esplenectomizado e experimentalmente inoculado com o parasito. No pico de parasitemia, o sangue é coletado e esfregaços sanguíneos são confeccionados e fixados. Uma pequena quantidade do plasma ou do soro do animal suspeito é gotejado sobre o esfregaço, o qual é lavado e incubado com um anticorpo secundário anti-IgG bovino marcado por fluoresceína. Em seguida, o esfregaço é observado sob luz ultravioleta, e as amostras positivas emitem fluorescência (DESQUESNES, 2004). Segundo PLATT e ADAMS (1976), essa técnica não apresenta reação cruzada com *Anaplasma marginale*, *Babesia* sp. e *T. theileri*. No entanto, FERENC *et al.* (1990) relatam que essa técnica apresenta uma interpretação subjetiva e que há reação cruzada entre *T. evansi* e *T. vivax*.

O ensaio de imunoabsorção enzimática indireto (ELISA indireto) consiste na preparação de um antígeno que é aderido à microplacas de poliestireno na primeira etapa. Em seguida, são colocados os soros-teste que, se contiverem os anticorpos contra o patógeno, permitirão a formação do complexo antígeno-anticorpo com o antígeno previamente aderido à placa. Esta ligação é detectada pela adição de um anticorpo secundário à reação. Na sequência, é adicionado um complexo formado pelo substrato da enzima e um cromógeno, gerando uma reação colorida quando o substrato é consumido (DESQUESNES, 2004). O ELISA indireto possui sensibilidade satisfatória na detecção de *Trypanosoma* spp. Em uma avaliação de 13 ovelhas experimentalmente infectadas com *T. vivax*, a sensibilidade foi de 90% para as 1.226 amostras testadas (DESQUESNES, 2004). Por sua vez, a especificidade é razoável, pois não apresenta reações cruzadas com *T. theileri* (FERENC *et al.*, 1990; DESQUESNES e GARDINER, 1993), no entanto, apresenta baixa especificidade entre as espécies patogênicas (DESQUESNES, 2004). Nesta técnica, antígenos brutos de *T. evansi* são utilizados para detectar *T. vivax* devido à alta resposta cruzada entre as espécies. Além disso, a propagação de *T. evansi* em roedores permite produção mais eficiente do antígeno.

Os métodos de diagnóstico molecular são mais recentes e ainda estão restritos ao ambiente acadêmico. A detecção de um segmento de DNA permite realizar diagnóstico espécie-específico de infecções por *Trypanosoma* spp. (DESQUESNES, 2004). Métodos moleculares,

como a reação em cadeia da polimerase (PCR), podem ser utilizados para o diagnóstico, bem como para identificar e caracterizar diversas espécies de *Trypanosoma* spp. (DESQUESNES e DÁVILA, 2002). No entanto, nem todas as infecções podem ser detectadas pela PCR, especialmente durante a ausência de parasitemia (DESQUESNES e DÁVILA, 2002).

3.6 PROTEÍNA RECOMBINANTE MyxoTLm

A proteína recombinante MyxoTLm, utilizada neste trabalho, é uma proteína truncada que possui 511 aminoácidos em sua estrutura e corresponde a 74% da sequência da proteína de ligação ao GTP (Myxo) de *Leishmania mexicana* (LmxM.08_29.2200) (**Figura 1**). Esta proteína é altamente conservada entre os tripanossomatídeos e apresenta alto potencial para uso em testes diagnósticos de doenças causadas por *Trypanosoma* spp. (SILVA, 2017).

As proteínas G, também conhecidas como proteínas de ligação a nucleotídeos de guanina, são uma família de proteínas que atuam como interruptores moleculares no interior das células e estão envolvidas na transmissão de sinais a partir de uma variedade de estímulos de fora da célula para o seu interior. A sua atividade é regulada por fatores que controlam a sua capacidade de se ligar e hidrolisar trifosfato de guanosina (GTP) em difosfato de guanosina (GDP) (GERHARD KRAUSS, 2008).

```
MGHHHHHHENLYFQGHMDQLIGVINELHDAFAGVKMNIKLNLPQIAVVGSQSCGKSSVLESIVGKDFLPRGSGIV  
TRCPLVLQLVQLPKSNDEEWGEFLHIPQKKFYDFNEIQNEITRRTIEMAGPSAITDKPISLKVYSKTVLNLTLVDLPG  
LVMNAVGDQPKDIDRQIKDMVTRYVSPKNTIILAI SPANTDLATSQSLRLAKQLDPDGLRTVGVLT KIDLMDKGTD  
CLDILQNRVLQLRHGFIGVVCRSQQDINDRKSMEGARRSEYEFFANSPIYSPIAEEAGTTYLSKKNLFLLEHIKAVIP  
DLKRHVDQLMEATKKQMEKLG MFDQDITEPTAQLLYLIKLFSDTLNQTIDGGITDATKELLGGARLDYIFHECFAT  
YVTSLSATKDLTDDYIRINTRNMAGMHATLFPDQVVFVLSKQITRLEEPCIKCVTFVYEELSKIVEVCAGKVDRY  
PNLKEAHSICKMMLLDYRKPTSTHVRTIIQAERGFINVKHPMMDELAQRAFANIYGTANGESSP
```

Figura 1: Sequência da proteína recombinante MyxoTLm. A porção marcada em cinza corresponde ao vetor pET28a-TEV, utilizado na expressão da proteína em bactéria. A parte sublinhada indica a cauda de histidina adicionada à proteína para facilitar o seu processo de purificação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 APROVAÇÃO DO PROJETO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

O presente estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da UFMG, conforme protocolo CEUA 42/2017 (**ANEXO 3**).

4.2 SOROS BOVINOS

O painel de soros bovinos consistiu de 40 amostras, das quais 17 foram provenientes de bovinos naturalmente infectados com *T. vivax* (grupo “POSITIVO”). Esses 17 soros foram obtidos de áreas de surto de tripanossomose bovina em Uberaba, MG. Positividade no Teste de Woo foi o critério para a inclusão neste grupo. Essas amostras foram provenientes do Banco de Soro do Laboratório de Patologia Clínica da Universidade de Uberaba-UNIUBE (Termo de anuência no **ANEXO 1**).

Bovinos machos e fêmeas, criados de forma extensiva em área não endêmica para tripanossomose bovina (Lages, SC), com resultados negativos em testes parasitológicos e PCR foram considerados não-infectados e, portanto, foram utilizados como controle negativo (n = 23). Essas amostras foram provenientes do Banco de Soros do “Laboratório de Bioquímica de Hemoparasitas e Vetores” da Universidade do Estado de Santa Catarina-UDESC (Termo de anuência no **ANEXO 2**).

Todas as amostras foram devidamente registradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), conforme demonstrado no **ANEXO 6**.

4.3 ALINHAMENTOS ENTRE OS BANCO DE DADOS E AS SEQUÊNCIAS PROTEICAS DE LIGAÇÃO AO GTP DE *L. mexicana* (MyxoLm) GERADOS NO PROGRAMA BLASTp

Para avaliar o grau de identidade da sequência da proteína recombinante MyxoTLm com o proteoma predito das espécies de *Trypanosoma* (Banco de dados: <http://tritrypdb.org>) que infectam os bovinos e de possíveis diagnósticos diferenciais (Banco de dados: <http://piroplasmadb.org>), foram realizados alinhamentos globais utilizando o programa ClustalW Multiple Sequence Alignment.

4.4 VETOR DE EXPRESSÃO CONTENDO O GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA MyxoTLM

O plasmídeo contendo o gene codificador da proteína MyxoTLm (**Figura 2**) foi cedido pelo Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (Instituto de Ciências Biológicas - ICB/UFGM).

O vetor de expressão pET28a-TEV, produzido no centro de Biologia Molecular e Estrutural (CeBiME, Campinas, SP), possui o gene de resistência à canamicina para seleção positiva dos transformantes. Este vetor possui em seu sítio múltiplo de clonagem uma região denominada His-tag, que consiste em seis repetições da trinca de nucleotídeos “CAT”, que codifica para o aminoácido histidina. Desta forma, este vetor adiciona à proteína recombinante expressa, uma cauda de seis resíduos de histidina, que foi posteriormente utilizada na purificação da proteína recombinante.

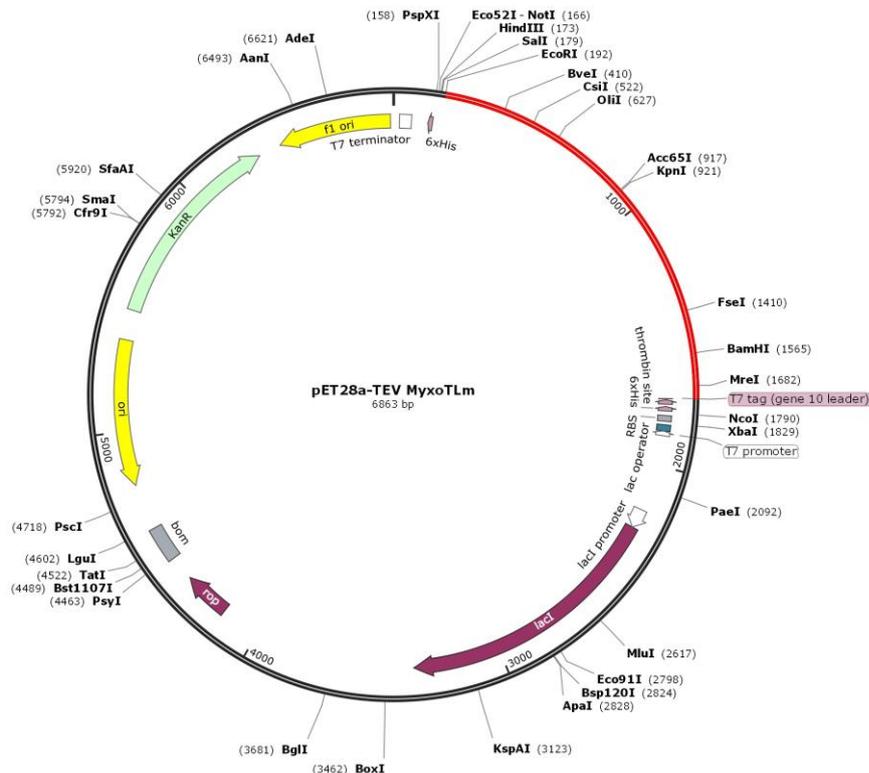


Figura 2: Vetor de clonagem pET28a-TEV: A porção marcada em vermelho corresponde ao inseto codificador da proteína recombinante MyxoTLM.

4.5 TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS POR ELETROPORAÇÃO

Três microlitros (μL) da reação de ligação foram incubados por cinco minutos no gelo com 50 μL de suspensão da cepa BL-21Star de *Escherichia coli* eletrocompetentes, contendo 1×10^8 unidades formadoras de colônia (UFC)/ μg (Invitrogen™). As amostras foram transferidas para Micro Pulser Cuvettes (Bio-Rad) de 0,1 cm e submetidas a um pulso de 2,50 kilovolts (kV) em um eletroporador Micro Pulser (Bio-Rad). A cultura eletroporada foi transferida para 300 μL do meio de cultura 2xYT líquido, sem antibióticos, que foi incubada durante uma hora a 37°C em agitação a 180 rpm em shaker de bancada. Após este período, as amostras foram plaqueadas em meio sólido 2xYT-ágar contendo 1,5% de kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As placas foram levadas à estufa a 37°C, onde permaneceram durante 12-16 h.

A identificação de transformantes positivos foi realizada por PCR de colônia utilizando-se os primers T7 (F: 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'; R: 5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3').

4.6 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS CLONADAS NO VETOR pET28a-TEV

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

4.7 EXPRESSÃO HETERÓLOGA

4.7.1 INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Para indução da expressão da proteína recombinante, uma colônia isolada contendo o plasmídeo de interesse foi inoculada em 10 mL de meio de cultura 2xYT contendo 50 µg/mL de canamicina. A cultura foi incubada *overnight* a 37°C sob agitação a 200 rpm. Em seguida, os 10 mL cultivados foram inoculados em erlenmeyer de 2000 mL contendo 500 mL de meio 2xYT adicionado de 50 µg/mL de canamicina. Essa cultura foi levada a incubadora nas condições já descritas, onde permaneceu até que atingisse densidade óptica (DO₆₀₀) entre 0,6-0,8. Nesse ponto, a expressão foi induzida pela a adição de 1 mM de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) (Invitrogen, São Paulo, Brasil) por 3 h a 37°C sob agitação a 200 rpm. Após o período de indução, a cultura foi centrifugada a 3000 x g, por 30 min a 4°C em centrífuga “5804R” (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) e em seguida congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C. Alíquotas da cultura imediatamente antes da adição de IPTG, e após o período de indução da expressão, foram também congeladas para serem utilizadas como controle de expressão.

4.7.2 LISE DAS BACTÉRIAS E TESTE DE SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Para avaliar a solubilidade da proteína recombinante, uma alíquota da cultura mantida a -80°C foi descongelada e ressuspendida na proporção de 5 mL de PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 1,8 mM; pH 7,4) para cada 50 mL de cultura, na presença de 100 µg/mL de lisozima. A mistura foi homogeneizada e deixada em repouso por 15 minutos. Após o repouso, as alíquotas foram submetidas a cinco ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C e passadas exaustivamente em seringas de insulina (1 mL/cc,261/2 G, 13x0,45) para fragmentação de seu DNA genômico. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 14000 x g a 4°C, para separação das frações solúvel

(sobrenadante) e insolúvel (*pellet*). Amostras destas duas frações foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Para recuperação da proteína insolúvel, 8M de ureia foi adicionada ao tampão de ressuspensão.

4.7.3 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS (SDS-PAGE)

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

4.7.4 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

A purificação da proteína recombinante foi realizada por cromatografia de afinidade, sistema *ÄKTAprime plus* (GE Healthcare, Piscataway, EUA) em coluna HisTrap HP de 5 mL (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, EUA), no sistema *ÄKTAprimeplus* (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, EUA). Esta coluna HisTrap possui em seu interior uma matriz de níquel-sefarose, que consiste em esferas de agarose contendo em sua superfície íons Ni^{+2} imobilizados. A proteína recombinante expressa utilizando o vetor pET28a-TEV apresenta uma cauda de histidina em sua região N-terminal, e como o aminoácido histidina possui grande afinidade pelo íon Ni^{+2} , esta proteína fica retida, por afinidade, na coluna de purificação. O extrato proteico da fração sobrenadante do lisado bacteriano contendo a proteína recombinante foi aplicado em uma coluna HisTrap HP de 5 mL (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, EUA) para a captura da proteína recombinante. Para a remoção de proteínas endógenas da bactéria, a coluna foi primeiramente lavada com 5 volumes de coluna do tampão A (fosfato de sódio 20 mM; NaCl 500 mM; imidazol 30 mM), com baixa concentração de imidazol. A eluição foi realizada através de gradiente crescente de tampão B (fosfato de sódio 20 mM; NaCl 500 mM; imidazol 500 mM), partindo de 0% de concentração e atingindo 100% em 20 mL de corrida. O imidazol compete com a cauda de histidina pela ligação ao níquel na coluna, liberando a proteína recombinante da matriz e permitindo sua obtenção na fração eluída. Todas as frações obtidas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS.

4.8 PREPARAÇÃO DE ANTÍGENO BRUTO

Para a confecção do antígeno bruto, 100 mL de cultura de *T. evansi* foram centrifugadas três vezes a $10000 \times g$ durante 30 min a 4°C e lavados com PBS, pH 7,2. Após a última centrifugação, o *pellet* foi recolhido e lisado com um tampão contendo Tris 100 mM, EDTA 10 mM, NP40 a 2,0%, N- α -p-tosil-l-lysil clorometilcetona 0,2 mM (TLCK) e 2,0 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e por ruptura ultra-sônica (100 W) durante 10 min com intervalos de 2 min. O material solúvel obtido após centrifugação durante 20 min a $14000 \times g$ a 4°C foi utilizado como antígeno. Os *pellets* de *T. evansi* foram cedidos pelo Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC (Termo de anuência no ANEXO 3).

4.9 DOSAGEM DAS PROTEÍNAS

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

4.10 ELISA

Foram utilizados os conjugados anti-IgM ou anti-IgG marcados com Peroxidase cujos títulos foram determinados em estudo piloto. As reações foram realizadas em microplacas de polietileno (Falcon®, BD Lab., EUA) de 96 orifícios e fundo plano. Cada orifício foi sensibilizado com 50 ng da proteína recombinante ou 1 μg do antígeno bruto de *T. evansi* diluídos em 100 μL de tampão carbonato. As placas foram, em seguida, incubadas por 24 h a 4°C . Após a sensibilização, o excesso de antígeno foi lavado com solução de lavagem (PBS+Tween 20 0,5%) e foram adicionados, por orifício, 150 μL de solução de BSA 3% para o bloqueio dos sítios inespecíficos, seguindo-se de incubação por 60 min a 37°C . O excesso de solução de bloqueio foi retirado por duas lavagens sucessivas. Os soros bovinos foram diluídos 1:200 em tampão de lavagem e 100 μL dessa solução foram aplicados em cada orifício. Em seguida, foi realizada uma incubação por 60 min a 37°C e retirado o excesso do soro diluído por uma série de cinco lavagens com o tampão de lavagem. O conjugado foi diluído a seu título (IgG = 1:2500 ; IgM = 1:10000) e 100 μL desta diluição foram acrescentados em cada orifício. Após nova incubação por 60 min a 37°C , o excesso de conjugado foi retirado por nova série de cinco lavagens com tampão de lavagem. A solução do substrato com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi então preparada e 100 μL acrescentados em cada orifício. O cromógeno utilizado foi o *orthophenylenediamine* (OPD, Sigma Aldrich, EUA). A reação foi realizada por 10 min em temperatura ambiente e no escuro, quando então foi interrompida pela adição de 50 μL de 4 N de ácido sulfúrico (H_2SO_4) (Merck, Alemanha), por orifício. Em todas as etapas, após cada lavagem, as placas foram secadas por inversão sobre papel absorvente. As reações foram lidas em leitor de ELISA (BioRad modelo 550, Brasil) a 492 nm e os resultados expressos em valores de absorbância. A análise da curva ROC (*Receiver Operating Curve*) foi utilizada para

estabelecer o limite inferior de positividade (*cut off*) e para determinar o maior valor combinado de sensibilidade, especificidade e área sob a curva.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foram utilizados o *software* GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Inc, EUA) e o Microsoft Excel 2010 para o processamento e organização dos dados de absorbância gerados pelo ELISA. Todas as amostras de soros deste trabalho foram testadas em duplicata.

Para a comparação entre os resultados positivos e negativos, primeiramente foi realizado um teste de Kolmogorov-Smirnov para a determinação da normalidade da amostra. Caso a distribuição dos dados apresentasse distribuição normal, a comparação entre os grupos foi realizada através do teste t de Student não-pareado. Quando a distribuição dos resultados apresentou distribuição não normal, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Valores de “p” inferiores a 0,05 foram considerados como significativos.

Para avaliar o desempenho da proteína recombinante no ELISA para diagnóstico, foram calculados os parâmetros valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia (AUC), conforme a **Tabela 3**:

Tabela 3: Categorias de resultados de um teste diagnóstico em uma população de infectados e não infectados.

		PRESENÇA DA INFECÇÃO		
		PRESENTE	AUSENTE	TOTAL
RESULTADO 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)

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

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

$$\text{Acurácia: AC} = (A+D)/(A+B+C+D)$$

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

1,0 – 0,9 = Teste excelente

0,9 – 0,8 = Teste bom

0,8 – 0,7 = Teste razoável

0,7 – 0,6 = Teste ruim

0,6 – 0,5 = Teste falho

O grau de concordância entres os testes de ELISA e exame parasitológico (Teste de Woo / PCR) foi determinado pelo índice Kappa (k) interpretados de acordo com a seguinte escala de Fleiss: 0,00-0,20, pobres; 0,21-0,40, justo; 0,41-0,60, moderada; 0,61-0,80, bom; 0,81-0,99, muito bom e 1,00, perfeito (FLEISS *et al.* 1972).

5. RESULTADOS

5.1 ALINHAMENTOS ENTRE O BANCO DE DADOS DO NCBI E AS SEQUÊNCIAS PROTEICAS DE LIGAÇÃO AO GTP DE *Leishmania mexicana* (MyxoLm) GERADOS NO PROGRAMA BLASTp

Analisando o alinhamento global entre as proteínas (ANEXO 07), nota-se que a sequência proteica recombinante apresenta alta identidade em comparação às proteínas dos tripanossomatídeos que infectam bovinos. No entanto, apresenta baixa identidade com os demais hemoparasitas que podem causar quadros clínicos semelhantes. Os resultados encontram-se resumidos na **Tabela 4**.

Tabela 4: Grau de identidade entre a proteína recombinante MyxoTLm e o proteoma predito dos demais hemoparasitos bovinos.

Agente etiológico	Grau de identidade com a proteína MyxoTLm (%)
<i>Leishmania mexicana</i>	98
<i>Trypanosoma congolense</i>	72
<i>Trypanosoma brucei</i>	71
<i>Trypanosoma evansi</i>	71
<i>Trypanosoma vivax</i>	69
<i>Babesia bovis</i>	39
<i>Babesia bigemina</i>	40
<i>Theileria parva</i>	39
<i>Theileria annulata</i>	41
<i>Anaplasma marginale</i>	Insignificante
<i>Trypanosoma theileri</i>	Sem dados nos bancos utilizados

5.2 CLONAGEM DO AMPLICON MYXOTLM NO VETOR PET28A-TEV

A clonagem do inserto no vetor pET28a-TEV foi confirmada por PCR de colônia, utilizando os *primers* T7 *foward* e *reverse*, que se anelam próximo ao sítio múltiplo de clonagem do vetor (**Figura 3**).

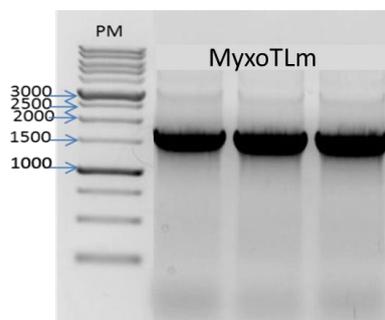


Figura 3: Análise eletroforética em gel de agarose 1,0% dos produtos amplificados a partir da PCR de colônia, utilizando os primers T7 Fwd e Rev para confirmação da clonagem do amplicon MyxoTLM no vetor pET28a-TEV. Todas as colônias analisadas foram positivas para a clonagem dos genes de interesse.

5.3 SEQUENCIAMENTO DO GENE MYXOTLM CLONADO EM PET-28A-TEV

Após o sequenciamento e processamento dos dados por ferramentas de bioinformática, as sequências obtidas foram submetidas à pesquisa de homologia usando o programa BLASTn contra o banco de dados de nucleotídeos do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), onde o inserto presente no plasmídeo pET28a-TEV apresentou identidade de 99% com a proteína de ligação ao GTP de *L. mexicana* (MyxoLm). O alinhamento está disponível no **Anexo 8**.

5.4 EXPRESSÃO HETERÓLOGA

As bactérias *E. coli* (BL-21 Star) transformadas com os vetores pET28a-TEV foram submetidas à indução de expressão com IPTG para realização do teste de expressão. Foram coletadas frações da cultura imediatamente antes da adição de IPTG e após o término da indução para averiguar a ocorrência da expressão. A proteína expressa apresentou peso molecular esperado de 59,1 kDa para MyxoTLM (**Figura 4**).

O teste de solubilidade revelou que a MyxoTLM é uma proteína insolúvel (**Figura 5**). Tal característica indicou a necessidade de tratamento prévio em tampão contendo 8 M de uréia para a sua solubilização.

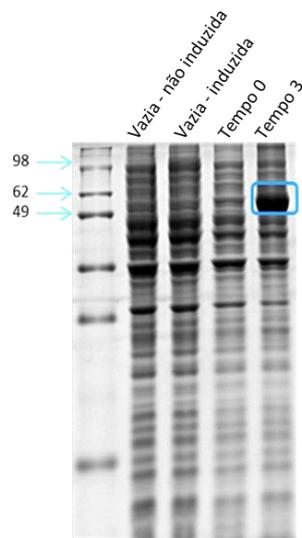


Figura 4: SDS-PAGE da expressão em bactéria da proteína recombinante MyxoTLM. Análise eletroforética em gel de poliacrilamida, sob condições desnaturantes, corado com *Coomassie Blue*, dos extratos bacterianos, contendo o plasmídeo pET28a-TEV com o gene de MyxoTLM em fusão com a cauda de histidina, antes (Tempo 0) e 3 horas após (Tempo 3) a indução com IPTG. As canaletas “não induzidas” corresponde ao extrato de bactéria não transformada, utilizado como controle do perfil de bandas no gel. O padrão de peso molecular em kDa está indicado à esquerda. As caixas azuis indicam as bandas de indução no gel.

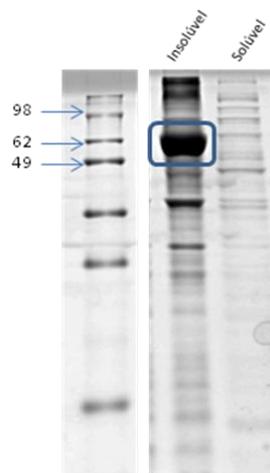


Figura 5: SDS-PAGE do teste de solubilidade da proteína recombinante. As bactérias que expressaram a proteína recombinante MyxoTLM foram lisadas, separadas em fração solúvel e insolúvel e submetidas ao SDS-PAGE. O padrão de peso molecular em kDa está indicado à esquerda do gel. As caixas azuis indicam as bandas da proteína recombinante no gel.

5.5 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

A proteína recombinante foi submetida à purificação por cromatografia de afinidade. As frações purificadas que contiveram a proteína MyxoTLm compreenderam toda a extensão do pico de absorvância observado durante a eluição. Na **Figura 6** nota-se que a absorvância durante a eluição da proteína ligada à coluna His-trap começa a acentuar-se na fração 10 até atingir o seu auge na fração 13 e retornando à absorvância inicial na fração 15, onde se manteve constante até o final da eluição.

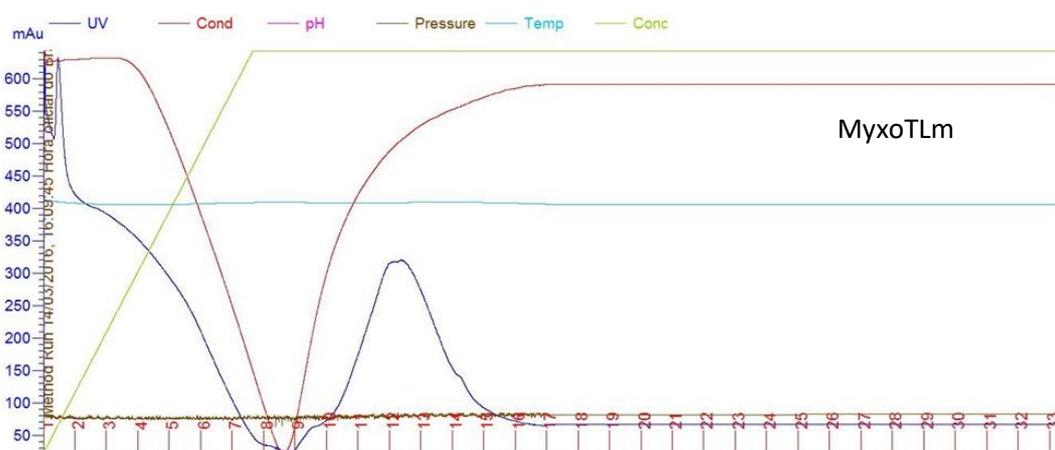


Figura 6: Purificação por cromatografia de afinidade da proteína recombinante LmxM.08_29.2200 (MyxoTLm) de *L. mexicana*. No eixo das ordenadas está evidenciado a escala de valores em mili unidades de absorvância (mAu) de UV do material eluído da coluna de afinidade Histrap HP de 5 mL. No eixo das abscissas, em preto está a quantidade de mL de tampão de eluição que passou pela coluna de afinidade, e em vermelho está o número das frações de 1,8 mL coletadas durante a purificação para a obtenção da proteína recombinante. A linha azul escura corresponde a absorvância em mAu do material eluído. A linha em verde corresponde à concentração de imidazol no tampão de eluição, que inicia com uma concentração de 30 mM e cresce em escala linear até atingir o platô em 500 mM. A linha em vermelho corresponde à condutância do tampão utilizado na eluição, que é correspondente a quantidade de sal na solução. A linha azul clara corresponde à temperatura do sistema. A linha em marrom corresponde à pressão do sistema.

Para verificar a qualidade da purificação, as frações purificadas foram submetidas a fracionamento em SDS-PAGE (**Figura 7**). Em concordância com o gráfico da **Figura 6** a fração que apresenta a maior concentração de proteína recombinante foi selecionada para a utilização nos ELISA.

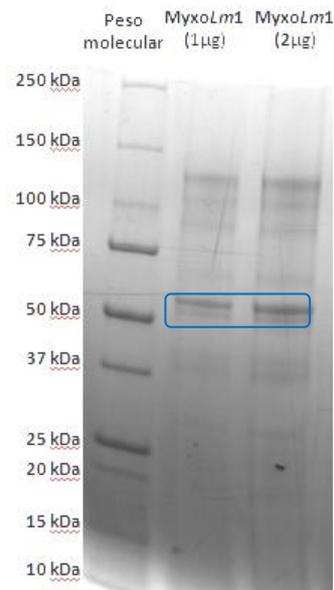


Figura 7: SDS-PAGE das frações da purificação por cromatografia de afinidade da proteína recombinante LmxM.08_29.2200 (Myxo Lm). A canaleta corresponde a fração coletada referente à região de maior absorvância na **Figura 6**, obtida durante a purificação por cromatografia de afinidade. A caixa azul indica a banda da proteína recombinante no gel. O padrão de peso molecular em kDa está indicado à esquerda do gel.

5.6 ELISA

5.6.1 AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE COMO ANTÍGENO NO ELISA ANTI-IgM PARA TRIPANOSSOMATÍDEOS

A avaliação da MyxoTLm no diagnóstico sorológico de fase aguda da TB foi realizada por meio de ELISA anti-IgM comparativos entre a MyxoTLm e antígeno bruto de *Trypanosoma* sp.

Os dados referentes à reatividade e curva ROC da MyxoTLm e do antígeno bruto estão representados na **Figura 8**.

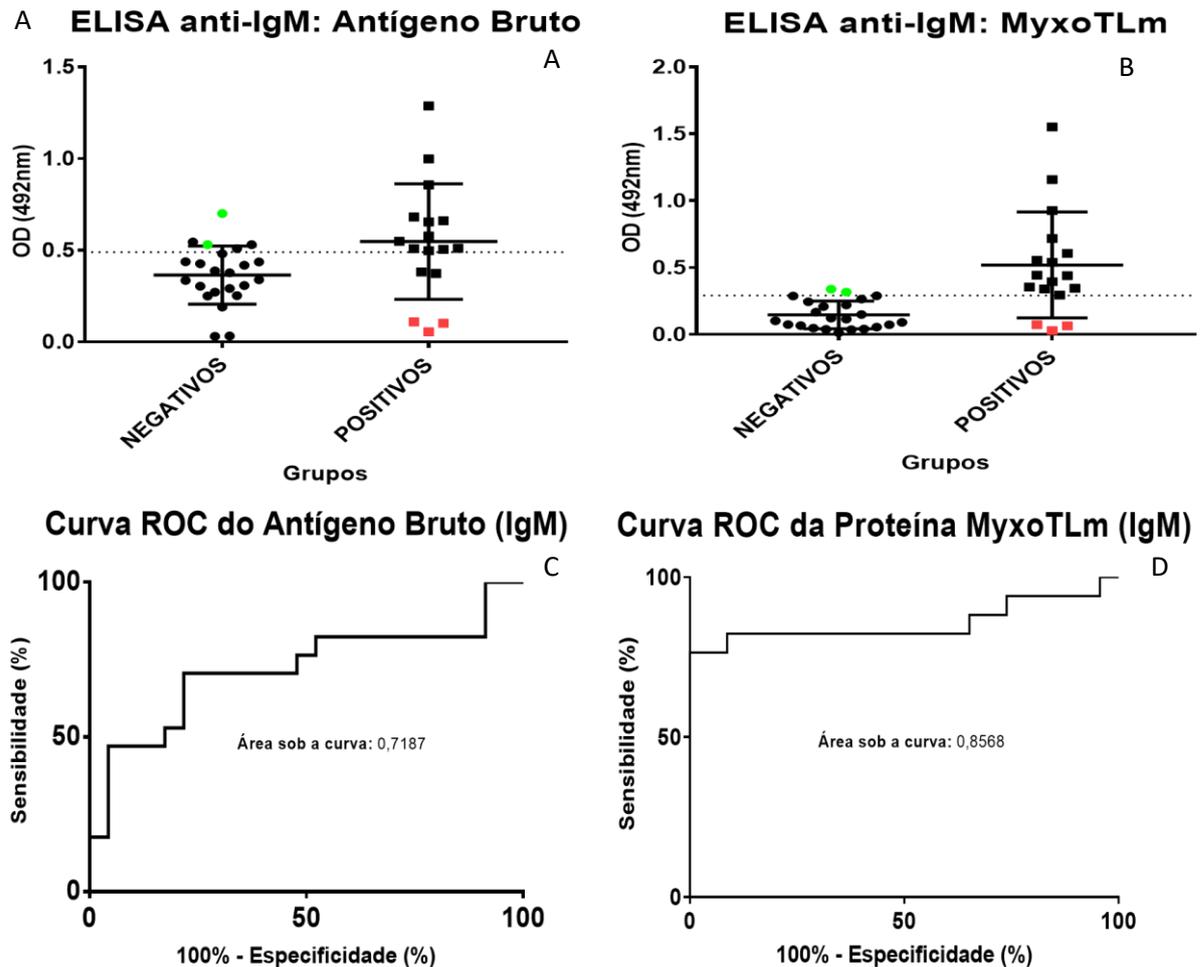


Figura 8: Comparação da reatividade da proteína MyxoTLm e sua respectiva curva ROC dos testes de ELISA anti-IgM com soros bovinos. O teste de ELISA anti-IgM foi realizado com seguintes grupos de soros bovinos: tripanossomatídeos (bovinos naturalmente infectados por *Trypanosoma* sp.) e controle negativo. (A-B) O eixo das ordenadas está representando a absorbância de comprimento de 492 nm e, no gráfico da curva ROC, a sensibilidade do teste. No gráfico de reatividade, no eixo das abcissas estão ordenados os diferentes grupos de soros bovinos testados; A linha tracejada representa o limite inferior de positividade; os animais marcados em verde são os animais Falsos Positivos no teste com a proteína recombinante MyxoTLm e os animais marcados em vermelho são os Falsos Negativos com a proteína recombinante MyxoTLm. (C-D) O eixo das ordenadas está representando a sensibilidade do teste; o eixo das abcissas representa a especificidade do teste.

Após análise estatística dos resultados, foi possível verificar que houve diferença significativa ($p = 0,0001$), entre os grupos de soros negativos e positivos quando a proteína MyxoTLm é utilizada como antígeno para teste diagnóstico.

Nas **Tabelas 5 e 6** estão representados de maneira sumária os resultados de desempenho e concordância dos testes.

Tabela 5: Comparação de resultados de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia entre o ELISA anti-IgM com a proteína recombinante e o antígeno bruto de *Trypanosoma sp.*

ELISA anti-IgM						
Antígeno	Cut off*	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP (%)	VPN (%)	AC (%)
Antígeno Bruto	0,489	70,58	78,26	70,58	78,26	75,0
MyxoTLm	0,292	82,35	91,30	87,5	87,5	87,5

*Cut off calculado com base na curva ROC;

Abreviações: (VPP) valor preditivo positivo; (VPN) valor preditivo negativo; (AC) acurácia

Tabela 6: Concordância dos testes de ELISA anti-IgM com a proteína recombinante e o antígeno bruto de *Trypanosoma sp.*

ELISA anti-IgM								
Antígeno	AUC	tP	tN	FP	FN	k*	IC 95%	Concordância**
Antígeno Bruto	0,7570	23	17	5	5	0,488	0,798-0,179	Moderada
MyxoTLm	0,8568	16	24	2	3	0,742	1,0-0,433	Boa

*Para calcular o fator *Kappa* (k) foram utilizados 23 controles negativos e 17 controles positivos.

**Os testes de diagnóstico parasitológico foram padrão ouro para o cálculo da concordância.

Abreviações: (AUC) área sob a curva; (IC) intervalo de confiança; (tP) teste positivo; (tN) teste negativo; (FP) falso positivo; (FN) falso negativo;

5.6.2 AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE COMO ANTÍGENO NO ELISA ANTI-IgG PARA TRIPANOSSOMATÍDEOS

A avaliação da MyxoTLm no diagnóstico sorológico de fase crônica da tripanossomose bovina foi realizada por meio de ensaios de ELISA indireto anti-IgG comparativos entre a MyxoTLm e antígeno bruto de *Trypanosoma sp.*

Os dados referentes à reatividade e curva ROC da MyxoTLm e do antígeno bruto estão representados na **Figura 9**.

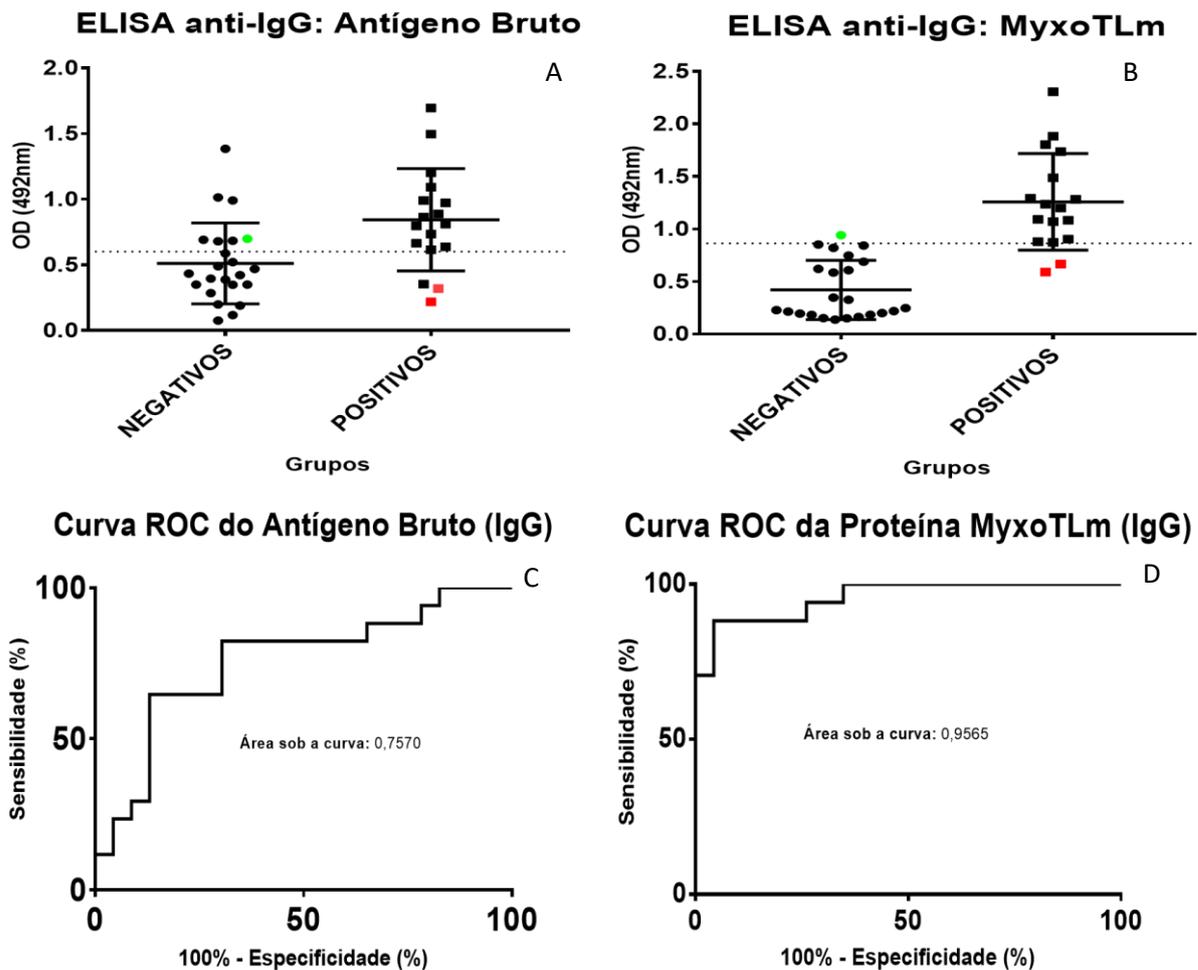


Figura 9: Comparação da reatividade da proteína MyxoTLm e sua respectiva curva ROC dos testes de ELISA anti-IgG com soros bovinos. O teste de ELISA anti-IgG foi realizado com seguintes grupos de soros bovinos: tripanossomatídeos (bovinos naturalmente infectados por *Trypanosoma* sp.) e controle negativo. (A-B) O eixo das ordenadas está representando a absorbância de comprimento de 492 nm e, no gráfico da curva ROC, a sensibilidade do teste. No gráfico de reatividade, no eixo das abscissas estão ordenados os diferentes grupos de soros bovinos testados; A linha tracejada representa o limite inferior de positividade; os animais marcados em verde são os animais Falso Positivos no teste com a proteína recombinante MyxoTLm e os animais marcados em vermelho são os Falsos Negativos com a proteína recombinante MyxoTLm. (C-D) O eixo das ordenadas está representando a sensibilidade do teste; o eixo das abscissas representa a especificidade do teste.

Após análise estatística dos resultados, foi possível verificar que houve diferença significativa ($p < 0,0001$), entre os grupos de soros negativos e positivos quando a proteína MyxoTLm é utilizada como antígeno para teste diagnóstico.

Nas **Tabela 7 e 8** estão representados de maneira sumária os resultados de desempenho e concordância dos testes.

Tabela 7: Comparação de resultados de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia entre o ELISA anti-IgG com a proteína recombinante e o antígeno bruto de *Trypanosoma* sp.

ELISA anti-IgG						
Antígeno	Cut off*	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP (%)	VPN (%)	AC (%)
Antígeno Bruto	0,601	82,35	69,56	66,67	84,21	75
MyxoTLm	0,863	88,24	95,65	93,75	91,67	92,5

*Cut off calculado com base na curva ROC;

Abreviações: (VPP) valor preditivo positivo; (VPN) valor preditivo negativo; (AC) acurácia

Tabela 8: Concordância dos testes de ELISA anti-IgG com a proteína recombinante e o antígeno bruto de *Trypanosoma* sp.

ELISA anti-IgG								
Antígeno	AUC	tP	tN	FP	FN	k*	IC 95%	Concordância**
Antígeno Bruto	0,7570	21	19	7	3	0,504	0,807-0,2	Moderada
MyxoTLm	0,9565	16	24	1	2	0,845	1,0-0,563	Muito boa

*Para calcular o fator *Kappa* (k) foram utilizados 23 controles negativos e 17 controles positivos.

**Os testes de diagnóstico parasitológico foram padrão ouro para o cálculo da concordância.

Abreviações: (AUC) área sob a curva; (IC) intervalo de confiança; (tP) teste positivo; (tN) teste negativo; (FP) falso positivo; (FN) falso negativo;

Em função dos resultados aqui apresentados, foi feito pela Coordenadoria de Transferência e Inovação Tecnológica (CTIT) da UFMG o depósito da patente conforme **ANEXO 5**.

6. DISCUSSÃO

Atualmente, o diagnóstico da tripanossomose bovina é baseado nos sinais clínicos apresentados pelo animal em conjunto com os dados epidemiológicos e os exames laboratoriais, que incluem os testes parasitológicos e sorológicos. No entanto, os sinais clínicos da tripanossomose bovina não são específicos, e podem ser confundidos com outras enfermidades, principalmente com as demais hemoparasitoses. Por esse motivo, existe uma demanda urgente para o desenvolvimento de testes simples e eficazes para o diagnóstico da tripanossomose bovina (GONZATTI *et al.*, 2014). Nesse contexto, a proteína MyxoTLm, apresentada nesse estudo, é um antígeno recombinante que demonstrou elevado potencial para melhorar significativamente o desempenho do diagnóstico sorológico da tripanossomose bovina.

A MyxoTLm é derivada da proteína de ligação ao GTP de *Leishmania mexicana*, sendo uma sequência conservada entre os tripanosomatídeos. A estratégia de utilização de sequências proteicas de organismos heterólogos para o diagnóstico da tripanossomose bovina já havia sido

descrita por UZCANGA *et al.* (2016), quando o uso de glicoproteínas da superfície variante (VSGs) heterólogas solúveis de *T. equiperdum* (p64) foi utilizado como antígeno para diagnóstico cruzado de bovinos infectados por *T. vivax*.

No presente estudo, a proteína recombinante foi explorada como uma ferramenta de diagnóstico sorológico pan-tripanosomatídeos. Essa estratégia mostrou-se viável, pois qualquer espécie de *Trypanosoma* exigiria a mesma intervenção clínica, uma vez que não há diferença de tratamento (PILLAY *et al.*, 2013). Apesar de *T. congolense*, *T. brucei* e *T. vivax* acometerem os bovinos, as duas primeiras espécies são exóticas no Brasil. Por esse motivo, apesar do alto potencial de diagnóstico, não foi possível avaliar o desempenho da MyxoTLM para a detecção de animais infectados com *T. congolense* e *T. brucei*.

Ao ser testado com *T. vivax*, o antígeno recombinante desenvolvido no presente estudo foi capaz de discriminar os soros dos animais infectados dos soros de bovinos não infectados, apresentando sensibilidade e especificidade superiores aos ensaios conduzidos com o antígeno bruto de *Trypanosoma* sp. Ressalta-se que esse resultado foi obtido com amostras de campo, de animais naturalmente infectados, o que é um diferencial, uma vez que muitos estudos utilizam apenas animais experimentalmente infectados, não testando a condição real que acontece no campo.

Por sua vez, o antígeno bruto usado no ELISA indireto anti-IgM atingiu sensibilidade de 70,58% e especificidade de 78,26%, enquanto no ELISA indireto com anti-IgG, o antígeno bruto atingiu sensibilidade de 82,35% e especificidade de 69,56%. Esses resultados divergem do trabalho publicado por MADRUGA *et al.* (2006), no qual o ELISA indireto utilizando antígeno bruto de *Trypanosoma* sp. obteve sensibilidade de 97,6% e especificidade de 96,9%. No entanto, PILLAY *et al.* (2013) encontraram eficiência menor quando utilizado para amostras de campo, corroborando os resultados encontrados no presente estudo.

No Brasil, as técnicas sorológicas utilizando antígeno bruto de parasitos do gênero *Trypanosoma* têm sido frequentemente empregadas em estudos epidemiológicos da tripanossomose bovina (WELLS *et al.*, 1977; MADRUGA *et al.*, 2006; GUEDES-JUNIOR *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2013; FRANGE *et al.*, 2016; SNAK, 2017). No entanto, o uso de antígeno bruto nesta técnica tem se mostrado um fator limitante de sensibilidade e especificidade. Outra condição limitante ao uso de antígenos brutos em diagnósticos sorológicos é a dificuldade de gerar uma quantidade significativa e padronizada de antígeno (DESQUESNES, 2004), uma vez que para gerar o antígeno bruto, são necessárias técnicas laboriosas, além da necessidade de esplenectomizar um bezerro e fazer infecção experimental. Portanto, a utilização de proteínas recombinantes, como a utilizada no presente estudo, surge como alternativa mais racional de produção de antígenos, pois não utiliza animais e é facilmente produzida com alta padronização e alto rendimento.

Embora várias proteínas recombinantes estejam sendo estudadas para o uso em testes sorológicos da tripanossomose bovina (PILLAY *et al.*, 2013; FLEMING *et al.*, 2016; UZCANGA *et al.*, 2016; BOULANGÉ *et al.*, 2017), até o momento nenhum antígeno apresentou 100% de acurácia e nenhum deles está disponível no mercado. Por esse motivo, o potencial de imunodiagnóstico do antígeno recombinante MyxoTLM para a detecção dos agentes causadores da tripanossomose bovina foi avaliado em relação ao ELISA indireto utilizando antígeno bruto de *Trypanosoma* sp.

Em 2013, PILLAY *et al.* desenvolveram um ELISA indireto utilizando um antígeno baseado em sequência repetitiva do antígeno GM6 de *T. vivax* (TvGM6), que é uma proteína associada ao flagelo. Os testes utilizando o TvGM6 para o diagnóstico de infecções bovinas por *T. vivax* apresentaram alta sensibilidade e especificidade (91,5% e 91,3%, respectivamente). Buscando desenvolver uma tecnologia rápida e passível de uso por veterinários de campo, BOULANGÉ *et al.* (2017) utilizaram esse mesmo antígeno para o desenvolvimento de testes rápidos em fitas e ao testar com soros de animais experimentalmente infectados, obtiveram sensibilidade de 92% e especificidade de 95,9%. Em outro estudo, FLEMING *et al.* (2016) desenvolveram um teste imunoenzimático indireto utilizando antígenos recombinantes baseados na família de glicoproteínas de superfície de *T. vivax* (TvY486_0045500), e assim como os estudos anteriores, obtiveram bons resultados, com alta sensibilidade e especificidade (94,5% e 88%, respectivamente). Apesar dos bons resultados apresentados por FLEMING *et al.* (2016) e BOULANGÉ *et al.* (2017), as proteínas desenvolvidas por eles foram testadas somente para detecção de IgG, enquanto que a proteína desenvolvida no presente estudo detecta os isotipos IgG e IgM, permitindo o diagnóstico da infecção em qualquer fase da tripanossomose bovina. Além disso, a MyxoTLm foi testada com amostras de animais naturalmente infectados e em condições reais de campo, enquanto as proteínas TvGM6 e TvY486_0045500 foram testadas apenas com animais experimentalmente infectados. Além disso, estudos demonstraram que cepas de *T. vivax* provenientes de diferentes regiões podem apresentar sensibilidade e especificidade distintas para um mesmo antígeno (PILLAY *et al.*, 2013). E apesar dos valores de sensibilidade e especificidade obtidos para a MyxoTLm estarem concordantes com os obtidos por testes que utilizam outras proteínas recombinantes (PILLAY *et al.*, 2013; FLEMING *et al.*, 2016; BOULANGÉ *et al.*, 2017) e superiores aqueles que utilizam antígeno bruto com amostras de campo (PILLAY *et al.*, 2013), o presente estudo foi o único a testar soros de animais infectados com as cepas sul-americanas de *T. vivax*.

7. CONCLUSÃO

A proteína recombinante MyxoTLm, descrita neste estudo, aumenta a sensibilidade e a especificidade do teste, melhorando o desempenho do diagnóstico sorológico da tripanossomose bovina tanto para o diagnóstico de fase aguda, quanto para o diagnóstico de fase crônica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANOSA V.O. Haematological and biochemical changes in human and animal trypanosomiasis. *Revue d'Elevage et de Médecine Veterinaire des Pays Tropicaux*, v. 41, p. 65-78, 1988.
- BASTOS, T.S.A.; FARIA, A.M.; MADRID, D.M.C. *et al.* First outbreak and subsequent cases of *Trypanosoma vivax* in the state of Goiás, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 2961, n. 2012, p. 366–371, 2017.
- BATISTA, J.S.; RIET-CORREA, F.; TEIXEIRA, M.M.G. *et al.* Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. *Veterinary Parasitology*, v. 143, n. 2, p. 174–181, 2007.
- BATISTA, J.S.; RODRIGUES, C.M.F.; OLINDA, R.G. *et al.* Highly debilitating natural *Trypanosoma vivax* infections in Brazilian calves: Epidemiology, pathology, and probable transplacental transmission. *Parasitology Research*, v. 110, n. 1, p. 73–80, 2012.
- BOULANGÉ, A.; PILLAY, D.; CHEVTZOFF, C.; *et al.* Development of a rapid antibody test for point-of-care diagnosis of animal African trypanosomiasis. *Veterinary Parasitology*, v. 233, p. 32–38, 2017.
- CADIOLI, F.A.; BARNABÉ, P.A.; MACHADO, R.Z. *et al.* First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 21, n. 2, p. 118–124, 2012.
- CARVALHO, A.U.; ABRAO, D.C.; FACURY-FILHO, E.J. *et al.* Ocorrência de *Trypanosoma vivax* no estado de Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 60, n. 3, p. 769–771, 2008.
- CHERENET, T.; SANI, R.A.; SPEYBROECK, N. *et al.* A comparative longitudinal study of bovine trypanosomiasis in tsetse-free and tsetse-infested zones of the Amhara Region, northwest Ethiopia. *Veterinary Parasitology*, v. 140, n. 3–4, p. 251–258, 2006.
- COSTA, V.M.D.M.; RIBEIRO, M.F.B.; DUARTE, A.L.L. *et al.* Seroprevalence and risk factors for cattle anaplasmosis, babesiosis, and trypanosomiasis in a Brazilian semiarid region. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 22, n. 2, p. 207–213, 2013.
- CUGLOVICI, D.A.; BARTHOLOMEU, D.C.; REIS-CUNHA, J.L. *et al.* Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 169, n. 3–4, p. 320–326, 2010.
- CUGLOVIVI-ABRAO, D.; CARVALHO, A.U.; FACURY-FILHO, E.J. *et al.* Impacto econômico causado por *Trypanosoma vivax* em rebanho bovino leiteiro no estado de minas gerais. *Ciência Animal Brasileira*, v. 1, p. 672–676, 2009.
- DÁVILA, A.M.R.; SILVA, R.A.M.S. Animal trypanosomiasis in South America: Current status, partnership, and information technology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 916, p. 199–212, 2000.
- DESQUESNES, M. Livestock trypanosomes and their vectors in Latin America. *OIE – World Organization for Animal Health*. Paris, 2004.

- DESQUESNES, M.; DÁVILA, A.M.R. Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: A review and perspectives. *Veterinary Parasitology*, v. 109, n. 3–4, p. 213–231, 2002.
- DESQUESNES, M.; DIA, M. L. Mechanical transmission of *Trypanosoma congolense* in cattle by the African tabanid *Atylotus agrestis*. *Experimental Parasitology*, v. 105, n. 3–4, p. 226–231, 2004.
- DESQUESNES, M.; GARDINER, P. R. Épidémiologie de la trypanosomose bovine (*Trypanosoma vivax*) en Guyane française. *Revue D'Élevage Et De Medecine Veterinaire Des Pays Tropicaux*, v. 46, n. 3, p. 463–470, 1993.
- FAO. The state of food and agricultura 2003-2004. *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*, 2004.
- FERENC, S.A.; STOPINSKI, V.; COURTNEY, C. H. The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* and its use in a seroepidemiological survey of the Eastern Caribbean Basin. *International Journal of Parasitology*, v. 20, n. 1, p. 51–56, 1990.
- FIKRU, R.; GODDEERIS, B.M.; DELESPAUX, V. *et al.* Widespread occurrence of *Trypanosoma vivax* in bovines of tsetse- as well as non-tsetse-infested regions of Ethiopia: A reason for concern? *Veterinary Parasitology*, v. 190, n. 3–4, p. 355–361, 2012.
- FLEISS, J.L.; SPITZER, R.L.; ENDICOTT, J. *et al.* Quantification of agreement in multiple psychiatric diagnosis. *Archives of General Psychiatry*, v. 26, p. 168–171, 1972.
- FLEMING, J. R.; SASTRY, L.; WALL, S. J. *et al.* Proteomic identification of immunodiagnostic antigens for *Trypanosoma vivax* infections in cattle and generation of a proof-of-concept lateral flow test diagnostic device. *Plos Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 9, p. 1–11, 2016.
- FORD, L.B. Civil conflict and sleeping sickness in Africa in general and Uganda in particular. *Conflict and Health*, v. 1, n. 1, p. 6, 2007.
- FRANGE, R.C.C.; FIGUEIREDO, J.F.; CAMPOS, M.T.G. *et al.* Serological and parasitological study of bovine trypanosomiasis in the microregion of Uberaba, Minas Gerais State, Brazil. *JSM Atherosclerosis*, v. 1, p. 1–6, 2016.
- GERMANO, P.H.V.; EDLER, G.E.C.; DA SILVA, A.A. *et al.* Prevalência de *Trypanosoma vivax* em bovinos no município de Patos de Minas / MG. *Revista Acadêmica: Ciência Animal*, v. 15, n. 2, p. 433–434, 2017.
- GERHARD KRAUSS. *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, 5th Edition, 2008.
- GONZATTI, M.I.; GONZÁLEZ-BARADAT, B.; ASO, P.M. *et al.* *Trypanosoma (Duttonella) vivax* and Trypanosomosis in Latina America: Secadera/Huequera/Cacho Hueco. In: MAGEZ, S.; RADWANSKA, M. *Trypanosomes and Trypanosomiasis*. Springer-Verlag Wien, London, 2014.
- GUEDES JUNIOR, D.S.; ARAÚJO, F.R.; SILVA, F.J.M. *et al.* Frequency of antibodies to *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma vivax* and *Borrelia*

burdgorferi in cattle from the northeastern region of the state of Pará, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, n. 2, p. 105–109, 2008.

GUERRA, N.R.; MONTEIRO, M.F.M.; SANDES, H.M.M. *et al.* Detecção de anticorpos IgG anti-*Trypanosoma vivax* em bovinos através do teste de Imunofluorescência indireta. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, n. 12, p. 1423–1426, 2013.

GUERRA, R.M.S.N.C.; FEITOSA JÚNIOR, A. B.; SANTOS, H. P. *et al.* Biometry of *Trypanosoma vivax* found in a calf in the state of Maranhão, Brazil. *Ciência Rural*, v. 38, p. 833–835, 2008.

HOARE, C.A. The trypanosomes of mammals, In: HOARE, C.A. A zoological Monograph Classification. (Ed.). Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1972. p. 60-80.

LINHARES, G.F.C; DIAS-FILHO, F.C.F.; FERNANDES, P.R *et al.* Tripanossomíase em bovinos no município de Formoso do Araguaia, Tocantins (relato de caso). *Ciência Animal Brasileira*, v. 7, n. 4, p. 455–460, 2006.

MADRUGA, C.R. Diagnóstico e epidemiologia do *Trypanosoma (Duttonella) vivax* no Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 13, Suppl. 1, p. 46-47, 2004.

MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R.; CAVALCANTE-GOES, G. *et al.* The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* antibodies and its use in epidemiological surveys. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 7, p. 801–807, 2006.

MARTINS, C.F.; MADRUGA, C.R.; KOLLER, W.W. *et al.* *Trypanosoma vivax* infection dynamics in a cattle herd maintained in a transition area between Pantanal lowlands and highlands of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 28, n. 1, p. 51–56, 2008.

MASAKE, R. A.; NANTULYA, V. M.; PELLÉ, R. *et al.* A species-specific antigen of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* detectable in the course of infection is encoded by a differentially expressed tandemly reiterated gene. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 64, n. 2, p. 207–218, 1994.

MELO, S.A.; BARROS, A.C.E.; COSTA, F.B. *et al.* Bovine Trypanosomiasis an emerging disease in Maranhão State – Brazil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 11, n. 7, p. 853–856, 2011.

MENEZES-SOUZA, D.; MENDES, T.A.O.; NAGEM, R.A.P. *et al.* Mapping B-cell epitopes for the peroxidoxin of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and its potential for the clinical diagnosis of tegumentary and visceral leishmaniasis. *Plos One*, v. 9, n. 6, 2014.

MOLOO, S.K.; GRAY, M.A. New observations on cyclical development of *Trypanosoma vivax* in *Glossina*. *Acta Tropica*, v. 46, n. 3, p. 167–172, 1989.

MURRAY, M.; MURRAY, P.K.; MCINTYRE, W.I. An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 71, p. 325-326, 1977.

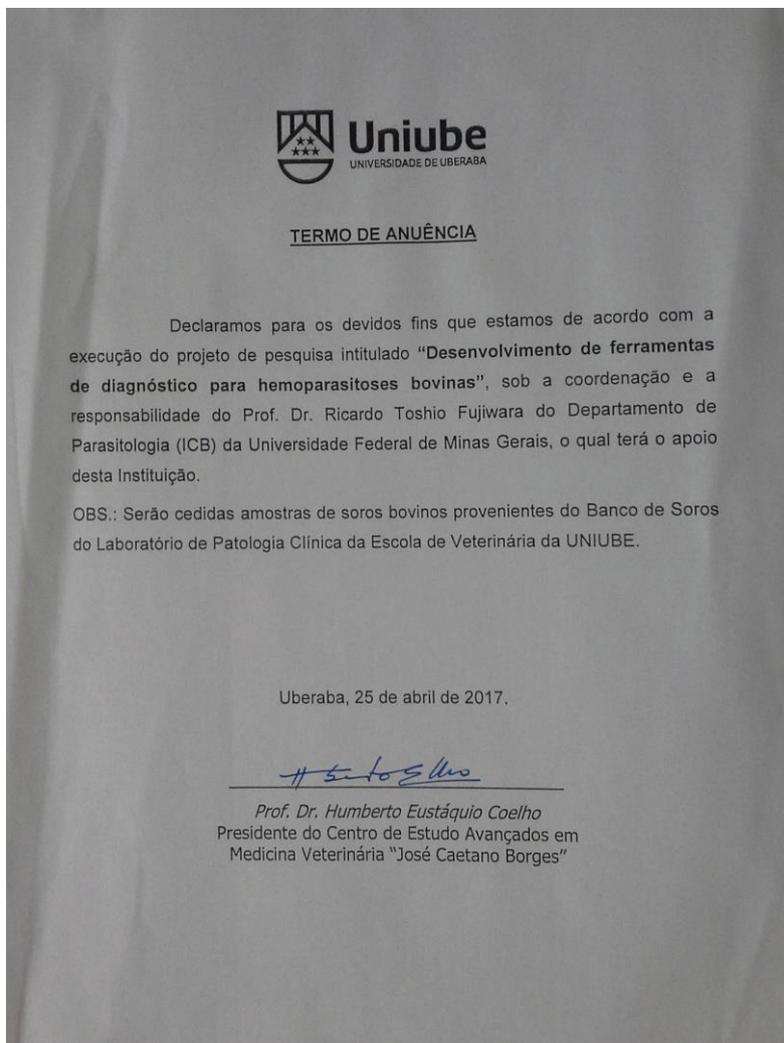
- OSÓRIO, A.L.A.R.; MADRUGA, C.R.; DESQUESNES, M. *et al.* *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World--a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 103, n. 1, p. 1–13, 2008.
- PLATT, K.B.; ADAMS, L.G. Evaluation of the indirect fluorescent antibody test for detecting *Trypanosoma vivax* in South America cattle. *Research in Veterinary Science*, v. 21, p. 53-58, 1976.
- PILLAY, D.; IZOTTE, J.; FIKRU, R. *et al.* *Trypanosoma vivax* GM6 Antigen: A Candidate Antigen for Diagnosis of African Animal Trypanosomosis in Cattle. *Plos One*, v. 8, n. 10, p. 1–10, 2013.
- PIMENTEL, D.S.; RAMOS, C.A.N.; RAMOS, R.A.N. *et al.* First report and molecular characterization of *Trypanosoma vivax* in cattle from state of Pernambuco, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 185, n. 2–4, p. 286–289, 2012.
- SEIDL, A.; DÁVILA, A.M.R.; SILVA, R.A.M.S. Estimated financial impact of *Trypanosoma vivax* on the brazilian Pantanal and Bolivian Lowlands. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, n. 2, p. 269–272, 1999.
- SILVA, A.L.T. Identificação de novos antígenos de espécies do gênero *Leishmania* com potencial uso no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral. 2017. *Tese (Doutorado em Parasitologia)* – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SILVA, R.A.; DA SILVA, J.A.; SCHNEIDER, R. C. *et al.* Outbreak of trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905) in bovines of the Pantanal, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 91, n. 5, p. 561–562, 1996.
- SILVA, R.A.M.S.; SEIDL, A.; RAMIREZ, L. *et al.* *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: Biologia , Diagnóstico e Controle. 2002, p. 135, 2002.
- SILVA, T.M.; OLINDA, R.G.; RODRIGUES, C. M. *et al.* Pathogenesis of reproductive failure induced by *Trypanosoma vivax* in experimentally infected pregnant ewes. *Veterinary Research*, v. 44, n. 1, p. 1–9, 2013.
- SILVA, A.S.; COSTA, M.M.; POLENZ, M. F. *et al.* Primeiro registro de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, v. 39, n. 8, p. 2550–2554, 2009.
- SNAK, A.. Prevalência e fatores de risco associados a infecção por *Neospora caninum* e *Trypanosoma vivax* em bovinos leiteiros e ocorrência de *N. caninum* e parasitos gastrointestinais em cães de propriedades rurais do oeste do Paraná, Brasil. 2017. *Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)* – Universidade Federal do Paraná, Palotina.
- VIEIRA, O.L.E.; MACEDO, L.O. DE; SANTOS, M.A.B. *et al.* Detection and molecular characterization of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* in dairy cattle in the state of Sergipe, northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, v. 2961, 2017.
- UZCANGA, G. L.; PÉREZ-ROJAS, Y.; CAMARGO, R. *et al.* Serodiagnosis of bovine trypanosomosis caused by non-tsetse transmitted *Trypanosoma (Duttonella) vivax* parasites

using the soluble form of a *Trypanozoon* variant surface glycoprotein antigen. *Veterinary Parasitology*, v. 218, p. 31–42, 2016.

WOO, P. T. K. The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. *Canadian Journal of Zoology*, v. 47, n. 5, p. 921–923, 1969.

9. ANEXOS

ANEXO 1: Termo de anuência da UNIUBE



ANEXO 2: Termo de anuência da UDESC



Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV
Laboratório de Bioquímica de Hemoparasitas e Vetores

TERMO DE ANUÊNCIA

Declaramos para os devidos fins que estamos de acordo com a execução do projeto de pesquisa intitulado "**Desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico para hemoparasitoses bovinas**", sob a coordenação e a responsabilidade do Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara do Departamento de Parasitologia (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais, o qual terá o apoio desta Instituição.

Lages – SC, 10 de julho de 2017.

Prof. Dr. Luiz Claudio Miletti

ANEXO 3: Termo de anuência da UFSC



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CCB
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA - MIP

TERMO DE ANUÊNCIA

Florianópolis, 08 de Janeiro de 2018.

Declaramos, para os devidos fins, a anuência e total apoio do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) quanto à participação de seus Docentes na execução do projeto de pesquisa intitulado "**Desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico para hemoparasitoses bovinas**", sob a coordenação e a responsabilidade do Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

E, por ser verdade, firmo o presente termo.

Prof. Dr. Edmundo C. Grisard

Chefe do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
Centro de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Edmundo C. Grisard
Chefe do Departamento de Microbiologia,
Imunologia e Parasitologia - MIPCCB/UFSC
SIAPE nº 1160069

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia - MIPCCB/UFSC Setor F, Bloco A
Campus Universitário Prof. João David Ferreira Lima, Bairro Corrego Grande, Florianópolis, SC, Brasil
Caixa postal 476, CEP 88040-900, Fones: + (48) 3721-4633 / 3721-7109
E-mail: mip@ccb.ufsc.br / Página: www.mip.ufsc.br

ANEXO 4: Certificado de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA – UFMG).



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico para hemoparasitoses bovinas", protocolo do CEUA: 42/2017 sob a responsabilidade de Ricardo Toshio Fujiwara que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 08/05/2017.

Vigência do Projeto (requerida pelo pesquisador)	17/04/2017 a 17/04/2019
*Espécie/linhagem	Bovino1793
Nº de animais	25
Peso/idade	300kg / 1(anos)
Sexo	indiferente
Origem	Banco de soro de laboratório de patologia clínica
*Espécie/linhagem	Bovino1794
Nº de animais	25
Peso/idade	300kg / 1(anos)
Sexo	indiferente
Origem	Banco de soro de laboratório de patologia clínica
*Espécie/linhagem	Bovino1795
Nº de animais	
Peso/idade	300kg / 1(anos)
Sexo	indiferente
Origem	Banco de soro de laboratório de patologia clínica
*Espécie/linhagem	Bovino1796
Nº de animais	25
Peso/idade	300kg / 1(anos)
Sexo	indiferente
Origem	Banco de soro de laboratório de patologia clínica
*Espécie/linhagem	Bovino1797
Nº de animais	289
Peso/idade	300kg / 1(anos)
Sexo	indiferente
Origem	Fazendas do estado de Minas Gerais

Considerações posteriores:

08/05/2017	Aprovado na reunião do dia 08/05/2017. Validade: 08/05/2017 à 07/05/2022
------------	--

ANEXO 5: Depósito de patente



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

Número do Processo: BR 10 2018 002228 8

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 17217985000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

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

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: Brasil

Telefone: (31) 34094774

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PROTEÍNA RECOMBINANTE, MÉTODO, KIT PARA DETECÇÃO DE TRIPANOSSOMATÍDEOS E USO

Resumo: A presente invenção trata de uma proteína recombinante altamente específica, definida pela SEQ ID N°1, a qual pode ser usada para detecção de tripanossomatídeos em amostras biológicas de humanos ou outros animais. A presente invenção trata ainda de um kit para detecção de tripanossomatídeos contendo a proteína recombinante MyxoTLM. Além do mais, a presente invenção refere-se a um método de detecção de tripanossomatídeos utilizando o kit proposto, o qual pode ser utilizado em larga escala para detecção de tripanossomatídeos em amostras biológicas de animais de produção, preferencialmente bovinos, ou em triagem rápida e eficiente de tripanossomatídeos em amostras biológicas.

Figura a publicar: 11

Dados da Prioridade do Depósito

Declaro que os dados identificadores fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

Tipo da Prioridade:	Data Prioridade:	Número Prioridade:	País Prioridade:
Prioridade Interna (66)	14/03/2017	BR102017005068-8	BRASIL

ANEXO 6: Comprovante de cadastro no SisGen



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº AE228AC

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **AE228AC**
Usuário: **Universidade Federal de Minas Gerais**
CPF/CNPJ: **17.217.985/0001-04**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Escherichia coli

Leishmania mexicana

Trypanosoma evansi

Bos taurus

Título da Atividade: **Identificação de um novo antígeno recombinante com uso potencial no diagnóstico sorológico de tripanossomose bovina**

Equipe

Ricardo Toshio Fujiwara	Universidade Federal de Minas Gerais
Lilian Lacerda Bueno	Universidade Federal de Minas Gerais
Ana Luiza Teixeira Silva	Universidade Federal de Minas Gerais
Mariana Santos Cardoso	Universidade Federal de Minas Gerais
Daniella Castanheira Bartholomeu	Universidade Federal de Minas Gerais
João Luís Reis Cunha	Universidade Federal de Minas Gerais
Francisco Pereira Lobo	Universidade Federal de Minas Gerais
Guilherme Rafael Gomide Pinheiro	Universidade Federal de Minas Gerais
Renato de Lima Santos	Universidade Federal de Minas Gerais
Edmundo Carlos Grisard	Universidade Federal de Santa Catarina
Luiz Cláudio Miletto	Universidade do Estado de Santa Catarina
Álvaro Ferreira Júnior	Universidade de Uberaba
Mario Steindel	Universidade Federal de Santa Catarina

Data do Cadastro: **19/12/2017 17:18:44**

Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 17:19 de 19/12/2017.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**

ANEXO 7:

Alinhamentos entre os bancos de dados utilizados e as sequências proteicas de ligação ao GTP DE *L. mexicana* (MyxoLm) gerados no programa BLASTp: As linhas contendo o nome da proteína recombinante correspondem à sequência clonada no vetor pET28a-TEV, enquanto as linhas identificadas como “Sbjct” correspondem as suas sequências nucleotídicas depositadas no TriTrypDB e PiroplasmaDB.

Alinhamento entre o banco de dados do TriTrypDB e as sequências proteicas de ligação ao GTP de *L. mexicana* (MyxoLm) com a proteína codificada pelo gene LmxM.08_29.2200 de *L. mexicana* gerados no programa BLASTp.

Identidade: 98%

MyxoTlm	1	MDQLIGVINELHDAFAGVKMNIKLNLPQIAVVGSSQCGKSSVLESIVGKDFLPRGSGIVT	60
		MDQLI VINELHDAFAGVKMNIKLNLPQIAVVGSSQCGKSSVLESIVGKDFLPRGSGIVT	
Sbjct	1	MDQLISVINELHDAFAGVKMNIKLNLPQIAVVGSSQCGKSSVLESIVGKDFLPRGSGIVT	60
MyxoTlm	61	RCPLVLQVLQPKSNDEEWGEFLHIPQKKFYDFNEIQNEITRRTIEMAGPSAITDKPISL	120
		RCPLVLQVLQPKSN+EEWGEFLHIPQKKFYDFNEIQNEITRRTIEMAGPSAITDKPISL	
Sbjct	61	RCPLVLQVLQPKSNDEEWGEFLHIPQKKFYDFNEIQNEITRRTIEMAGPSAITDKPISL	120
MyxoTlm	121	KVYKTVLNLTLVDLPGLVMNAVGDQPKDIDRQIKDMVTRYVSPKNTIILAI SPANTDLA	180
		KVYKTVLNLTLVDLPGLVMNAVGDQPKDIDRQIKDMVTRYVSPKNTIILAI SPANTDLA	
Sbjct	121	KVYKTVLNLTLVDLPGLVMNAVGDQPKDIDRQIKDMVTRYVSPKNTIILAI SPANTDLA	180
MyxoTlm	181	TSQSLRLAKQLDPDGSRVTGVLTKIDLMDKGTDCDLDILQNRVLQLRHGFIVVCRSQQDI	240
		TSQSLRLAKQLDPDG RTVGVLTGVLTKIDLMDKGTDCDLDILQNRVLQLRHGFIVVCRSQQDI	
Sbjct	181	TSQSLRLAKQLDPDGSRVTGVLTKIDLMDKGTDCDLDILQNRVLQLRHGFIVVCRSQQDI	240
MyxoTlm	241	NDRKSMEGARRSEYEFFANSPIYSPIAEEAGTTYLSKKNLFLLEHIKAVIPDLKRHVDQ	300
		NDRKSMEGARRSEYEFFANSPIYSPIAEEAGTTYLSKKNLFLLEHIKAVIPDLKRHVDQ	
Sbjct	241	NDRKSMEGARRSEYEFFANSPIYSPIAEEAGTTYLSKKNLFLLEHIKAVIPDLKRHVDQ	300
MyxoTlm	301	LMEATKKQMEKLGMPDQDITEPTAQLLYLIKLFSDTLNQTIDGGITDATKELGGARLDY	360
		LMEATKKQMEKLGMPDQDITEPTAQLLYLIKLFSDTLNQTIDGGITDATKELGGARLDY	
Sbjct	301	LMEATKKQMEKLGMPDQDITEPTAQLLYLIKLFSDTLNQTIDGGITDATKELGGARLDY	360
MyxoTlm	361	IFHECFATYVTSLSATKDLTDDHIRINTRNMAGMHATLFPDQVVFVLSKQQITRLEEPC	420
		IFHECFATYVTSLSATKDLTD++IRINTRNMAGMHATLFPDQVVFVLSKQQITRLEEPC	
Sbjct	361	IFHECFATYVTSLSATKDLTDEYIRINTRNMAGMHATLFPDQVVFVLSKQQITRLEEPC	420
MyxoTlm	421	IKCVTFVYEEELSKIVEVCAGKVDRYPNLKEAIIISICKMLLDYRKPTSTHVRTIIQAERG	480
		IKCVTFVYEEELSKIVE CAGKVDRYPNLKEAIIISICKMLLDYRKPTSTHVRTIIQAERG	
Sbjct	421	IKCVTFVYEEELSKIVETCAGKVDRYPNLKEAIIISICKMLLDYRKPTSTHVRTIIQAERG	480
MyxoTlm	481	FINVKHPMMDLAQRAFANIYGTANGESSSPENSRDPNASPADSTQTPKQGGKDIKKN	540
		FINVKHPMMDLAQRAFANIYGTANGESSSPENSRDPNASPA TQTPKQGGKDIKKN	
Sbjct	481	FINVKHPMMDLAQRAFANIYGTANGESSSPENSRDPNASPAGGTQTPKQGGKDIKKN	540
MyxoTlm	541	KDEKRPDKSKDHANADNAMSHGGESVMTDVP SRIMLGKNMTTHEQYMNSAIREMVEGYFS	600
		KDEKRPDKSKDHANADNAMSHGG+SVMTDVP SRIMLGKNMTTHEQYMNSAIREMVEGYFS	
Sbjct	541	KDEKRPDKSKDHANADNAMSHGGKSVMTDVP SRIMLGKNMTTHEQYMNSAIREMVEGYFS	600
MyxoTlm	601	IVKANVADQVPKAITLLMIARLREEVYARLVSYLYSEKTA KALLSEPPGIATQRKAAKEM	660
		IVKANVADQVPKAITLLMIARLREEVYARLVSYLYSEKTA KALLSEPPGIATQRKAAKEM	
Sbjct	601	IVKANVADQVPKAITLLMIARLREEVYARLVSYLYSEKTA KALLSEPPGIATQRKAAKEM	660
MyxoTlm	661	LGALTKAQDALNNVRDYQLTKPEPSS	686
		L ALTKAQDALN+VRDYQLTKEP SS	
Sbjct	661	LEALTKAQDALNSVRDYQLTKPEPSS	686

Alinhamento entre o banco de dados do TriTrypDB e as sequências proteicas de ligação ao GTP de *L. mexicana* (MyxoLm) com a proteína codificada pelo gene TcIL3000_0_42670 de *Trypanosoma congolense* gerados no programa BLASTp.

Identidade: 72%

MyxoTlm	1	MDQLIGVINELHDAFAGVKMNIKLNLPQIAVVGSGKSSVLESIVGKDFLPRGSGIVT	60
Sbjct	79	MD+LI V+N+LHDAFA VKMN KLNLPQIAVVGSS GKSSVLE+IVGKDFLPRGSGIVT	258
MyxoTlm	61	RCPLVLQLVQLPKSNDEEWGEFLHIPQKKFYDFNEIQNEITRRTIEMAGPSAITDKPISL	120
Sbjct	259	RCPLVLQLVQLPKSNTEEWGEFLHMPGKKFYDFTQINEEIQKRTIDVAGQTSITERPINL	438
MyxoTlm	121	KVYSKTVLNLTLVDLPGLVMNAVGDQPKDIDRQIKDMVTRYVSPKNTIILAI SPANTDLA	180
Sbjct	439	KIYSSNVLNLTLVDLPGLVMNAVGDQPKDIDRQIKNMVTRYVSPSNTIILAI SPANADLA	618
MyxoTlm	181	TSQSLRLAKQLDPDGLRTVGVLT KIDLMDKGTDCLDILQNRVLQLRHGFIVVCRSQQDI	240
Sbjct	619	TS SL++AKQLDP+GLRTVGV+TK+DLMD+GTD DIL +V+ LRHGF+G+V RSQ DI	798
MyxoTlm	241	NDRKSMEGARRSEYEFFANSPIYSPIAEEAGTTYLSKKNFLLEHIKAVIPDLKRHVDQ	300
Sbjct	799	N K M AR E EFF + P+Y+PIA+ GT YL++KLN LLEHIKAVIPDLK HVD+	978
MyxoTlm	301	LMEATKKQMEKLGMDQDITEPTAQLLYLIKLFSDTLNQTIDGGITDATKELLGGARLDY	360
Sbjct	979	LLDDTRKQMERLGMREQDKIDPGANMLSLIKVFCDALNHTIDGGASDATKELLGGARLDY	1158
MyxoTlm	361	IFHECFATYVTSLSATKDLTDDYIRINTRNMAGMHATLFPSPDQVFVALSKQQITRLEEPC	420
Sbjct	1159	IFHECF+TYV +SA DLTD+YIRIN RNMAGMHA+LFPSPD VFVAL+KQQI RLE+P	1338
MyxoTlm	421	IKCVTFVYEELSKIVEVCAGKVDYRPNLKEAIIISICKMMLLDYRKPTSTHVRTIIQAERG	480
Sbjct	1339	+KCV F YEEL KI++ CA +++R+P LKEA++ IC++ L ++R PT HV+TII AERG	1518
MyxoTlm	481	FINVKHPMMDELAQRAFANIYGTA	504
Sbjct	1519	FINVKHP M+ L R+F I+G A	1590

Alinhamento entre o banco de dados do TriTrypDB e as sequências proteicas de ligação ao GTP de *L. mexicana* (MyxoLm) com a proteína codificada pelo gene Tb927.3.4760 de *Trypanosoma brucei* gerados no programa BLASTp.

Identidade: 71%

MyxoTLm	1	MDQLIGVINELHDAFAGVKMNIKLNLPQIAVVGVSQSCGKSSVLESIVGKDFLPRGSGIVT	60
		M++LI V+N+LHDAFA VKMNIKLNLPQIAVVGVSQSGKSSVLE+IVGKDFLPRGSGIVT	
Sbjct	1	MERLISVVNDLHDAFANVKMNIKLNLPQIAVVGVSQSAGKSSVLEAIVGKDFLPRGSGIVT	60
MyxoTLm	61	RCPLVLQVLQPKSNDEEWGEFLHIPQKKFYDFNEIQNEITRRTIEMAGPSAITDKPISL	120
		RCPLVLQVLQLP+SN +EWGEFLH P KKF+DF+EI EI RT E+AG SAITDKPI+L	
Sbjct	61	RCPLVLQVLQLP+SNKDEWGEFLHRPNKFFDFSEINEEIQRRTTEVAGHSAITDKPINL	120
MyxoTLm	121	KVYSKTVLNLTLDVLPGLVMNAVGDQPKDIDRQIKDMVTRYVSPKNTIILAISPANTDLA	180
		K+YS VLNLTLDVLPGLVMNAVGDQPKDIDRQIK MVTRY+SP NTIILAISPAN DLA	
Sbjct	121	KIYSSHVLNLTLDVLPGLVMNAVGDQPKDIDRQIKSMVTRYISPSNTIILAISPANADLA	180
MyxoTLm	181	TSQSLRLAKQLDPDGLRVTGVLTKIDLMDKGTDCLDILQNRVLQLRHGFIGVVCRSQQDI	240
		TS SL++AKQLDP+GLRT+GVLTK+DLMD+GT+ DIL +VL LRHGF+GVV RSQ DI	
Sbjct	181	TSSSLQIAKQLDPEGLRVLGVLTKDLMDRGTNAYDILTGVKPLRHFVGVVNRSQHDI	240
MyxoTLm	241	NDRKSMEGARRSEYEFFANSPIYSPIAEEAGTTYLSKKNLFLLEHIKAVIPDLKRHVDQ	300
		N K M+ AR E EFF N P Y+ IA+ GT YL++KLN LLEHIK VIP+LK HVD+	
Sbjct	241	NTSKGMAARDDEKEFFRNHPAYASIADTQGTTEYLTQKLNGLLEHIKMPIELKSHVDK	300
MyxoTLm	301	LMEATKKQMEKLGMDQDITEPTAQLLYLIKLFSDTLNQTIDGGITDATKELGGARLDY	360
		L++ T+KQME+LGM +QD +P A +L LIK+F DTL+ TIDGG +DA+KELGGARLDY	
Sbjct	301	LLDDTRKQMERLGMREQDNIDPGASMLALIKVFCDTLSHTIDGGASDASKELGGARLDY	360
MyxoTLm	361	IFHECFATYVTSLSATKDLTDDYIRINTRNMAGMHATLFPSDQVFVALSKQQITRLEEPC	420
		IFHECF+TYV +SA DLTD+YIRIN RNMAGMHA+LFPSD VFVAL+KQQI RLE+P	
Sbjct	361	IFHECFSTYVNGISAKNDLTDEYIRINARNMAGMHASLFPSDHFVVALAKQQIGRLEDP	420
MyxoTLm	421	IKCVTFVYEEELSKIVEVCAGKVDYRPNLKEAII SICKMLLDYRKPTSTHVRTIIQAERG	480
		+KCV F YEEL KIV+ C+ K++R+P LK+A++ IC++ L ++R PT HV+TII AERG	
Sbjct	421	LKCVQFTYEELIKIVDACSILKLERFPLKQAVVDICREALNEFRAPTVEHVKTIIAAERG	480
MyxoTLm	481	FINVKHPMMDELAQRAFANIYGTANGES	508
		FINVKHP+M++L QR+F I+G ES	
Sbjct	481	FINVKHPLMEDLVQRSFIKIFGGNAQES	508

Alinhamento entre o banco de dados do TriTrypDB e as sequências proteicas de ligação ao GTP de *L. mexicana* (MyxoLm) com a proteína codificada pelo gene *TevSTIB805.3.5040* de *Trypanosoma evansi* gerados no programa BLASTp

Identidade: 71%

MyxoTLm	1	MDQLIGVINELHDAFAGVKMNIKLNLPQIAVVGVSQSCGKSSVLESIVGKDFLPRGSGIVT	60
		M++LI V+N+LHDAFA VKMNIKLNLPQIAVVGVSQS GKSSVLE+IVGKDFLPRGSGIVT	
Sbjct	1	MERLISVVNDLHDAFANVKMNIKLNLPQIAVVGVSQSAGKSSVLEAIVGKDFLPRGSGIVT	60
MyxoTLm	61	RCPLVLQVLQPKSNDEEWGEFLHIPQKKFYDFNEIQNEITRRTIEMAGPSAITDKPISL	120
		RCPLVLQVLQLP+SN +EWGEFLH P KKF+DF+EI EI RT E+AG SAITDKPI+L	
Sbjct	61	RCPLVLQVLQLPKSNKDEWGEFLHRPNKKFFDFSEINEEQNRRTTEVAGHSAITDKPINL	120
MyxoTLm	121	KVYSKTVLNLTLVDLPGLVMNAVGDQPKDIDRQIKDMVTRYVSPKNTIILAI SPANTDLA	180
		K+YS VLNLTLVDLPGLVMNAVGDQPKDIDRQIK MVTRY+SP NTIILAI SPAN DLA	
Sbjct	121	KIYSSHVLNLTLVDLPGLVMNAVGDQPKDIDRQIKSMVTRYISPSNTIILAI SPANADLA	180
MyxoTLm	181	TSQSLRLAKQLDPDGLRVTGVLTKIDLMDKGTDCLDILQNRVLQLRHGFVGVCRSQQDI	240
		TS SL++AKQLDP+GLRT+GVLTK+DLMD+GT+ DIL +VL LRHGF+GVV RSQ DI	
Sbjct	181	TSSSLQIAKQLDPEGLRVLTKLMDRGTNAYDILTGVPLRHRHGFVGVVNRSQHDI	240
MyxoTLm	241	NDRKSMEGARSEYEFFANSPIYSPIAEEAGTYLSKKNLFLLEHIKAVIPDLKRHVDQ	300
		N K M+ AR E EFF N P Y+ IA+ GT YL++KLN LLEHIK VIP+LK HVD+	
Sbjct	241	NTSKGMQAARDEKEFFRNHPAYASIADTQGTTEYLTKLNGLLLEHIKMPIPELKSHVDK	300
MyxoTLm	301	LMEATKKQMEKLGMDQDITEPTAQLLYLIKLFSDTLNQTIDGGITDATKELGGARLDY	360
		L++ T+KQME+LGM +QD +P A +L LIK+F DTL+ TIDGG +DA+KELGGARLDY	
Sbjct	301	LLDDTRKQMERLGMREQDNIDPGASMLALIKVFCDTLSHTIDGGASDASKELGGARLDY	360
MyxoTLm	361	IFHECFATYVTSLSATKDLTDDYIRINTRNMAGMHATLFPSDQVFVALSKQQITRLEEPC	420
		IFHECF+TYV +SA DLTD+YIRIN RNMAGMHA+LFPSD VFVAL+KQQI RLE+P	
Sbjct	361	IFHECFSTYVNGISAKNDLTDEYIRINARNMAGMHASLFPSDHVVFVALAKQQIGRLEDP	420
MyxoTLm	421	IKCVTFVYEEELSKIVEVCAGKVDYRPNLKEAII SICKMLLDYRKPTSTHVRTIIQAERG	480
		+KCV F YEEL KII+ C+ K++R+P LK+A++ IC++ L ++R PT HV+TII AERG	
Sbjct	421	LKCVQFTYEELIKIIDACSIKLERFPKPKQAVVDICREALNEFRAPTVEHVKTIIAAERG	480
MyxoTLm	481	FINVKHPMMDELAQRAFANIYGTANGES	508
		FINVKHP+M++L QR+F I+G ES	
Sbjct	481	FINVKHPLMEDLVQRSFIKIFGGNAQES	508

Alinhamento entre o banco de dados do TriTrypDB e as sequências proteicas de ligação ao GTP de *L. mexicana* (MyxoLm) com a proteína codificada pelo gene TvY486_0304114 de *Trypanosoma vivax* gerados no programa BLASTp.

Identidade: 69%

MyxoTLm	1	MDQLIGVINELHDAFAGVKMNIKLNLPQIAVVGVSQSCGKSSVLESIVGKDFLPRGSGIVT	60
Sbjct	1	MDQLI V+NELHDAF+ VKM++ L LPQIAVVGVSQS GKSSVLE+IVGKDFLPRGSGIVT	60
MyxoTLm	61	RCPLVLQVLQPKSNDEEWGEFLHIPQKKFYDFNEIQNEITRRTIEMAGPSAITDKPISL	120
Sbjct	61	RCPLVLQVLQLP++N EEWGEFLH+P KKF+ F +I EI RT E+AG +ITD+ I+L	120
MyxoTLm	121	KVYSKTVLNLTLDVPLGLVMNAVGDQPKDIDRQIKDMVTRYVSPKNTIILAISPANTDLA	180
Sbjct	121	K+YS +LNLTLVDLPLGLV NAVGDQP DIDRQIK+MVTRY+SP NTIILA+SPAN DLA	180
MyxoTLm	181	TSQSLRLAKQLDPDGLRVTGVLTKIDLMDKGTDCLDILQNRVLQLRHGFIGVVCRSQQDI	240
Sbjct	181	TS SL+LAK++DP+G+RTVGLTK+DLMD+GTD DIL +V+ L HGF+GVV RSQ DI	240
MyxoTLm	241	NDRKSMEGARRSEYEFFANSPIYSPIAEEAGTTYLSKKNLFLLEHIKAVIPDLKRHVQD	300
Sbjct	241	N KSM+ AR E FF N P YS IA+ GT YL++KLN++LLEHIK+V+PDLK VD+	300
MyxoTLm	301	LMEATKKQMEKLGMDQDITEPTAQLLYLIKLFSDTLNQTIDGGITDATKELGGARLDY	360
Sbjct	301	LM++TKKQMEKLG M +Q +P A +L LIK FSD ++ TIDGG TDA+K+LLGGARLDY	360
MyxoTLm	361	IFHECFATYVTSLSATKDLTDDYIRINRNRMAGMHATLFPSDQVFVALSKQQITRLEEPC	420
Sbjct	361	IFHECFATYV L+ K+LTD+YIRIN RNMAGMHA+LFPSD VF AL+KQQI RLEEP	419
MyxoTLm	421	IKCVTFVYEEELSKIVEVCAGKVDYRPNLKEAII SICKMLLDYRKPTSTHVRTIIQAERG	480
Sbjct	420	+KCV F+YEEL KIV+ CA K+DR+P LK+A++ +C+ +L +YR PT +HVRTII AERG	479
MyxoTLm	481	FINVKHPMMDELAQRAFANIYGTANGESS	509
Sbjct	480	F+NVKHPMM++L QR+F ++G +SS	508

Alinhamento entre o banco de dados do PiroplasmaDB e as sequências proteicas de ligação ao GTP de *L. mexicana* (MyxoLm) com a proteína codificada pelo gene BBOV_III010040 de *Babesia bovis* gerados no programa BLASTp.

Identidade = 39%

MyxoTLm	17	MDQLIGVINELHDAFAGVKMNIKLNLPQIAVVGVSQSCGKSSVLESIVGKDFLPRGSGIVT	76
		M+QLI ++++LH A LP IAVVG+QS GKSSVLE+IVG+ FLP+G+GIVT	
Sbjct	1	MEQLIPIVSKLHAILAQAG-ECSPPELPAIAVVGQAQSVGKSSVLEAIVGRPFPLPKGTGIVT	59
MyxoTLm	77	RCPLVLQVLQPKSNDEEWGEFLHIPQKKFYDFNEIQNEITRRTIEMAGPSA-ITDKPIS	135
		+ PL+LQL P + E+GEF H + DFN+I+ EI T + G + ++ PI	
Sbjct	60	QRPLIQLRYDPSAI--EYGEFAHKKQVIYSDFNFKIKAEIRSETERLLGNTKNVSPVPIF	117
MyxoTLm	136	LKVYSKTVLNLTLVDLPLGLVMNAVGDQPKDIDRQIKDMVTRYVSPKNTIILAI SPANTDL	195
		LK+ S V++LTL+DLPG+ V DQ DI+ QI+ M+ Y++ + IILA++ ANTD+	
Sbjct	118	LKIVSPKVVDLTLIDLPGITKVPVNDQTHDIEFQIRRMIMEYIAQPSCII LALTSANTDI	177
MyxoTLm	196	ATSQSLRLAKQLDPDGLRTVGVLT KDIDLMDKGTDCLDILQNRVLQLRHGFIVGVCRSQDD	255
		ATS SL++A+++DP GLRT+GV+TK D+++ LD+LQ +V +LR G++GVVCR	
Sbjct	178	ATSDSLQMAREVDPQGLRTIGVITKCDIVEDANATLDVLQGKVKLRRGYVGVVCR----	233
MyxoTLm	256	INDRKSMEG----ARRSEYEFFANSPIYSPIAEEAGTYYLSKKNFLLEHIKAVIPDLK	311
		DR + + + E FF I+S IA GT +LS LN +L HIK ++P +K	
Sbjct	234	--DRSTAVADTNHSAQEERFFQTHHIFSQIANRCGTRHLSAMLNEILTGHIKDILPYVK	291
MyxoTLm	312	RHVDQLMEATKKQMEKLGMFQDITE-PTAQLLYLIKLFSDTLNQTIDGGITDANK--EL	368
		+ ++ +KQ+E ++ + P+A LL+ FS I G T +L	
Sbjct	292	DKLINML--NEKQIELASYGPSNLADSPSACLHFFSTFSQKFTDIISGRSTSTQNPAQL	349
MyxoTLm	369	LGGARLDYIFHECFATYVTSLSATKDLTDDYIRINTRNMAGMHATLFPDQVVFVALSKQQ	428
		GGAR+ YIF++ + + + + L+D +R RN G + LF + F L K+Q	
Sbjct	350	SGGARIYYIFNDSYLKTLKAFNPLAGLSDIEVRTAIRNSTGPTSAFLVPELAFANLVKKQ	409
MyxoTLm	429	ITRLEEPKIKCVTFVYEELSKIVEVC-AGKVD RYPNLKEAII SICKMMLLDYRKPTSTHV	487
		I LE P ++CV VYEEL I+E C +++RY N++ ++ + + ++ PT +	
Sbjct	410	IQLLEPPSLQCVDQVYEELLNILETCQVEELNRYTNMRKMLQVVRNLIKQCLGPTKDMI	469
MyxoTLm	488	RTIIQAERGFINVKHPMMDLAQRAFANIY	517
		R +I+ E +IN HP D L A A Y	
Sbjct	470	RNMIKIELAYINTNHP--DFLKNNAEYQY	497

Alinhamento entre o banco de dados do PiroplasmaDB e as sequências proteicas de ligação ao GTP de *L. mexicana* (MyxoLm) com a proteína codificada pelo gene BBBOND_0102340 de *Babesia bigemina* gerados no programa BLASTp.

Identidade: 40%

MyxoTLm	17	MDQLIGVINELHDAFAGVKMNIKLNLPQIAVVGVSQSCGKSSVLESIVGKDFLPRGSGIVT	76
		M+QLI +++ LH A + L LP IAVVG+QS GKSSVLE++VG+ FLP+G+GIIVT	
Sbjct	1	MEQLIPLVSRHLRILAWTGES-GLELPAIAVVGQAQSVGKSSVLEALVGRPFPLPKGTGIVT	59
MyxoTLm	77	RCPLVLQVLQVL--PKSNDE-----EWGEFLHIPQKKFYDFNEIQNEITRRTIEMAGP	126
		+ PL+LQ+ +L K N + E GEF H F DFN+I EI T + G	
Sbjct	60	QRPLILQVCELGGAKQNVQLMYDADAVEHGEFAHKGKRVIFEDFNKIMAEIKSETERLLGN	119
MyxoTLm	127	SA-ITDKPISLKVYSKTVLNLTLVDLPLGLVMNAVGDQPKDIDRQIKDMVTRYVSPKNTII	185
		+ ++ PI LK+ S V++LTL+DLPG+ VGDQ DI+ QI++M+ +S + II	
Sbjct	120	TKNVSPVPIFLKIVSPRVVDLTLIDLPGITKVPVGDQTHDIEHQIREMIMERISSPSCII	179
MyxoTLm	186	LAISPANTDLATSQSLRLAKQLDPDGLRTVGVLTKIDLMDKGTDCLDILQNRVLQLRHGF	245
		LA++ ANTD+ATS SL++A+++DP GLRT+GV+TK D+++ G + +D+LQ RV +LR G+	
Sbjct	180	LALTAANTDIATSDSLQMAREVDPHGLRTIGVITKCDMVEDGFNAVDVLQGRVYKLRGRY	239
MyxoTLm	246	IGVVCRSQQDINDRKSMEGARSEYE---FFANSPIYSPIAEEAGTTYLSKKNLFLLEH	302
		+GVVC+ D+ + A S E FF N PIY PIA+ G +LS LN +L H	
Sbjct	240	VGVVCK-----DKSAAPDATHSTAEDAFFTNHPIYGPIAKRCGIRHLSLMLNEMLTFH	293
MyxoTLm	303	IKAVIPDLKRHVDQLMEATKKQMEKLGMDQDIT-EPTAQLLYLIKLFSDTLNQTIDGGI	361
		IK + P +K + +M + ++ G D++ P LL+ FS T I G	
Sbjct	294	IKQMFPCIKSKLLAVMHEREMELLSYFGSSDLSASPGGCLLHFFTAFSQTFRDI IHGKR	353
MyxoTLm	362	TDA--TKELLGGARLDYIFHECFATYVTSLSATKDLTDDYIRINTRNMAGMHATLFPDQ	419
		+ + +L GGAR++YIF++ + + + S L+D IR RN G + LF +	
Sbjct	354	SSRQHSQTLFGGARINYYIFNDSYLKTLKAFSPLSGLSDIEIRTAIRNSTGPASALFVPEI	413
MyxoTLm	420	VFVALSKQQITRLEPCIKCVTFVYEELSKIVEVCA-GKVD RYPNLKEAIIISICKKMLLD	478
		F L K+QI LE P ++CV VYEEL I+E C +++R+ N++ ++ + K++L	
Sbjct	414	AFENLVKKQIRLLETPSLQCVQVYEELNILESCEIPELNRFMNMRRMLVVIKELLRQ	473
MyxoTLm	479	YRKPTSTHVRTIIQAERGFINVKHP	503
		+PT +R +I+ E +IN HP	
Sbjct	474	CVEPTKDMIRNLIKIELAYINTNHP	498

Alinhamento entre o banco de dados do PiroplasmaDB e as sequências proteicas de ligação ao GTP de *L. mexicana* (MyxoLm) com a proteína codificada pelo gene TP02_0143-t26_1-p1 de *Theileria parva* gerados no programa BLASTp.

Identidade: 39%

MyxoTLm	17	MDQLIGVINELHDAFAGVKMNIKLNLPQIAVVGSQLKSSVLESIVGKDFLPRGSGIVT	76
		M++LI +I+ LH + N ++LP IAV+G+QS GKSSVLE+IVG FLP+G GI VT	
Sbjct	1	MEKLIPLISRLHSVLSWTGEN-SIDLPAIAVIGAQSVGKSSVLEAIVGFPPFLPKGYGIVT	59
MyxoTLm	77	RCPLVLQVLQPKSNDEEWGEFLHIPQKKFYDFNEIQNEITRRTIEMAGPSA-ITDKPIS	135
		+ PL+L+L S D +GEF H + DF +I+ EI T + G + ++ PI	
Sbjct	60	QRPLIILRLCHDNGSKD--YGEFAHKGRTIYDDFQKIKEEIKLETERITGSTKNVSPVPIF	117
MyxoTLm	136	LKVYSKTVLNLTLVDLPLVMNAVGDQPKDIDRQIKDMVTRYVSPKNTIILAI SPANTDL	195
		LK+ S V++LTL+DLPG+ VGDQ DI+ QI+ M+ Y++ IILA+S ANTD+	
Sbjct	118	LKITSPKVIDLTLIDLPGITKVPVGDQTNDIEMQIRQMILEYITKPTCIILALSAANTDI	177
MyxoTLm	196	ATSQSLRLAKQLDPDLRGTVGLTKIDLMDKGTDCLDILQNRVLQLRHGF-----	245
		ATS SL++A+++DP GLRT+GV+TK D++DKG D +++LQ ++ +LR GF	
Sbjct	178	ATSDSLKMAREVDPGSLRTIGVITKCDMLDKGVDAIELLQGKIYKLRKGFDFLIKCFYSY	237
MyxoTLm	246	IGVVCRSQDINDRKSMEGARSEYEFFANSPIYSPIAEEAGTTYLSKKNLF-----	297
		+GVVCR D + ++ E +FF N P YS IA++ G YL+ LN	
Sbjct	238	VGVVCR---DKDQKQDAPHDHNDDEEKFFKNHPSYSSIAKCGIRYLTNLLNEVSLVHRKI	294
MyxoTLm	298	--LLEHIKAVIPDLKRHVDQLMEATKKQMEKLG MFD----QDITE-PTAQLLYLIKLF S	350
		+L HIK ++P +K + ++ + ++ + DIT P A LL+ FS	
Sbjct	295	LQMLTSHIKDMLPYVKS KILTILHEYETELTVINNSAVYGVTDITSTPGACLLHYFTKFS	354
MyxoTLm	351	DTLNQ TIDGGITDA--TKELLGGARLDYIFHECFATYVTSLSATKDLTDDYIRINTRNMA	408
		TIDG I T L GGAR+ +IF++ + + + S L+D IR RN	
Sbjct	355	QRFKDTIDGKIVPRHHTSRLYGGARIYFIFNDSYLRTLNAFSPLTGLSDIEIRTAIRNST	414
MyxoTLm	409	GMHATLFPSPDQV FVALSKQQITRLEEPCIKCVTFVYEELSKIVEVC-AGKVDRYPNLKEA	467
		G ++ LF + F L K+QI LE P ++CV VYEEL I+E C +++RY N++	
Sbjct	415	GPYSALFVPEIAFENLVKKQIKLLES PSLQCVDQVYEELQNIENCVDPEINRYMMNRNK	474
MyxoTLm	468	IISICKMLLDYRKPTSTHVRTIIQAERGFINVKHPMMDELAQRAFANIYGTA	520
		I+++ K ML + +PT ++ +I+ E +IN HP D L A A IY T	
Sbjct	475	ILTVVKDMLRECLEPTKDI IKNLIKIELAYINTNHP--DFLRNSALAEIYNTT	525

Alinhamento entre o banco de dados do PiroplasmaDB e as sequências proteicas de ligação ao GTP de *L. mexicana* (MyxoLm) com a proteína codificada pelo gene TA11580-t26_1-p1 de *Theileria annulata* gerados no programa BLASTp.

Identidade: 41%

MyxoTlm	17	MDQLIGVINELHDAFAGVKMNIKLNLPQIAVVGVSQSCGKSSVLESIVGKDFLPRGSGIVT	76
		M++LI +I+ LH + N ++LP IAV+G+QS GKSSVLE+IVG FLP+G GIVT	
Sbjct	1	MEKLIPLISRLHSVLSWTGENT-IDLPAIAVIGAQS SVGKSSVLEAIVGF PFLPKGYGIVT	59
MyxoTlm	77	RCPLVLQVLQPKSNDEEWGEFLHIPQKKFYDFNEIQNEITRRTIEMAGPSA-ITDKPIS	135
		+ PL+L+L S+D +GEF H + DF +I+ EI T + G + ++ PI	
Sbjct	60	QRPLILRLCHDNGSSD--YGEFAHKRGTIYDDFQKIKEEIKLETERITGSTKNVSPVPIF	117
MyxoTlm	136	LKVYSKTVLNLTLVDLPLGLVMNAVGDQPKDIDRQIKDMVTRYVSPKNTIILAI SPANTDL	195
		LK+ S V++LTL+DLPG+ VGDQ DI+ QI+ M+ Y++ IILA+S ANTD+	
Sbjct	118	LKITS PKVIDLTLIDLPGITKVPVGDQTNDIEMQIRQMILEYITKPTCIILALSAANTDI	177
MyxoTlm	196	ATSQSLRLAKQLDPDGLRTVGVLT KDIDLMDKGTDCLDILQNRVLQLRHGFIVGVCRSQQD	255
		ATS SL++A+++DP GLRT+GV+TK D++DKG D +++LQ ++ +LR G++GVVCR D	
Sbjct	178	ATSDSLKMAREVDPSGLRTIGVITKCDMLDKGVDAIELLQGGKIYKLRKGYVGVVCR---D	234
MyxoTlm	256	INDRKSMEGARSEYEFFANSPIYSPIAEEAGTTYLSKKNFLLEHIKAVIPDLKRHVD	315
		+ + E +FF N P YS IA++ G YL+ LN +L HIK ++P +K +	
Sbjct	235	KDGGPDAPHDNDEEKFFKNHPSYSSIAKKCGIRYL TNLLNEMLTSHIKDMLPYVVKSKIL	294
MyxoTlm	316	QLMEATKKQMEKLG MFDQDITEPTAQLLYLIKLFSDTLNQTIDGGIT--DATKELGGAR	373
		++ + ++ G+ D T P A LL+ FS TIDG I T L GGAR	
Sbjct	295	TILHEYETELTVYGVTDITST-PGACLLHYFTKFSQRFKDTIDGKIVPRHQTSRLYGGAR	353
MyxoTlm	374	LDYIFHECFATYVTSLSATKDLTDDYIRINTRNMAGMHATLFPDQVFVVALSKQQITRLE	433
		+ +IF++ + + + S L+D IR RN G ++ LF + F L K+QI LE	
Sbjct	354	IYFIFNDSYLR TLNAFSPLTGLSDIEIRTAIRNSTGPYSALFVPEIAFENLVKKQIKLLE	413
MyxoTlm	434	EPCIKCVTFVYEELSKIVEVC-AGKVD RYPNLKEAII SICKMMLLDYRKPTSTHVRTIIQ	492
		P ++CV VYEEL I+E C +++RY N++ I+++ K ML + +PT ++ +I	
Sbjct	414	SPSLQCVDQVYEELQNIENCDVPEINRYMNMNRNKILT VVKDMLRECLEPTKDIKLNIN	473
MyxoTlm	493	AERGFINVKHPMMDELAQRAFANIYGTA 520	
		E +IN HP D L A A IY T	
Sbjct	474	IELAYINTNHP--DFLRNSALAEIYNTT 499	

ANEXO 08:

Alinhamento gerado no programa BLASTn entre as sequências nucleotídicas obtidas do sequenciamento do inserto presente no plasmídeo pET28a-TEV e a respectiva sequência depositada no banco de dados do TriTrypDB, relativas à proteína: proteína de ligação ao GTP de *L. mexicana* (MyxoLm), obtendo identidade de 99%.

```
MyxoTLm 1 ATGGACCAGTTGATTGGTGTGATCAACGAGCTTCATGACGCCTTCGCGGGCGTCAAGATG 60
Sbjct 1 ATGGACCAGTTGATCAGCGTGATAAACGAGCTTCATGACGCCTTCGCGGGCGTCAAGATG 60
MyxoTLm 61 AACATCAAGCTCAACCTCCCCAGATCGCTGCTCGTAGTCAGAGTTGTGGCAAGAGC 120
Sbjct 61 AACATCAAGCTCAACCTCCCCAGATCGCTGCTCGTAGTCAGAGTTGTGGCAAGAGC 120
MyxoTLm 121 TCTGTGCTGGAGTCGATCGTCGGCAAGGACTTTTTCGCGGGCGATCCGGCATTGTCAAC 180
Sbjct 121 TCTGTGCTGGAGTCGATCGTCGGCAAGGACTTTTTCGCGGGCGATCCGGCATTGTCAAC 180
MyxoTLm 181 CGCTGTCCCTCGTGTGCTGAGCTCGCTGAGCTGCCCCAAGTCAACGATGAGGATGGGGC 240
Sbjct 181 CGCTGTCCCTCGTGTGCTGAGCTCGCTGAGCTGCCCCAAGTCAACGATGAGGATGGGGC 240
MyxoTLm 241 GAGTTCCTACACATCCCCAAAAGAGTTTATGACTCAACGAGATCCAAAATGAAAT 300
Sbjct 241 GAGTTCCTACACATCCCCAAAAGAGTTTATGACTCAACGAGATCCAAAATGAAAT 300
MyxoTLm 301 ACACGCCGACAGTCCAAATGGCCGGCCGTCGCGGATCACGGATAAGCCGATCAGCCTC 360
Sbjct 301 ACACGCCGACAGTCCAAATGGCCGGCCGTCGCGGATCACGGATAAGCCGATCAGCCTC 360
MyxoTLm 361 AAGGTTTACTCGAAGACGGTGTGAACCTGACTCTCGTGACTTACCTGGTCTGGTGATG 420
Sbjct 361 AAGGTTTACTCGAAGACGGTGTGAACCTGACTCTCGTGACTTACCTGGTCTGGTGATG 420
MyxoTLm 421 AAGCCCTTGGCGATCAGCCAAAGGACATTTGACCCGAGATCAAGGATATGGTACGCGC 480
Sbjct 421 AAGCCCTTGGCGATCAGCCAAAGGACATTTGACCCGAGATCAAGGATATGGTACGCGC 480
MyxoTLm 481 TAGTGTGCGCCAAGAACAATCATCTGGCTATTTCTCTGCAACACCGATCTTGCC 540
Sbjct 481 TAGTGTGCGCCAAGAACAATCATCTGGCTATTTCTCTGCAACACCGATCTTGCC 540
MyxoTLm 541 ACAGCCAGTCGCTGCGCTGGCAAGGAGCTGACCCGAGCTGACCCGAGCTGACCCGAGCT 600
Sbjct 541 ACAGCCAGTCGCTGCGCTGGCAAGGAGCTGACCCGAGCTGACCCGAGCTGACCCGAGCT 600
MyxoTLm 601 GTGCTCACAAAGATTGACTTGATGGCAAGGGCACGGAGTGTCTGACACTACTGCAGAAC 660
Sbjct 601 GTGCTCACAAAGATTGACTTGATGGCAAGGGCACGGAGTGTCTGACACTACTGCAGAAC 660
MyxoTLm 661 AAGGTTCTACAGCTCCGCCACGGCTTATCGGCGTGTGTGCGCTAGTCAGCAGGATATC 720
Sbjct 661 AAGGTTCTACAGCTCCGCCACGGCTTATCGGCGTGTGTGCGCTAGTCAGCAGGATATC 720
MyxoTLm 721 AAGGTTCTACAGCTCCGCCACGGCTTATCGGCGTGTGTGCGCTAGTCAGCAGGATATC 780
Sbjct 721 AAGGTTCTACAGCTCCGCCACGGCTTATCGGCGTGTGTGCGCTAGTCAGCAGGATATC 780
MyxoTLm 781 CCCATCTACTCCCCCATCGCGGAGGAGCTGGTACCACCTACCTTAGCAAGAAGCTGAAC 840
Sbjct 781 CCCATCTACTCCCCCATCGCGGAGGAGCTGGTACCACCTACCTTAGCAAGAAGCTGAAC 840
MyxoTLm 841 TTTTGTGCTGGAGCACATCAAAGCCGTTATTCAGACCTGAAGCCGACGCTGGACCAA 900
Sbjct 841 TTTTGTGCTGGAGCACATCAAAGCCGTTATTCAGACCTGAAGCCGACGCTGGACCAA 900
MyxoTLm 901 CTGATGGAAGCCCAAGAAGCAGATGGAGAACTGGGCATGTTGATCAGGACATCACC 960
Sbjct 901 CTGATGGAAGCCCAAGAAGCAGATGGAGAACTGGGCATGTTGATCAGGACATCACC 960
MyxoTLm 961 GAACCCACTGCACAGCTGCTGTACCTTATCAAGCTGTTACGCGACAGCTGAATCAGAGC 1020
Sbjct 961 GAACCCACTGCACAGCTGCTGTACCTTATCAAGCTGTTACGCGACAGCTGAATCAGAGC 1020
MyxoTLm 1021 ATCGATGGTGGTATCACGGATGCCACGAAGGAGCTGCTTGGTGGGGCGGCTGGACTAC 1080
Sbjct 1021 ATCGATGGTGGTATCACGGATGCCACGAAGGAGCTGCTTGGTGGGGCGGCTGGACTAC 1080
MyxoTLm 1081 ATCTTCCACGAGTGCTTCGCCACCTACGTGACCAGCTGAGCGCCACGAAGATCTCACA 1140
Sbjct 1081 ATCTTCCACGAGTGCTTCGCCACCTACGTGACCAGCTGAGCGCCACGAAGATCTCACA 1140
MyxoTLm 1141 GACGACTACATCCGCATCAACACGCGCAACATGSCGGTATGACGCGCACTCTGTTCCCC 1200
Sbjct 1141 GACGACTACATCCGCATCAACACGCGCAACATGSCGGTATGACGCGCACTCTGTTCCCC 1200
MyxoTLm 1201 TCCGACCAGTGTGTTGTCGCTTGTCAAAGCAGCAGATCACCCGCTCTCGAGGAGCCGTG 1260
Sbjct 1201 TCCGACCAGTGTGTTGTCGCTTGTCAAAGCAGCAGATCACCCGCTCTCGAGGAGCCGTG 1260
MyxoTLm 1261 ATCAAGTGCCTCACCTTCGTCTACGAGGAGCTGAGCAAGATCGTTGAAACTGCGCTGCG 1320
Sbjct 1261 ATCAAGTGCCTCACCTTCGTCTACGAGGAGCTGAGCAAGATCGTTGAAACTGCGCTGCG 1320
MyxoTLm 1321 AAGGTGACCGCTATCCGAACCTGAAGGAGCTATCATTTGATTTGCAAGAAGATGCTG 1380
Sbjct 1321 AAGGTGACCGCTATCCGAACCTGAAGGAGCTATCATTTGATTTGCAAGAAGATGCTG 1380
MyxoTLm 1381 CTCGACTACCGCAAAACCACTCAACGCAGCTGCGCACCATCATCCAAGCCGAGCGCGC 1440
Sbjct 1381 CTCGACTACCGCAAAACCACTCAACGCAGCTGCGCACCATCATCCAAGCCGAGCGCGC 1440
MyxoTLm 1441 TTCATTACGTGAAGCATCCTATGATGGACGAGTTAGCGAGCGCGCGTTTCGGAATATC 1500
Sbjct 1441 TTCATTACGTGAAGCATCCTATGATGGACGAGTTAGCGAGCGCGCGTTTCGGAATATC 1500
MyxoTLm 1501 TACGGCACCGCGAACGGAGAGTCTCCTCGCCGGA 1535
Sbjct 1501 TACGGCACCGCGAACGGAGAGTCTCCTCGCCGGA 1535
```