

AVISO

Em atenção aos artigos 11 e 96 da Lei nº 9.279/96 (Lei da Propriedade Industrial) e em consonância com a Resolução CAD 005/2008 da Universidade de Brasília, informamos que o presente trabalho somente foi publicado na data indicada neste informativo. A respectiva defesa, para obtenção do título pretendido, foi realizada na modalidade de sessão fechada, conforme a documentação anexada, de forma que o requisito da novidade, exigida nos referidos artigos da Lei, foi devidamente preservado.

Data da entrega do trabalho: **24/08/2016**

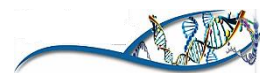
Data da publicação: **24/08/2018**

Patrícia Nunes da Silva
Coordenadora da Coordenadoria de Gestão da Informação Digital



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB

FACULDADE DE MEDICINA - UNB



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR
LABORATÓRIO DE ANÁLISES MOLECULARES DE PATÓGENOS - LAMP

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DO ANTÍGENO METALOPEPTIDASE MITOCONDRIAL PARA
DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL**

Hérick Sampaio Muller

Orientador: Dr. Carlos André Ornelas Ricart

Co-orientador: Dr. Vicente de Paulo Martins

Brasília - DF

2016

Hérick Sampaio Muller

**AVALIAÇÃO DO ANTÍGENO METALOPEPTIDASE MITOCONDRIAL PARA
DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre pelo programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília.

Orientador: Dr. Carlos André Ornelas Ricart

Co-orientador: Vicente de Paulo Martins

Brasília – DF

2016

AVALIAÇÃO DO ANTÍGENO METALOPEPTIDASE MITOCONDRIAL PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre pelo programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília.

Hérick Sampaio Muller

Dissertação aprovada em: ____/____/____.

Comissão julgadora:

1º Mem. (Presidente): _____

Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart (UnB)

2º Membro: _____

Prof.^a Dra. Tatiana Amabile de Campos (UnB)

3º Membro: _____

Prof.^a Dra. Izabella Marques Dourado Bastos Charneau (UnB)

4º Membro (Suplente): _____

Prof.^a Dra. Carla Nunes de Araujo. (UnB)

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Análises Moleculares de Patógenos, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Financiamento: FAPDF / FAHUB / CNPq / CAPES.

DEDICATÓRIA

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você
estará fazendo o impossível”

São Francisco de Assis

A Deus, pela graça da vida.

Aos meus amados pais Maria e Geraldo.

Aos meus bons e sempre presentes tio Evilasio e tia Lucia.

Aos meus queridos irmãos Eduardo, Henrique e Elize.

A minha ruiva por todo apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente aos meus orientadores Dr. **Vicente de Paulo Martins** e **Carlos Andre Ornelas Ricart** por todos seus ensinamentos, pela oportunidade de aumentar meus conhecimentos e por nunca terem desistido de seu aluno.

Agradeço a Dra. **Nadjar Nitz**, **Mariana Hecht** e ao Professor **Antonio Teixeira** que me deram oportunidade de ingressar na vida científica, sempre com carinho e sabedoria em suas palavras.

Agradeço ao Dr. **Alessandro O. Sousa** e **Adriano Rios** e **Tamires Vital** por terem me apadrinhado na ciência, por seus conselhos, explicações e muito bom humor em suas brincadeiras.

Nesta trajetória, houve muitas pessoas com quem fiz amizades e me ajudaram de uma maneira que jamais esquecerei: ao grande **Rafael Rocha**, **Willie Lili**, **Adriano**, **Alessandro**, **Agnelo Agnes**, Prof. **Teixeira**, à **Juliana Jubs**, **Luis LuLu Maia** por todas as conversas, debates e dicas, **Lucas**, **Marcio**, à **Rafaela** sargenta, à **Laura**, ao **Nicholas de Mojana** pela paciência e dicas, ao grande **C.A** por toda bondade, à Profa. **Tatiana** e seus puxões de orelha, às Profas. **Flávia**, **Carla**, **Isabela** e **Beatriz** por me ajudarem a dar continuidade aos experimentos em seus laboratórios, à **Clênia Yanna** e **Camila** por sempre estarem de braços abertos para me ajudar, ao perigoso **Anderson Dedé** e ao todo poderoso Prof. **Vivi** e sua esposa Dra. **Adriana** por serem mais que professores em minha jornada.

A todos meus amigos e familiares que me apoiaram (**eles sabem quem são**).

Agradeço a minha família: meus irmãos **Eduardo**, **Henrique**, e minha irmã **Elize**, minha Mãe **Maria**, meu Pai **Geraldo**, ao meu tio **Evilasio** e a minha tia **Lucia** por sempre estarem me ajudando e incentivando a seguir em frente.

Agradeço de todo coração a **Jessica Ribeiro**, que me ajudou e apoiou sempre e sempre. Estando sempre ao meu lado, desde a elaborar aulas que ela achava tão chatas ou indo me resgatar do laboratório. Obrigado minha princesa de cabelos rubros.

RESUMO

A leishmaniose é uma antropozoonose que possui diferentes manifestações clínicas, sendo transmitida durante o repasto sanguíneo de flebotomíneos e causada por várias espécies de parasitos do gênero *Leishmania*. Esta doença causa grandes agravos na saúde humana em escala global, com altas taxas de mortalidade anualmente. Inúmeros fatores de risco impulsionam a transmissão do parasito para áreas anteriormente não endêmicas provocados tanto pelo ser humano quanto por variações naturais do ambiente. O controle da leishmaniose visceral (LV) no Brasil se faz por meio da detecção e eliminação dos reservatórios da doença, controle das populações de vetor, prevenção do contato com vetores infectados e tratamento dos casos humanos. No entanto, essas medidas são aplicadas frequentemente de forma isolada e tem-se mostrado limitadas. Como consequência, observa-se a manutenção ou mesmo expansão da LV para áreas onde sua ocorrência não era registrada. Nesse contexto, medidas que visem à redução da transmissão e suas aplicações de forma integrada são de fundamental importância, tais como o diagnóstico precoce e com alta sensibilidade dos humanos e dos cães infectados, tratamento eficaz e o emprego de vacinas. O diagnóstico tradicional da LV é baseado na presença de anticorpos anti-*Leishmania* e o padrão-ouro é a visualização de formas amastigotas do parasito em amostras biológicas. No entanto, a introdução da vacinação de cães nos últimos anos gera a necessidade de novos métodos sorológicos capazes de diferenciar entre animais vacinados e infectados. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a metalo-peptidase zinco dependente, Clã ME, Família M16 secretada de *L. infantum* como marcador para diagnóstico sorológico de LV. A análise *in silico* revelou que a proteína teria 47,35% de resíduos de aminoácidos expondo sua superfície ao solvente e nestas áreas foram encontradas possíveis zonas para epitopos de células B, sítios de glicosilação e fosforilação. A expressão das proteínas em sistemas diferentes possibilitou avaliar a imunogenicidade das proteínas heterólogas com e sem modificações pós-traducionais contra soro de cães infectados e sadios. O resultado do ensaio de ELISA mostrou altos índices de anticorpos específicos contra as proteínas heterólogas e a comparação dos resultados indicou que a proteína heteróloga expressa em modelo procarioto identificou todos os animais infectados nas diluições 1:50 e 1:100 de soro. Os dados estatísticos do teste t mostraram *p value* < 0.01, dando credibilidade na hipótese de uso desta proteína em possível diagnóstico para LV. O estudo realizado apresenta informações relevantes sobre o uso da metalo-

peptidase estudada para que possa ser associada ao melhoramento do diagnóstico da LV. Testes para definição da sensibilidade e especificidade fazem-se necessários em futuros trabalhos.

Palavras chave: *Leishmania*, leishmaniose, metalo-peptidase, proteína heteróloga, diagnóstico.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a anthropozoonosis with different clinical manifestations, being transmitted by sandfly during blood feeding and caused by several species of parasites of the genus *Leishmania*. This disease causes major health problems on a global scale, with high mortality rates annually. Several risk factors drive the transmission of the parasite to areas not previously endemic due to man activities and by natural environmental variations. Control of visceral leishmaniasis (VL) in Brazil is made through the detection and elimination of disease reservoirs, control of vector populations, preventing contact with infected vectors and treatment of human cases. However, these measures are often applied in isolation and has shown limited efficacy. As a result, there is the maintenance or expansion of the VL to areas where their occurrence was not recorded. In this context, measures aimed to reduce transmission and its applications in an integrated manner are of fundamental importance, such as early diagnosis with high sensitivity of humans and infected dogs, effective treatment and the use of vaccines. Traditional diagnosis of VL is based on the presence of anti-*Leishmania* antibodies and the gold standard is the visualization of amastigote forms of the parasite in biological samples. However, the introduction of vaccination of dogs in recent years creates the need for new serological methods able to differentiate between vaccinated and infected animals. The objective of this study was to evaluate the metallo-peptidase zinc dependent Clan ME, M16 Family, secreted from *L. infantum*, as a marker for serological diagnosis of VL. *In silico* analysis revealed that the protein had 47.35% of amino acid residues exposed to the solvent, exhibiting on your surface areas for possible B cell epitopes, glycosylation and phosphorylation sites. The expression of proteins in different systems allowed to assess the immunogenicity of the heterologous proteins, with and without post-translational modifications, against sera from infected and healthy dogs. The results of the ELISA assay showed high levels of specific antibodies against heterologous proteins and the comparison of the results shows that heterologous protein expressed in a prokaryotic model was able to differentiate all infected animals at dilutions 1:50 and 1: 100 serum. Statistical analysis emphasize the potential of this protein to be used in diagnosis for VL. The study presents relevant information on the use of metallo-peptidase studied so it can be associated with the improvement of the diagnosis of VL. Tests to define the sensitivity and specificity are made necessary in future work.

Keywords: *Leishmania*, leishmaniasis, metallo-peptidase, heterologous protein, diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Sinais clínicos da leishmaniose.....	4
Figura 2:	Áreas endêmicas da leishmaniose cutânea no mundo.....	5
Figura 3:	Áreas endêmicas da leishmaniose visceral no mundo.....	7
Figura 4:	Agente etiológico da leishmaniose.....	8
Figura 5:	Classificação das espécies de <i>Leishmania</i> conforme seu padrão de desenvolvimento no hospedeiro invertebrado.....	9
Figura 6:	Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> no homem.....	11
Figura 7:	Estrutura da MPP da subunidade alfa do Clã ME, família M16, subfamília M16B de <i>Homo sapiens</i>	18
Figura 8:	Sequências proteica e nucleotídica da MPP.....	36
Figura 9:	Alinhamento múltiplo entre tripanosomatídeos.....	38
Figura 10:	Análise da estrutura físico-química da proteína pela ferramenta PredictProtein.....	40
Figura 11:	Correlação dos dados do PredictProtein com BepiPred.....	43
Figura 12:	Predição de sítios de fosforilação com a ferramenta NetPhos v2.0.....	44
Figura 13:	Predição de sítios de glicosilação com as ferramentas GlycoEP e YinOYang v1.2.....	45
Figura 14:	Correlação dos dados preditos em <i>L. infantum</i> x sequências de outros tripanosomatídeos.....	47
Figura 15:	Padronização das PCRs usando os primers LC01/02.....	49
Figura 16:	Análise da presença do gene LDBPK_130760 no DNA plasmidial extraído.....	50
Figura 17:	Análise do sequenciamento dos clones.....	51
Figura 18:	Verificação da presença do gene LDBPK_130760 no vetor de expressão após transformação.....	52
Figura 19:	Análise da expressão da rMPP em sistema procarioto em escala de tempo por indução de IPTG no meio de cultura e análise de solubilidade após sonicação.....	53
Figura 20:	Etapas da purificação da rMPP de sistema procarioto.....	54
Figura 21:	Detecção da rMPP por <i>Western blotting</i> com anticorpo anti calda de histidina da rMPP de sistema procarioto.....	55

Figura 22:	Análise molecular por PCR da presença do gene LDBPK_130760 em <i>L. tarentolae</i> transfectada.....	56
Figura 23:	Etapas da purificação da rMPP de sistema eucarioto dos extratos solúvel e insolúvel.....	56
Figura 24:	Detecção da rMPP por <i>Western blotting</i> com anticorpo anti calda de histidina da rMPP de sistema eucarioto.....	57
Figura 25:	Avaliação de antigenicidade da proteína XP_001464106.1 dos sistemas procarioto e eucarioto por ELISA.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Primers utilizados nos ensaios moleculares por PCR	23
Tabela 2:	Predição de epitopos lineares para células B	41

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grau célsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BLASTn	<i>Basic Local Alignment Search Tool, nucleotide query</i>
C₆H₈O₇	Ácido cítrico
CaCl₂	Cloreto de cálcio
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
D.O.	Densidade óptica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	EtilenoDiaminoTetraAcético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> – Ensaio de Imunoabsorbância enzimática
g	Grama
g	Força gravitacional
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
LB	<i>Luria Broth</i>
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
Na₂CO₃	Carbonato de sódio
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
NaH₂PO₄	Fosfato monossódico
Na₂HPO₄	Fosfato de sódio dibásico
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nm	Nanômetro
OPD	<i>o-Phenylenediamine</i>
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SSC	Tampão salino citrato de sódio
TAE	Tris ácido acético EDTA
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl--D-galactoside

WHO

World Health Organization – Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1.Leishmaniose	1
1.2.Epidemiologia	2
1.3.Manifestações Clínicas	3
1.4.Agente Etiológico e Morfologia	8
1.5.Classificação Taxonômica	9
1.6.Ciclo de Vida e Transmissão	10
1.7.Diagnóstico.....	11
1.8.Interação parasito-hospedeiro	14
1.9.Proteases secretadas de <i>Leishmania</i>	16
2.JUSTIFICATIVA.....	20
3.OBJETIVOS.....	21
4.MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1.Desenvolvimento	22
4.2.Predição da estrutura primária, sítios de fosforilação, glicosilação e de epitopos lineares de células B.....	22
4.2. Desenho dos <i>Primers</i>	23
4.3.Reação de polimerização em cadeia (PCR)	23
4.4.Análise Eletroforética.....	24
4.5.Clonagem dos Produtos de PCR e dos Produtos de Digestão Plasmidial.....	24
4.6.Quantificação.....	26
4.7.Sequenciamento.....	26
4.8.Análise das sequências	27
4.9.Expressão das proteínas em modelo procariótico	27

4.10. Expressão de proteínas em modelo eucariótico	29
4.11. Purificação da proteína recombinante dos sistemas eucarioto e procaríoto por cromatografia de afinidade.	31
4.12. <i>Western Blotting</i>	32
4.13. Ensaio de Imunoabsorbância Enzimática (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> - ELISA)	33
4.14. Análise estatística.....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1. Análise <i>in silico</i>	35
5.3. Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)	48
5.4. Análise do Sequenciamento	50
5.5. Expressão de proteína em sistema procaríoto	52
5.6. Expressão de proteína em modelo eucarioto.....	55
5.7. Ensaio de Imunoabsorbância Enzimática - ELISA.....	57
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
7. BIBLIOGRAFIA	62
8. APÊNDICES	74
9. ANEXOS.....	87

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmaniose

As leishmanioses são um conjunto de doenças que acometem animais e humanos (antropozoonóticas) e causam diferentes manifestações clínicas causadas por parasitos protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*. Estas doenças acometem 98 países em cinco continentes - África, Ásia, Europa e Américas – principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (Smith e Peacock, 2007; Bhargava e Singh, 2012; WHO, 2016). Estima-se que pelo menos 20 espécies de *Leishmania* causem doenças em humanos, sendo transmitidas por inoculação durante o repasto sanguíneo de fêmeas infectadas de insetos do gênero *Lutzomyia* ou *Phlebotomus* (Ashford, 2000; Bhargava e Singh, 2012; Junior e cols, 2014).

Um dos primeiros relatos clínicos sobre a leishmaniose data do ano de 1756, quando Alexander Russell descreveu os primeiros sinais clínicos da doença e a chamou de febre de Aleppo (Hide e cols, 2007; Dawit e cols, 2013). Os primeiros estudos relacionados com o parasito datam do final do século XIX com a publicação feita em 1885 por Cunningham sobre a morfologia de estranhos corpos encontrados em órgãos linfoides (Writh, 1904) formas descritas hoje como amastigotas. Na virada do século XIX, muitos pesquisadores, de maneira independente, estavam envolvidos na pesquisa do parasito que causa a leishmaniose (WHO 2010).

No ano de 1900, William Leishman encontrou o parasito em material de necropsia de esfregaço do baço de um soldado que faleceu na Inglaterra de febre Dum-Dum contraída em Calcutá e considerou-o uma forma evolutiva de tripanossomatídeo, relatando sua descoberta em 1903 (Leishman, 1903; Pai-Dhungat e Parikh, 2015). No mesmo ano, Charles Donovan relatou um organismo semelhante encontrado em punção de baço de um menino indiano com Kala-azar em Madras. Com isso, Leishman dividiu a descoberta com Donovan e essas formas parasitárias ficaram conhecidas como corpúsculos Leishman-Donovan (Pai-Dhungat e Parikh, 2015). Ronald Ross sugeriu no mesmo ano a alteração do nome dado a esses organismos por Laveran e Mesnil, em 1903, de *Piroplasma donovani* para *Leishmania donovani* por pertencerem a um novo gênero (Ross, 1903; Pai-Dhungat e Parikh, 2015).

Rogers mostrou que as formas flageladas se desenvolviam em culturas, e Adler e Ber demonstraram que formas promastigotas de *Leishmania major* desenvolviam-se em flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* e que a picada do inseto transmitia a doença ao homem (Rogers, 1904 Adler e Ber 1941).

1.2. Epidemiologia

As leishmanioses são doenças negligenciadas que acometem principalmente regiões tropicais e possuem diferentes formas clínicas, sendo classificadas de modo geral como: leishmaniose visceral (LV), comumente referida como Calazar, e leishmaniose tegumentar (LT). Estas doenças causam problemas na saúde humana em escala global com uma estimativa de 350 milhões de indivíduos em risco de contrair leishmanioses e com aproximadamente 20 milhões de pessoas infectadas no mundo. São estimados 1,3 milhões de novos casos a cada ano, dos quais 1 milhão da forma tegumentar e 0,3 milhões da forma visceral da doença com um índice de mortalidade entre 20.000 e 40.000 mortes por ano. (Wijeyaratne e cols, 1994; Bhargava e Singh, 2012; Duthie e cols, 2012; WHO, 2016).

No Brasil, a LV e LT inicialmente tinham um caráter eminentemente rural, contudo, vieram se expandindo para as áreas urbanas de médio e grande porte (MDS, 2007;2014). Alguns fatores de risco para o aumento de casos podem ser provocados pelo ser humano como, por exemplo, migração, deflorestação, urbanização ou por mudanças na suscetibilidade do hospedeiro a infecção que podem ocorrer em casos de imunodepressão e subnutrição. Contudo, outros fatores estão associados a mudanças ambientais sem interferência do ser humano, estas alterações incluem mudanças na temperatura, precipitação e umidade que podem ter fortes efeitos sobre vetores e reservatórios, alterando sua distribuição, sobrevivência e o tamanho da população (Ashford, 2000; WHO 2016). Variações de origem natural podem ainda ter efeito sobre o ciclo de desenvolvimento de formas promastigota de *Leishmania* em flebotomíneos, as quais permitiriam a transmissão do parasito em áreas anteriormente não endêmicas para a doença (Ashford, 2000).

Segundo o Ministério da Saúde (MDS), o número de casos registrados de LT no Brasil, entre os anos 1985-2005, apontaram uma média anual de 25.568 casos. Os casos de LV notificados, entre os anos 1984-2002, somaram 48.455 casos. A maioria

dos casos de leishmaniose foram oriundos das regiões Norte e Nordeste do país (MDS, 2007;2014).

No Distrito Federal (DF) há evidências de transmissão autóctone de LT desde 1980, quando o primeiro caso em criança de 2 anos foi relatado. De acordo com os dados do Ministério da Saúde, o número de casos de LT notificados, entre os anos de 2004-2014, somaram 397 casos humanos (MDS, 2016a). Os casos relatados de LV, durante os anos de 2004-2014, apontaram 68 casos em humanos e cerca de 590 casos positivos em cães notificados no ano de 2013 (Herenio e cols, 2014; MDS, 2016b).

1.3. Manifestações Clínicas

1.3.1 Leishmaniose Tegumentar (LT)

A LT, também conhecida como leishmaniose dermatrópica/mucotrópica, caracteriza-se por afetar principalmente a estrutura da pele e, excepcionalmente, das mucosas das vias aéreas superiores, sendo reconhecidas clinicamente: a leishmaniose cutânea localizada (LC), da qual pode evoluir para leishmaniose cutânea disseminada (LCLD), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose mucosa (LM) (Altamirano-Enciso e cols 2003; Desjeux, 2004; Hashiguchi e cols, 2016).

1.3.1.1 Leishmaniose Cutâneo Localizada (LC)

A LC (**Figura 1A**), também conhecida como botão do oriente, manifesta-se normalmente nas regiões da face, braços, mãos e pernas por serem áreas expostas e acessíveis ao flebotomíneo. As leishmanias multiplicam-se nos macrófagos dermais próximos a área da picada feita pelo flebotomíneo, a lesão aparece inicialmente como uma persistência da picada do inseto e gradualmente aumentam o tamanho, tomando uma coloração avermelhada, mas sem dor ou calor notáveis na mesma (Ashford, 2000; Davidson, 2005; Neuber, 2008; Bhargava e Singh, 2010). A resolução da lesão envolve a imigração de leucócitos, os quais isolam a área infectada, levando à necrose dos tecidos parasitados e a formação de um granuloma de cicatrização na superfície da lesão, assemelhando a um botão (Ashford, 2000; Bhargava e Singh, 2012). O tamanho da lesão e sua extensão e padrão variam de acordo com a espécie do parasito, de fatores genéticos do hospedeiro e da extensão da resposta imune. A cura espontânea da LC pode variar de 6-12 meses com sequelas resultantes do processo

imunológico que variam desde cicatrizes até a desfiguração da área (Neuber, 2008; Pace, 2014).



Figura 1: Sinais clínicos da leishmaniose. **A** Lesão característica de LC. **B** Lesões características de LCD. **C** Lesão características der LM (evidenciada pela seta). **D** LV, sinais de hepatoesplenomegalia. Fonte: Adaptado de Bifeld e Clos, 2015.

Esse tipo de leishmaniose é causado comumente pelas espécies *Leishmania tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. peruviana* e *L. braziliensis*, mas podem ser causadas por outras espécies de *Leishmania* que infectem humanos, sendo esta encontrada em vários países do mundo (**Figura 2**) (Bhargava e Singh, 2012).

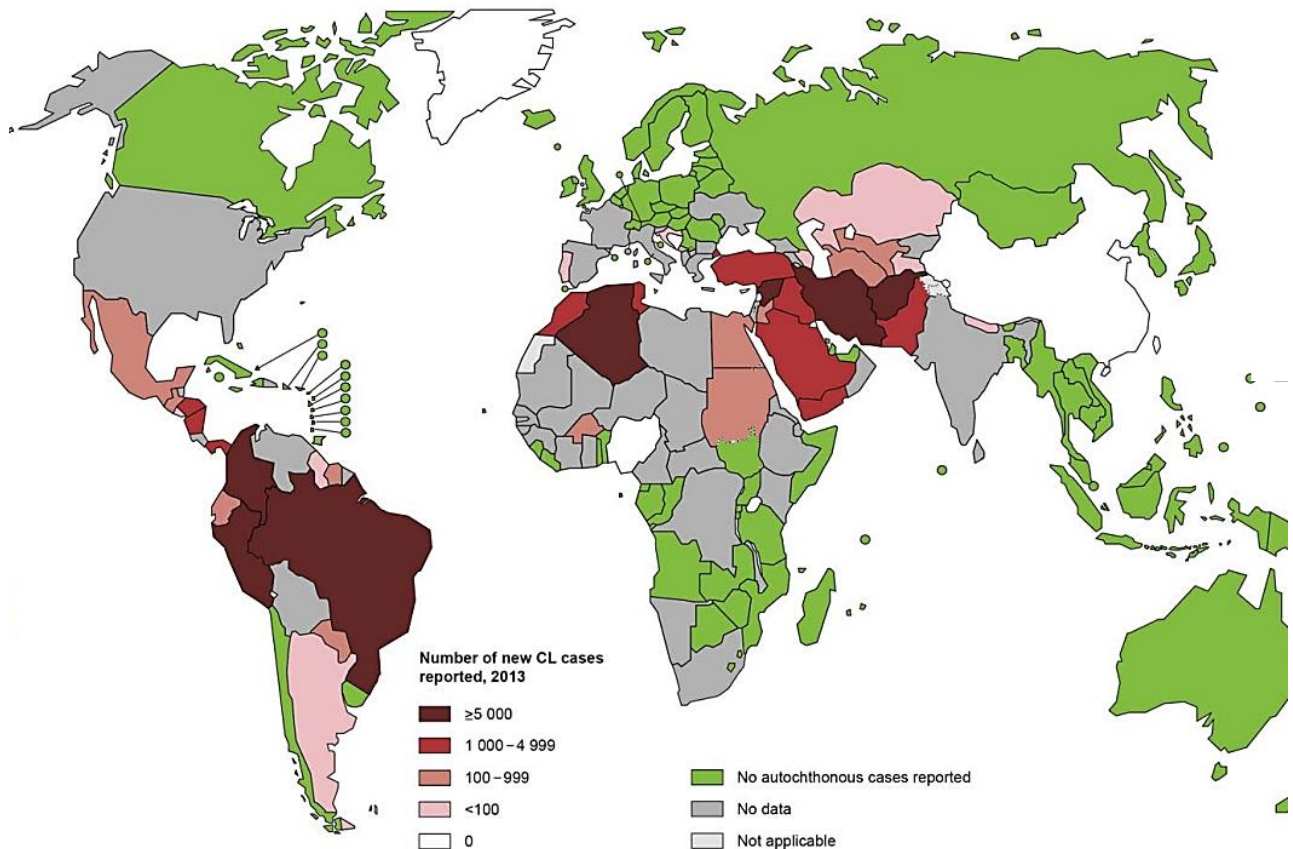


Figura 2: Áreas endêmicas da leishmaniose cutânea no mundo. A Organização Mundial da Saúde aponta países como zonas endêmicas de LC, com numerosos casos reportados. Adaptado de WHO, 2016

1.3.1.2 Leishmaniose Mucosa (LM)

A LM ocorre, na maioria dos casos, após a lesão inicial da forma LC, onde as formas parasitárias de *Leishmania* encontradas nas lesões cutâneas podem ser disseminadas por vias linfáticas ou sanguíneas ao longo de meses ou anos após a aparente resolução da lesão inicial para regiões muco-cutâneas do corpo (**Figura 1C**), comumente mucosas oronasais ou faríngeas (Ebrahm, 2000; Davidson, 2005; Fsadni e cols, 2007; Goto e Lindoso, 2010; Pace, 2014). A doença espalha-se, ao longo dos anos, de forma imprevisível para regiões da nasofaringe, palato, úvula, laringe e vias aéreas superiores e sua manifestação comprometem a função das áreas afetadas. Ao contrário da LC, as lesões decorridas da LM não se curam espontaneamente e geram mutilação dos tecidos ou sua destruição (Goto e Lindoso, 2010; Pace, 2014). Esta

enfermidade esta correlacionada às formas parasitárias pertencentes ao complexo *Leishmania braziliensis*.

1.3.1.3 Leishmaniose Cutâneo-Disseminada (LCLD) *Bordeline*

A leishmaniose cutâneo-disseminada *bordeline* foi clinicamente descrita por Silveira (2004) a qual caracterizou sua patogenicidade em dois extremos, um polo de hipersensibilidade e um polo de hiposensibilidade. A doença é considerada uma forma indeterminada entre LC e LCD, possuindo um processo de disseminação rápido, que em poucos meses, uma centena de pápulas (lesões acneiformes) e/ou lesões cutâneas ulceradas podem ocorrer, essas lesões são dependentes das espécies que as causam (Silveira, 2004; Hashiguchi e cols, 2016).

1.3.1.3 Leishmaniose Cutâneo Difusa (LCD)

A LCD é manifestada, geralmente, através da ação de parasitos que normalmente causam a LC, formas amastigotas que persistem no tecido por anos, que podem estar associados à anergia ou falta de resposta imunológica (Ashford, 2000). As lesões afetam somente a pele, iniciando-se como uma pápula não ulcerativa no local da inoculação (**Figura 1B**), entretanto, surgindo outras lesões semelhantes decorrentes da disseminação via sanguínea (Alrajhi 2003, WHO, 2016). É causada principalmente pela *L. aethiopica* na África e *L. amazonensis* na América do Sul e Central (Davidson, 2005). A leishmaniose dermal pós-calazar é uma forma de LCD que surge como seqüela da leishmaniose visceral e que pode ocorrer após anos em indivíduos não-tratados, parcialmente tratados e em indivíduos considerados adequadamente tratados. (Rathi e cols, 2005, WHO, 2016).

1.3.2. Leishmaniose Visceral (LV)

A LV é comumente conhecida como calazar, nome derivado de kala-azar, oriundo da Índia, é a forma mais severa das leishmanioses sendo uma doença conhecida pelo viscerotropismo do parasito ao fígado (**Figura 1D**), baço e medula óssea (Chappuis e cols, 2007; Clem, 2010). Na maioria dos casos, cerca de 90%, os indivíduos infectados são oriundos ou vivem em países endêmicos, como: Índia (especialmente Bihar), Bangladesh, Nepal, Brasil (norte e nordeste) e Sudão (WHO, 2016) (**Figura 3**). No Brasil, a VL está presente nas cinco regiões, em 21 estados.

Dados do Ministério da Saúde reportam aproximadamente 2 a 3 mil novos casos por ano (Madalosso e cols, 2012).

A LV é causada, principalmente, pelas espécies de *Leishmania donovani* na Índia e na África, pela *Leishmania infantum* (sinônimo de *L. chagasi*) no Mediterrâneo, na China, na Europa, África (Norte), no continente americano, principalmente, no Brasil (**Figura 3**) (Pereira e cols, 2013; Silva Junior e cols, 2014, Das e cols, 2015). Contudo, algumas espécies de *Leishmania* responsáveis por causar leishmaniose visceral podem, também, causar LC. A LV é uma enfermidade crônica caracterizada pelos sintomas de febre, anemia, anorexia, deficiência de elementos celulares do sangue e hepatoesplenomegalia (**Figura 2D**) que, se não tratada adequadamente após o surgimento dos primeiros sintomas, pode levar o indivíduo ao óbito (Dayakar e cols, 2011; Silva Junior e cols, 2014).

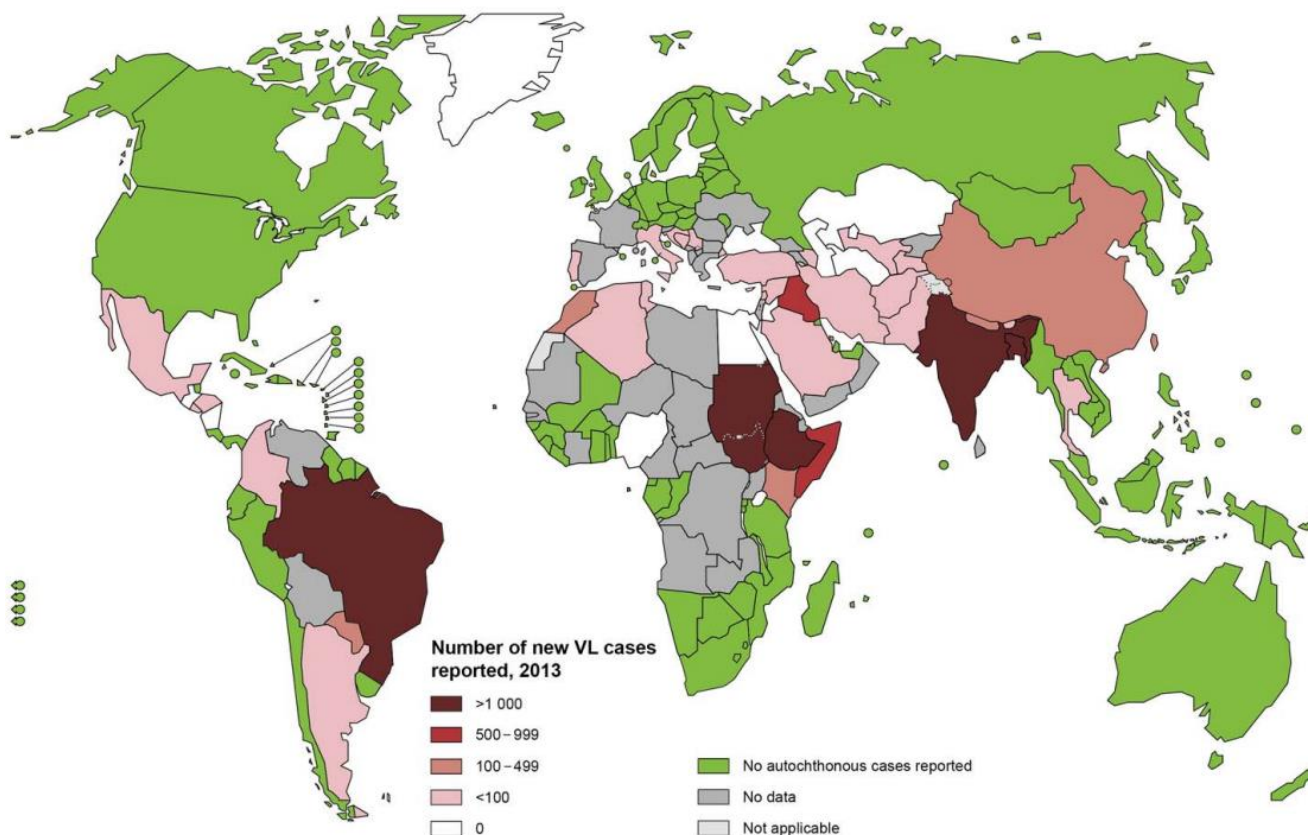


Figura 3: Áreas endêmicas da leishmaniose visceral no mundo. Dados da Organização Mundial de Saúde apontam o Brasil, Etiópia, Sudão, Índia e Bangladesh como países endêmicos de LV, com casos reportados sendo superiores ou iguais a 1000. Adaptado de WHO (2016).

Este tipo de doença está emergindo como uma importante infecção oportunista entre os indivíduos com infecção pelo HIV. Como esperado, o parasito não se

comporta de uma forma clássica em hospedeiros imunossuprimidos, e a doença pode ocorrer em locais incomuns como intestino, pulmões e sistema nervoso central (Ebrahm, 2000; WHO, 2016).

1.4. Agente Etiológico e Morfologia

Os parasitos do gênero de *Leishmania* são pertencentes ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, sub-filo Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, sessão Salivaria, gênero *Leishmania* e, ainda, são divididos em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (Lee, 2000; Lainson, 2010). Os parasitos que compõe o gênero *Leishmania* são similares morfologicamente apresentando formas amastigotas (flagelo não exteriorizado) e promastigota (flagelo exteriorizado) (Sehgal e cols, 2012). A forma promastigota é alongada com aparência fusiforme, mede de 12 a 20 μm e apresenta um flagelo livre e longo, emergindo do corpo do parasito na sua porção anterior. Esta forma desenvolve-se no interior do intestino do inseto vetor e é encontrada em diferentes formas de diferenciação (desenvolvimento) até atingir a forma infectante, conhecida como promastigota metacíclico (Waller e Mcconville, 2002; Ferreira, 2012; Dawit e cols, 2012). A outra forma é conhecida como amastigota e caracteriza-se pelo aspecto oval ou esférico à microscopia óptica, mede cerca de 4 a 6 μm e comporta-se como parasito intracelular obrigatório de fagócitos do hospedeiro vertebrado (Waller e Mcconville, 2002; Zappacosta e cols, 2010; Sehgal e cols, 2012).

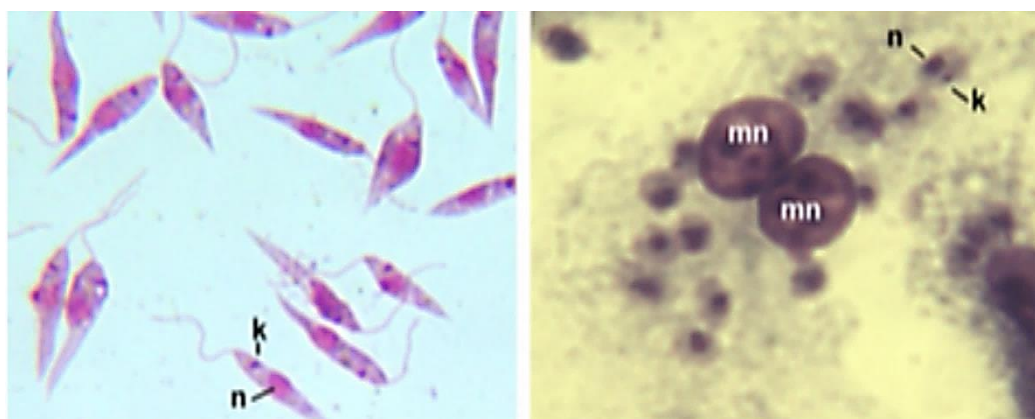


Figura 4: Agente etiológico da leishmaniose. A Formas promastigotas de *Leishmania sp* corados com Giemsa e observados com objetiva de 100X, destacando k = cinetoplasto. **B** Macrófagos oriundos de modelo murino infectados por *L. major*. k = cinetoplasto e n = núcleo do parasito. Adaptado de Bifeld e Cios (2015).

1.5. Classificação Taxonômica

Vários sistemas de classificações foram usados entre os anos de 1916 e 1987 para classificar o gênero *Leishmania*. Estes sistemas culminaram na divisão do gênero *Leishmania* em dois subgêneros: *Leishmania*, presente no Velho e Novo Mundo, e *Viannia*, restrito ao Novo Mundo (Lainson, 2010). A classificação das espécies de *Leishmania* nos subgêneros foi realizada de acordo com o desenvolvimento do parasito no sistema digestório do hospedeiro invertebrado durante seu ciclo de vida (**Figura 5**). O subgênero *Leishmania* (*Leishmania*) compreende os parasitos que tem seu ciclo de vida limitada ao intestino médio e intestino anterior (desenvolvimento suprapilariano) do inseto hospedeiro (Ross, 1903, Lainson, 2014). O subgênero *Viannia* é caracterizado pelos parasitos que tem seu desenvolvimento tanto na região do intestino médio e do intestino posterior (desenvolvimento peripilariano) (Lainson, 2010; WHO, 2010).

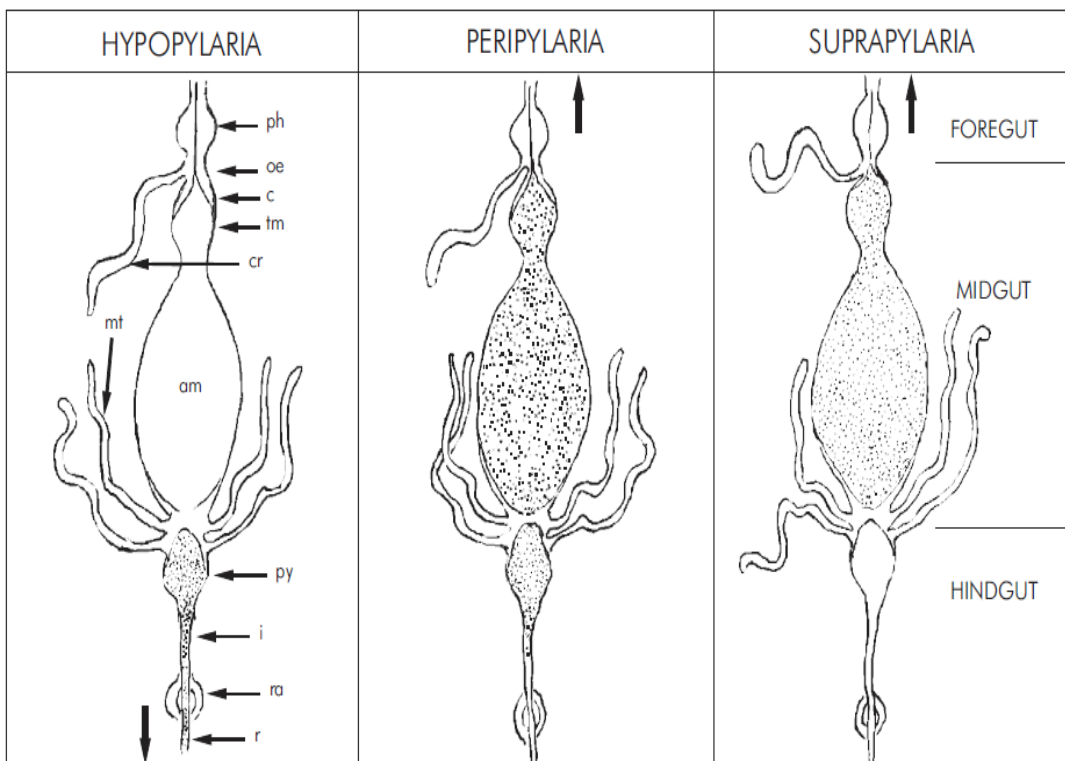


Figura 5: Classificação das espécies de *Leishmania* conforme seu padrão de desenvolvimento no hospedeiro invertebrado.

Seção **HIPOPIILARIANO**: O desenvolvimento destes parasitos, encontrados apenas em lagartos do Velho Mundo, é restrita ao intestino posterior do inseto vetor. Transmissão via ingestão de insetos infectados por lagartos.

Seção **PERIPILARIANO**: Desenvolvimento do intestino posterior é mantido, mas parasitos também migram para o intestino médio. A transmissão ocorre pela picada inseto vetor infectado. Encontrado em alguns lagartos do Velho Mundo. Também inclui espécies de parasitos *Leishmania* dentro do subgênero *Viannia*, que são restritos aos mamíferos do Novo Mundo.

Seção *SUPRAPILARIANO*: O desenvolvimento do parasito é restrito ao intestino médio e intestino anterior. A transmissão ocorre pela picada do inseto vetor infectado. Encontrado em mamíferos tanto do Velho Mundo e do Novo Mundo.

Fonte: Adaptado de Laison 2014.

O ponto de partida para a atual classificação ocorreu no início de 1970 com o desenvolvimento da eletroforese de isoenzimas, a qual décadas mais tarde tornou-se padrão ouro para identificação e ainda permanece como uma técnica de referência para caracterização de parasitos (Akhoundi e cols, 2016). Entretanto, a variação enzimática de um determinado *locus* pode ser interpretada como uma mutação que ocorreu durante a evolução do parasito. Subsequentemente, as classificações filogenéticas revelaram relações parentais entre as diferentes espécies de *Leishmania*, tal como foi confirmado pelo uso de vários marcadores moleculares (Lainson, 2010; Akhoundi e cols, 2016).

Em conclusão, os dados moleculares não condizem com o conceito de complexos de espécies estabelecidos por Laison e Shaw, sugerindo que a classificação seja revista. O contínuo sequenciamento de genomas de *Leishmanias* e a análise de SNP (polimorfismo de nucleotídeo único), bem como análises mais profundas por tipagem de mutilocus por micro-satélites poderão contribuir para uma melhor classificação do gênero *Leishmania* (Akhoundi e cols, 2016).

1.6. Ciclo de Vida e Transmissão

As leishmanias apresentam um ciclo de vida complexo, envolvendo passagem entre hospedeiro invertebrado e vertebrado (Bañuls e cols, 2007). O ciclo de vida inicia-se quando a fêmea do inseto-vetor parasitada realiza o repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero injetando formas infectantes do parasito (**Figura 6**) estas formas parasitárias não realizam divisão binária e são denominadas de promastigotas metacíclicas (Gossage e cols, 2003). As formas infectantes são fagocitadas rapidamente por vários tipos de células como, por exemplo, neutrófilos, macrófagos residentes nos tecidos, células dendríticas ou outras células mononucleadas. Dentro da célula hospedeira, os parasitos realizam uma mudança de forma de promastigota metacíclico para amastigota (Sehgal e cols, 2012). Esses amastigotas replicam-se dentro das células hospedeiras e, após sucessivas replicações, as células

hospedeiras são rompidas liberando as formas amastigotas, permitindo a reinfecção dos fagócitos. O ciclo se completa quando fagócitos infectados são ingeridos por outro flebotômíneo durante repasto o sanguíneo e, em seguida, as formas amastigotas convertem-se em promastigotas no intestino médio do hospedeiro invertebrado (Waller e Mcconville, 2002; Sehgal e cols, 2012).

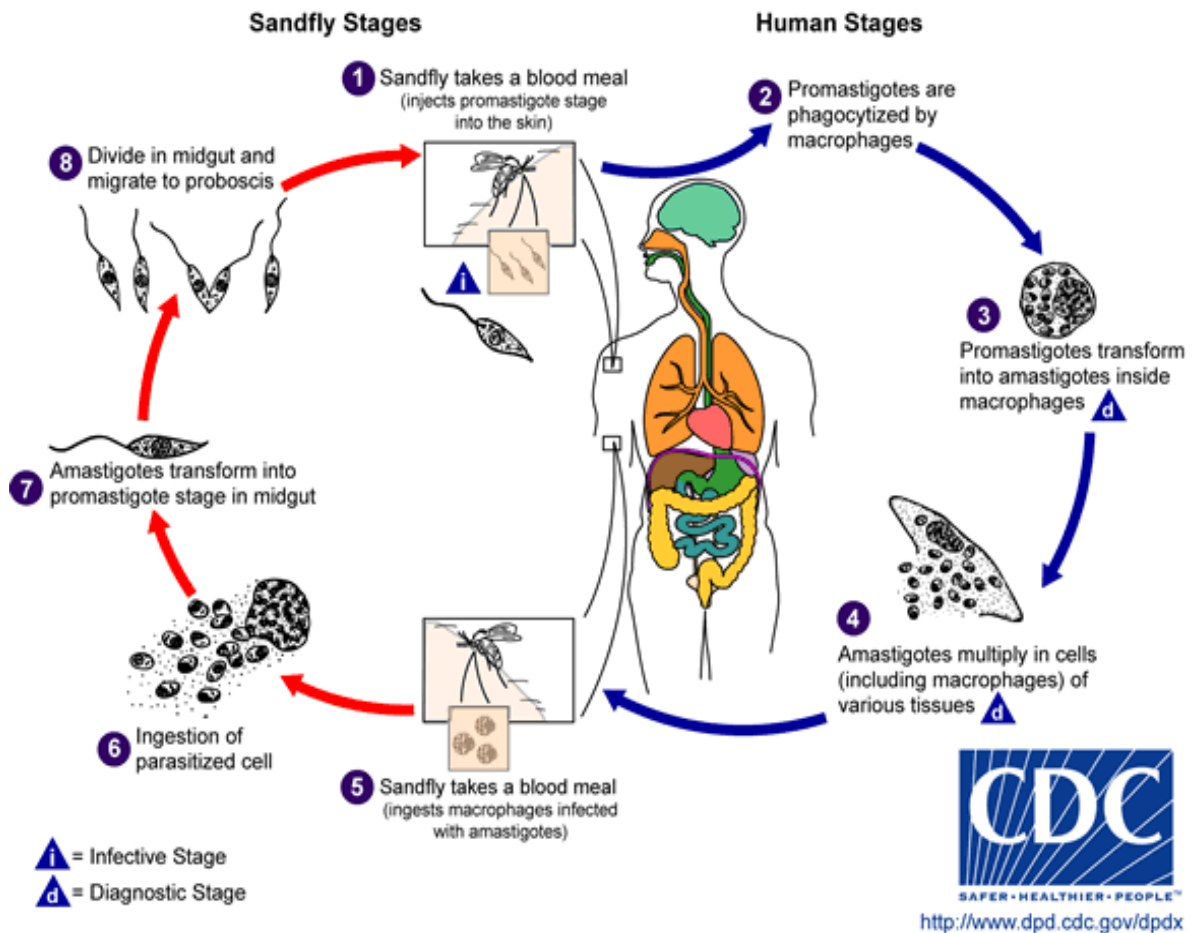


Figura 6: Ciclo de vida da *Leishmania* no homem. Fonte: Foto retirada de CDC, 2016.

1.7. Diagnóstico

A complexidade e a variedade de sintomas da leishmaniose juntamente com a presença de indivíduos assintomáticos requerem um diagnóstico baseado na relação estrita dos resultados de testes laboratoriais em conjunto com dados clínicos e epidemiológicos (Grimaldi e Tesh, 1993; Boarino e cols, 2007; Goto e Lindoso, 2010; WHO, 2016). No entanto, um diagnóstico definitivo da doença exige a demonstração do parasito por meio de métodos de diagnóstico laboratorial, este pode ser realizado

de diferentes maneiras, tais como: (I) demonstração do parasito nos tecidos de relevância por histopatologia, cultura *in vitro*, ou inoculação em animal experimental; (II) detecção de DNA do parasito em amostras de tecido; ou (III) imunodiagnóstico por detecção de antígeno do parasito em amostras de tecido, sangue, ou urina, por detecção de anticorpos específicos ou inespecíficos anti-*Leishmania*, ou por ensaio de imunidade mediada por células *Leishmania*-específicas (Pereira, 2013; Sakkas e cols, 2016). Entretanto, alguns métodos necessitam de condições especiais para serem realizados, os quais limitam a escolha do método em laboratórios de rotina (Sousa e cols, 2013; CDC, 2016).

1.7.1. Demonstração do parasito por histopatologia, cultura *in vitro* e inoculação em animal experimental

A maioria dos métodos baseados na busca microscópica do agente etiológico, pela cultura do parasito ou pela inoculação em modelo animal experimental apresentam, relativamente, baixa sensibilidade e não identificam a espécie infectante (Tsukayama e cols 2013, de Ruitter e cols, 2014). A pesquisa direta do parasito e a histopatologia são considerados métodos com alta especificidade, mas com baixa sensibilidade devido a distribuição não homogênea dos parasitos nos tecidos e ainda necessitam de profissionais experientes para coletar e preparar a amostra e avaliar a lâmina (Sousa e cols, 2013, Tsukayama e cols, 2013). Os métodos de inoculação em animais e cultura do parasito podem ser utilizados, porém, a inoculação em animais susceptíveis não tem valor prático no diagnóstico da doença devido ao seu tempo de positividade, que varia de 1-3 meses (MDS, 2006). Já a cultura do parasito estará sujeita a possibilidades de contaminação além das dificuldades de crescimento do parasito (MDS, 2006; Sarkari e cols, 2014).

1.7.2. Diagnóstico molecular

O diagnóstico molecular é realizado usando comumente o método de PCR, baseando-se na detecção do DNA do cinetoplasto (kDNA) do parasito presente em sangue periférico, fragmentos de lesões e de medula óssea, por meio do uso de *primers* específicos que apresentam elevadas sensibilidade e especificidade (Singh e Sundar, 2006). Porém, esse método necessita de ferramentas e reagentes específicos de alto custo para detectar determinado gene-alvo, para extração do DNA do material

biológico, que por muitas vezes, limitam sua aplicação em laboratórios de rotina (Almeida e cols, 2013).

1.7.3. Diagnóstico sorológico

Métodos de diagnóstico com base na resposta imune do hospedeiro são de extrema importância para auxiliar na elaboração do diagnóstico (Sousa e cols, 2013). A facilidade da padronização dos imunoenaios, da obtenção do material biológico (soro) do paciente e a disponibilidade de kits comerciais permitem uma fácil execução das técnicas a baixos custos. O ensaio de Imunoabsorbância enzimática (do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay* - ELISA) permite revelar imunocomplexos pela adição de um substrato cromógeno que reagirá com uma enzima covalentemente ligada a um anticorpo específico, formando um produto colorido cujo grau de coloração pode ser medida por espectrofotometria (Pereira, 2013).

O ELISA é usualmente aplicado para diagnosticar leishmaniose visceral (LV), apresentando maior sensibilidade para LV comparada a leishmaniose tegumentar (LT) (Goto e Lindoso, 2010; WHO, 2016). Os antígenos usados comumente para diagnóstico de leishmaniose no ELISA são os antígenos solúveis de *Leishmania* (do inglês *Soluble Leishmania Antigens* - SLA), contudo, mesmo que as técnicas de imunodiagnóstico que utilizam SLA apresentem alta sensibilidade, há problemas em sua especificidade, tais como: não conseguir distinguir a espécie de *Leishmania* e, comumente, está relacionado a reações cruzadas contra outros tripanosomatídeos ou resultados falso positivos em cães vacinados (Sousa e cols, 2013; de Ruitter e cols, 2014). Uma das alternativas para minimizar reações cruzadas e aumentar a sensibilidade e especificidade dos métodos de imunodiagnóstico é baseado no uso de proteínas recombinantes de *Leishmania* (Sousa e cols, 2013).

Proteínas recombinantes de *Leishmania* tornaram-se alvos disponíveis para o diagnóstico sorológico, aumentando sua sensibilidade, especificidade e com fácil padronização. Diversas proteínas recombinantes, entre elas k39, KMP11, Peroxidoxinas, LACK, histonas nucleossomais (H2A, H2B, H3 e H4) e proteínas de choque térmico (HSP60, 70 e 83) foram testadas para diagnóstico de leishmaniose e obtiveram resultados promissores para o desenvolvimento de kits de diagnóstico (Menezes-Sousa e cols, 2015). Contudo, a escolha do antígeno alvo é crucial para evitar reações cruzadas com outros organismos que apresentem proteínas ortólogas.

A análise *in silico* da proteína alvo deve ser realizada previamente objetivando verificar: I) proteínas ortólogas; II) possíveis regiões de epitopos de células B; III) possíveis modificações pós-traducionais. Depois de coletados e analisados esses dados, o antígeno alvo poderá ser testado *in vitro* (Carvalho e cols, 2011; Menezes-Sousa e cols 2015).

A análise de proteínas ortólogas podem indicar se uma proteína poderá apresentar reações cruzadas em testes sorológicos, devido a preservação de áreas com potencial antigênico que possam estimular o sistema imune ou quando feita para verificar se uma proteína do parasito possui ortologia com humanos ou cães, poderá haver a produção de clones autoreativos que poderão ser eliminados por mecanismos regulatórios do sistema imune (Carvalho e cols, 2011). A procura por possíveis alvos para diagnóstico deve levar em conta o quão imunogênico possa ser o antígeno a fim de estimular o sistema imune que pode ter um efeito aumentado/diminuído quando presente em sítios de glicosilações e fosforilações (Johnson L. N, 2009; Carvalho e cols, 2011; Chauhan e cols, 2013).

1.8. Interação parasito-hospedeiro

A coevolução dos hospedeiros e agentes patogênicos levou tanto ao desenvolvimento do sistema imune eucariótico para, entre outras funções, eliminar microrganismos invasores quanto à evolução de mecanismos específicos para os patógenos adentrarem as células eucarióticas contrariando as defesas do hospedeiro (Escoll e cols, 2015). Todos os hospedeiros mamíferos são alvos de infecção por vírus, bactérias, fungos e outras formas de patógenos. A relação parasito-hospedeiro é o fator mais importante para determinar se a infecção será bem-sucedida ou se será resolvida pelo hospedeiro. Vários mecanismos estão envolvidos nesta interação complexa e aspectos tanto do hospedeiro quanto do parasito são essenciais. Alguns parasitos desenvolveram mecanismos de evasão, tais como infecção e replicação intracelular, como no caso do gênero *Leishmania* e do parasito *Trypanosoma cruzi* (Morais e cols, 2015).

O primeiro passo para a interação entre o hospedeiro e estes parasitos protozoários intracelulares é a ligação do parasito à célula hospedeira. Estes protozoários têm uma variedade de moléculas secretadas ou de superfície que são usadas para modular a resposta da célula e, desta maneira, adentrar na célula

hospedeira. Várias dessas moléculas estão envolvidas no desencadeamento de vias específicas de sinalização essenciais para a entrada do parasito e para sua sobrevivência intracelular (Morais e cols, 2015).

Os constituintes presentes na membrana de superfície de promastigotas são foco de interesse para entender a modulação da resposta da célula hospedeira (Vergnes e cols, 2002; Spath e cols, 2003), e muitos destes - incluindo glicoproteínas, proteoglicanos e glicolípidios - foram caracterizados mostrando um papel de proteção para o parasito (Silverman, 2008). As principais moléculas de superfície/secretadas de *Leishmania* que podem participar nessa interação parasito-hospedeiro incluem: gp63, as proteases de superfície de promastigotas (PSP), proteofosfoglicanos (PPG) e proteínas ancoradas por glicofosfatidilinositol (GIPL). Estas moléculas estão presentes em grandes quantidades nas formas promastigotas e amastigotas (Vannier-Santos e cols, 2002; Silverman e cols, 2008).

Apesar do importante potencial de proteínas superficiais/secretadas em *Leishmania spp.* durante a infecção e interação com seus hospedeiros, apenas um pequeno número destas proteínas de *Leishmania sp.* foram examinadas e tiveram suas funções desvendadas na interação parasito-hospedeiro (Bates e cols, 1978; Shakarian e cols, 1998; Sereno e cols, 2005; Silverman e cols 2008;). Com isso, um grande número de proteínas secretadas de *Leishmania* poderiam ser candidatas a novos alvos de diagnóstico sorológico devido ao fato de estarem sendo liberadas durante a infecção e, assim, esses antígenos poderiam ser reconhecidas e internalizadas por células B. O antígeno se ligaria a IgM e IgD de membrana em células B *naives*, possibilitando que sejam ativadas e, logo, tornariam-se específicas para dado antígeno que, por consequente, apresentariam o antígeno internalizado aos linfócitos T CD4 auxiliares que, por sua vez, estimulariam ou auxiliariam as células B a produzir anticorpos específicos contra este antígeno (Silverman e cols, 2008; Abbas e cols, 2011). Dentre as proteínas secretadas de *Leishmania*, foram identificadas peptidases que estariam sendo secretadas por vias não clássicas, em forma de microvesículas exossomais, estas proteínas poderiam ser usadas para desenvolver novos marcadores de diagnóstico para leishmaniose (Peacock e cols, 2007; Silverman e cols, 2008).

1.9. Proteases secretadas de *Leishmania*

As enzimas degradativas que catalisam a clivagem de ligações peptídicas em proteínas ou em oligopeptídeos são conhecidas como proteases. Essas proteínas proteolíticas desempenham funções fisiológicas, sendo assim, essenciais para o controle homeostático de procarionotos e eucarionotos. Essas enzimas são referidas por alguns termos pela comunidade científica como protease, peptidase e peptídeo hidrolítico (Santos e cols, 2006; Rani e cols, 2012; Jisha e cols 2013). As proteases produzidas por tripanosomatídeos desempenham funções importantes durante a infecção no hospedeiro (especialmente os parasitos *T. cruzi* e *Leishmania spp.*) que incluem a modulação do sistema imune do hospedeiro, invasão, destruição de tecidos do hospedeiro, a migração do parasito, o crescimento e o desenvolvimento e / ou a aquisição de nutrientes essenciais para a sobrevivência e proliferação necessários para continuar a infecção. Além disso, as proteases de tripanosomatídeos possuem características estruturais incomuns, concedendo-as uma característica de imunodominância que as faz se tornar alvos para desenvolvimento de vacinas e marcadores de diagnóstico (Santos e cols, 2006; Vermelho e cols, 2010).

Dentre as proteínas secretadas encontram-se algumas incluídas no Clã das metalo-peptidases (ME) que não tiveram seu papel específico elucidado após serem secretadas do parasito e que não foram testadas como marcadores de diagnóstico (Peacock e cols, 2007; Silverman e cols, 2008; Silverman e cols, 2010).

1.9.1. Metalo-peptidases

O termo metalo-peptidase engloba exopeptidases (peptidases que atuam clivando ligações pépticas próximo a região amino terminal – NH₂) e endopeptidases (peptidases que atuam clivando ligações peptídicas próximas a região carboxi terminal - COOH) envolvidas na maioria dos processos biológicos, tais como a morfogênese, a atividade dos peptídeos de metabolismo biológico, os hormônios, desenvolvimento e regulação do ciclo celular e, também, do metabolismo de antibióticos (Santos e cols, 2006; Rani e cols, 2012) . As metalo-peptidases necessitam de cofatores, geralmente íons metálicos, como Zn²⁺, para calizar a hidrolise de uma ligação peptídica. Essas proteínas foram classificadas usando os recursos do banco de dados MEROPS (Rawlings e cols, 2015), que as agrupou em 14 clãs diferentes, ou seja, as separou de acordo com as características das enzimas que incluem origem, nomenclatura,

classificação, substratos, sequências aminoacídicas, estruturas e, também, com a quantidade de íons catalíticos necessários para sua função. Os clãs das metalopeptidases formados foram: MA, MC, MD, ME, MJ, MK, MM, MO, MP (peptidases que necessitam de apenas de um íon metálico) e MF, MG, MH, MQ (peptidases que necessitam de dois íons metálico) e subdivididos em famílias (Vermelho e cols, 2010; Sbardella e cols, 2012).

Estudos entre comparações genômicas e análises de secretomas relataram metal-peptidases zinco dependentes, como a leishmanolisina ou GP63, presente na superfície dos parasitos *Leishmania sp.* e *Trypanosoma sp.* Nos parasitos do gênero *Leishmania*, essa metalopeptidase estaria envolvida em mecanismos da interação parasito-hospedeiro, a qual incluem: função protetora contra ação do sistema complemento, interação com células do hospedeiro, entrada e sobrevivência intramacrófagos (Ivens e cols, 2005; Motta e cols, 2013). Em organismos multicelulares, como o parasito *Schistosoma mansoni*, foram encontradas proteínas que dividem homologia com a GP63 de *Leishmania sp.*, essas proteínas estariam presentes na superfície do parasito em estágio larval e contribuiriam na proteção do parasito contra o sistema complemento do hospedeiro (Devorák e cols, 2008).

1.9.2. Clã Metalopeptidase (ME), Família M16

O Clã ME é formado por duas famílias, M16 e M44, na qual os ligantes de zinco foram previstos para ocorrer no *motif* His-Xaa-XaaGlu-His (HXXEH), sendo o *motif* inverso encontrado praticamente no Clã MA (Rawlings e Barrett, 2012). A família M16 compreende peptidases zinco-dependentes distribuídas em subfamílias M16A, M16B e M16C que incluem: Insulinase, enzima de degradação da insulina; metalopeptidase de processamento mitocondrial de subunidade alfa e beta (MPP); Pitrisina, precursor da protease III; Nardilisina; Ubiquinol-citocromo C redutase; e Coenzima PQQ da síntese de proteínas F (Mitchell e cols, 2015). Das três subfamílias, a M16B é estruturalmente conhecida e contém a MPP. Assim como outras metalopeptidases, as metalopeptidases da família M16 são inibidas por agentes quelantes (Rawlings e cols, 2015).

1.9.3. Metalo-peptidase de processamento mitocondrial

A maioria das proteínas mitocondriais tem seus respectivos genes localizados no núcleo e são sintetizadas no citosol como precursores de proteínas. A exportação dessas proteínas ocorre por meio de peptídeos-sinal localizados na região N-terminal, que serão removidos posteriormente na mitocôndria. Essa remoção se dá por ação de clivagem proteolítica dirigida por metalo-peptidases de processamento mitocondrial (do inglês metallopeptidase, mitochondrial processing – MPP) (Shimokata e cols, 1998; Desy e cols, 2012). Dados da estrutura tridimensional de MPP do Clã ME, família M16, subfamília M16B (**Figura 7**), podem ser usadas como base para estudar outras MPPs da respectiva família por apresentarem grande semelhanças estruturais (Rawlings e cols, 2015). Essa MPP é traduzida por dois genes formando um heterodímero constituído por uma subunidade alfa e uma subunidade beta. A subunidade alfa está envolvida no reconhecimento do substrato enquanto a subunidade beta é responsável pela atividade catalítica (Geiger e cols, 2010; Rawlings e cols, 2015).

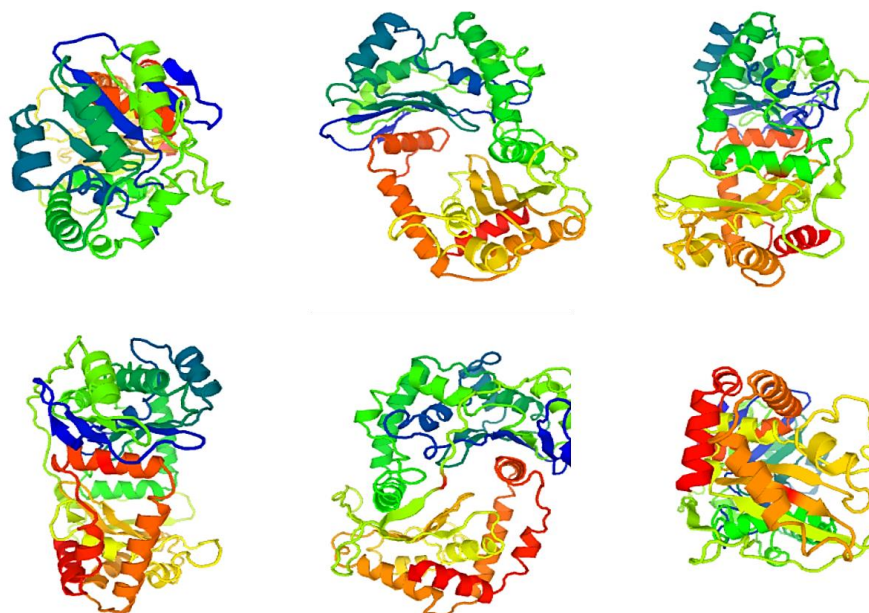


Figura 7: Estrutura da MPP da subunidade alfa do Clã ME, família M16, subfamília M16B de *Homo sapiens*. Fonte: Imagem retirada do servidor UniProt, código de acesso Q10713.

Em análise de secretoma de *L. donovani* foram encontrados MPPs secretadas e, entre elas, algumas pertencentes ao Clã ME, família M16 que estariam sendo secretadas por vias não-clássicas, sugerindo que a *Leishmania* use mecanismos de

secreção baseada em exossomos para exportar e liberar moléculas que poderiam estar atuando na interação parasito-hospedeiro, podendo desempenhar funções imuno-moduladoras (Silverman e cols, 2008; Silverman e cols, 2010; Lambertz e cols, 2012; Silverman e Reiner, 2012).

2. JUSTIFICATIVA

A leishmaniose visceral é uma patologia antroponozoonótica que afeta milhões de indivíduos pelo mundo e que possui tratamento efetivo quando diagnosticada no início da doença. Os testes para diagnóstico mais sensíveis e específicos, como exames histopatológicos e diagnóstico molecular por PCR, são realizados em laboratórios especializados que possuem equipamentos de alto custo para aplicar tais técnicas que, conseqüente, elevam o valor do exame. Dado a esses fatos, laboratórios de rotina, geralmente, não possuem os materiais e equipamentos para aplicar essas técnicas e, então, optam pelo uso de testes sorológicos para diagnóstico da leishmaniose visceral. Entretanto, a especificidade e sensibilidade do teste sorológico depende do quão exclusivo possa ser o antígeno usado como marcador de diagnóstico, afim de não ocorrer reações cruzadas com antígenos pertencentes a diferentes parasitos e, ainda, poderiam ser utilizados para diferenciar animais vacinados de animais infectados.

Com isso, o presente trabalho tem como justificativa a avaliação da proteína metalo-peptidase de processamento mitocondrial do Clã ME, família M16, subfamília M16B de *Leishmania infantum*, como possível marcador para diagnóstico sorológico de leishmaniose visceral canina e humana, sendo esta uma proteína secretada que poderia estar sendo reconhecida por células B, que gerariam anticorpos específicos para este antígeno.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a metalo-peptídase da subunidade alfa de processamento mitocondrial do Clã ME, família M16, subfamília M16B, do gene LDBPK_130760.1 de *Leishmania donovani*, presente em *L. infantum*, encontrada no banco de dados UniProt e de identificação XM_001464069.1 no banco de dados NCBI, como marcador para diagnóstico sorológico de leishmaniose visceral canina e humana.

Etapas

Analisar *in silico* o gene LdBPK_130760.1 de *Leishmania donovani*;

Clonar e expressar a proteína heteróloga em sistema procarioto e eucarioto;

Analisar comparativamente a reatividade de proteínas recombinantes produzidas pelos sistemas de expressão procarioto e eucarioto, em termos de reconhecimento antígeno-anticorpo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Desenvolvimento

O estudo utilizou a sequência correspondente à proteína metalopeptidase, clã ME, família M16 – 1587 pb – 528 aminoácidos, de 57.656 kDa, código de acesso XP_001464106.1 do gene LDBPK_130760 no banco Protein do *National Center for Biotechnological Information* (NCBI) encontrada na cepa JPCM5 de *Leishmania infantum*, citada nos estudos de Peacock e cols (2007). Esta proteína foi relatada no trabalho de Peacock e cols (2007) e Silverman e cols (2008) como uma proteína secretada de *Leishmania* do complexo *donovani*, a qual poderia ser alvo para diagnóstico de leishmaniose visceral.

4.1.1. Amostra biológica (soro)

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal – CEUA de número 106668/2014, disponível em **Anexo A**. Os soros usados no presente trabalho foram de cães infectados e não infectados, obtidos da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. As amostras foram armazenadas em -20°C. Posteriormente, estas foram analisadas quanto a reatividade de anticorpos específicos contra a proteína heteróloga em estudo.

4.2. Predição da estrutura primária, sítios de fosforilação, glicosilação e de epitopos lineares de células B

As análises iniciais da proteína foram realizadas por meio das ferramentas online PredictionProtein para análise de estruturas físico-químicas (<https://www.predictprotein.org/>), preditor NetPhos v2.0 Server para análise de sítios de fosforilação (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>), YinoYang v 1.21 e GlycoEP para análises de modificações pós-traducionais pela inserção de glicosídeos (<http://www.imtech.res.in/raghava/glycoep/submit.html>) e pelo preditor BepiPred v1.0 Server para análise de possíveis epitopos lineares para células B (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>). Os programas citados acima usaram parâmetros e pontos de corte padrões, exceto o programa BepiPred, este teve seu *cutoff* ajustado de 0.35 para 1.3 a fim de se aumentar os critérios de seleção de epitopos.

4.2. Desenho dos *Primers*

Usando as ferramentas PrimerBlast e NebCutter (Vincze e cols, 2003), os iniciadores foram desenhados de acordo com a sequência de DNA em estudo (**Figura 8B**) e foram levados em conta os sítios de restrição dos vetores pGEM (promega) pLEXY (Jena Bioscience) e pET-28a (Novagen), que seriam utilizados nos experimentos futuros, respectivamente. Foram adicionados uma trinca de timinas antecedendo as áreas de corte enzimático em cada *primer*, com a finalidade de facilitar a ação da respectiva enzima em seu sítio. Analisando os mapas dos vetores dos **Anexos A B e C** e comparando com os dados do NebCutter (**Apêndice C**), verificamos que seria necessário desenhar 2 pares de *primers* (**Tabela 1**) para que o gene pudesse ser inserido em cada plasmídeo posterior ao pGEM-T easy.

4.3. Reação de polimerização em cadeia (PCR)

A técnica de reação de polimerização em cadeia (do inglês *Polymerase Chain Reaction*) foi empregada utilizando *primers* específicos para o gene XM_001464069.1 que codifica a proteína XP_001464106.1 de *Leishmania infantum*. As sequências dos primers utilizados nas amplificações estão descritos na **Tabela 1**. Os primers LC 01/LC02 e LC 10/LC 11 geram bandas aproximadas de 1500 pb. Todos *primers* foram encomendados da IDT® (*Integrated DNA Technologies*).

Tabela 1: *Primers* utilizados nos ensaios moleculares por PCR.

PRIMERS	SEQUÊNCIA	ENZIMA DE RESTRIÇÃO
LC 01 e LC 02	5`TTT CCA TGG GAT TCC GCC GTG TAG TCG CTC C 3` 5`TTT GGT ACC CAG ACC CAT CTG GCG CAT GG 3`	Kpn I e Nco I
LC 10 e LC 11	5`TTT AAG CTT ATG TTC CGC CGT GTA GTC GCT 3` 5`TTT CTC GAG TAA CTA CAG ACC CAT CTG GCG CAT 3`	Hind III e Xho I

Os pares de *primer* foram desenhados inserindo os pontos de clivagem das enzimas acima para cortar o plasmídeo e linearizar sua inserção no vetor.

As amplificações do gene XM_001464069.1 de *L. infantum* com os primers LC 01/02, LC 10/11 foram feitas nas seguintes concentrações: 20ng de DNA genômico de *Leishmania infantum* obtido da Universidade Federal de Minas Gerais, tampão 10x da Ludwig Biotec (100 mM Tris-HCl pH 8.5, 500 mM KCl); 2 mM MgCl₂; 0,2 µM de cada primer; 0,2 mM dNTPs (LGC Biotecnologia) e 2 U Taq DNA polimerase (Ludwig Biotec) incluídos no volume final de 25 µL. As reações foram realizadas no termociclador LifeTouch Bioer, como segue os programas abaixo:

LC 01/02 e LC 10/11

	94°C – 5 Min
30x	94°C – 30s
	65°C – 30s
	72°C – 2 Min e 30s
	72°C – 5 Min
	10°C – 8

4.4. Análise Eletroforética

Os produtos de PCR, de extração de DNA plasmidial e de purificação após digestão enzimática foram visualizados em fotodocumentador após eletrofore em gel de agarose a 0,8% com Brometo de Etídeo (EtBr) a 0,3mg/mL, utilizando tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X (Tris acetato 90mM pH 8,0 e EDTA 25 mM).

4.5. Clonagem dos Produtos de PCR e dos Produtos de Digestão Plasmidial

Após análise eletroforética, os *amplicons* da reação de PCR com sinais de banda mais intensos foram selecionados para clonagem, esses foram ligados pela ação da enzima T4 ligase à 10 °C por 12 horas em aparelho termociclador (LifeTouch Bioer) a um plasmídeo, inicialmente em pGEM T-Easy (Promega) e após análise do sequenciamento foi feita digestão do DNA plasmidial anterior e realizada purificação e novas ligações aos plasmídeos pLEXY-2 (Jena Bioscience) e pET-28a (NovaGen). As ligações seguiram o protocolo do fabricante, e em seguida, transformadas por choque térmico em bactéria *Escherichia coli* competente.

4.5.1. Preparo de Células Competentes

As células utilizadas para a transformação, *Escherichia coli* das linhagens DH-5α (*Thermo Fisher Scientific*) e Rosetta 2 (DE3) pLysS™, foram submetidas de acordo

com o método de Inoue (Sambrook e Russel, 2006) para adquirirem competência. Um pré-inóculo de 25 mL de meio Luria Bertani (LB) (Invitrogen) contendo as bactérias foi deixado por um período de 12 horas a 37°C, sob agitação de 200 rpm. Em seguida, volumes de 10 mL, 4 mL e 1mL do pré-inóculo foram adicionados a três frascos erlenmeyer com capacidade para um litro, contendo 150 mL de meio LB. Os frascos erlenmeyer com 150mL de LB acrescidos do pre-inóculo foram colocados sob agitação a 200 rpm a temperatura de 18 °C ao final da tarde. No dia seguinte, pela manhã, de cada frasco erlenmeyer foi retirado uma alíquota para realizar medição de densidade ótica (DO), repetindo a medição de DO a cada 40 minutos até atingir o valor 0.6 em comprimento de onda de 550nm. O erlenmeyer foi levado ao gelo por 10 minutos, após a incubação no gelo o meio líquido contendo as bactérias foi centrifugado a 2.500 x g por 10 minutos, a 4 °C. Em seguida, o pellet obtido foi ressuspenso em 48 mL de tampão TB (10 mM de HEPES, 15 mM de CaCl₂, 250 mM de KCl , corrigindo o pH para 6,7 adiciona-se 55 mM de MnCl₂). Realizada nova centrifugação de acordo com os parâmetros acima, o pellet foi ressuspenso com 12 mL de tampão TB com DMSO na concentração de 7% do volume final. A solução foi incubada no gelo por 10 minutos e distribuídas em alíquotas para congelamento em - 80°C.

4.5.2. Transformação bacteriana

A transformação bacteriana seguiu o método de choque térmico (Protocols and Applications Guide, Third Edition, 1996), seguindo o protocolo: Para 50 µL de *Escherichia coli* DH - 5α, acrescentou-se 3uL do produto da ligação no vetor (pGEM T-Easy, pLEXY ou pET-28a), e incubou-se a mistura 30 min no gelo. Em seguida, os transformantes foram levados a banho maria a 42°C por 90 segundos e incubados imediatamente em gelo por 5 minutos. Adicionou-se 950uL de meio SOC (0,5% de extrato de levedura, 2% de triptona, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄ e 20 mM de glicose), e as células transformadas foram incubadas a 37°C por 1 h e 30 min sob agitação de 180 rpm. Após este período, as células foram centrifugadas a 2500 x g por 1 minuto a temperatura ambiente. O pellet foi ressuspenso em 100ul do sobrenadante e plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina em 50 µg/mL, X-gal e IPTG (pGEM), ampicilina em 50 µg/mL (pLEXY-2), canamicina e

cloranfenicol em 35 µg/mL (pET28α), a fim de selecionar as células resistentes ao antibiótico.

4.5.3. Seleção dos recombinantes

A seleção dos recombinantes ocorreu pela observação de colônias azuis e brancas resistentes a ampicilina, para colônias transformantes com o plasmídeo pGEM. Somente as colônias brancas foram escolhidas para serem semeadas em 5mL de meio LB líquido contendo 50 µg/mL de ampicilina a 37°C por 12 horas sob agitação de 200 rpm. A seleção de colônias por diferenciação de colônias azuis e brancas é apenas para o vetor pGEM, para pLEXY e pET a seleção é por PCR de colônias.

4.5.4. Extração de DNA plasmidial

Após o período de cultivo de 12 horas, as bactérias foram submetidas à extração de DNA plasmidial através do kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel) para extrações em pequenas escalas e NucleoBond® Xtra Midi (Macherey-Nagel) para extrações em médias e grandes escalas, todas extrações foram feitas conforme as instruções do fabricante. A análise dos insertos foi feita após eluição do DNA por meio de PCR com os primers respectivos usados anteriormente em cada reação e visualizados em gel de agarose a 0,8%.

4.6. Quantificação

Os produtos de extração de DNA plasmidial, os produtos purificados após digestão enzimática e os produtos de purificação de proteína foram submetidas a quantificação em aparelho Espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare), usando 2µL de amostra.

4.7. Sequenciamento

Os produtos de extração plasmidial de cada clone que apresentaram bandejamento próximo de 1587 pares de bases em gel de agarose a 0,8% foram submetidos à quantificação de DNA e, em seguida, foram alíquotados em 250ng/µL com volume final de 5µL e enviados para sequenciamento em aparelho *Sequence Scanner* da *Applied Biosystems* (Laboratório de Biotecnologia - Universidade Católica de Brasília), utilizando os *primers* Sp6 (*reverse*) e T7 (*forward*).

4.8. Análise das sequências

As análises dos dados do sequenciamento foram realizadas pelo programa Chromas v2.6 (Technelysium) e pelo programa SnapGene (GSL Biotech LLC). Após visualização do cromatograma e correção das leituras que continham sobreposição de picos, leituras repetidas de uma mesma base e trocas de bases, as sequências foram alinhadas com os dados do servidor *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) através do algoritmo *BLASTn usando* os parâmetros: em *Database* colocada opção *Others (nr etc.) – nucleotide collection (nr/nt)*, *Organism* colocado para *Leishmania donovani species complex (taxid:38574)*, *Program Selection* colocado otimização para *Somewhat similar sequences (blastn)*.

Os alinhamentos múltiplos foram realizados usando a ferramenta *online* Clustal Omega v1.21 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) e SnapGene (GSL Biotech LLC).

4.9. Expressão das proteínas em modelo procariótico

Os clones ligados ao vetor pGEM T-easy (Promega) que não sofreram deleções ou mutações de nucleotídeos foram selecionados para digestão enzimática com as enzimas descritas na **Tabela 1**. Uma pequena quantidade de produto da digestão (5 µL) foi submetida a análise eletroforética conforme o item 4 para confirmar a liberação dos fragmentos do inserto. O produto da digestão foi purificado em gel de agarose a 0.8% corado a 0.3 ng/mL de Brometo de Etídio e extraído usando o kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) nas condições descritas pelo fabricante. O purificado foi quantificado conforme o item 4.6 e ligado ao vetor pET-28α (NovaGen) conforme o item 4.5. O preparo das células competentes de bactéria *E.coli* da cepa Rosetta usadas para transformação foi realizado conforme o item 4.5.1 e a transformação como descrito no item 4.5.2, com a remoção do antibiótico ampicilina e adição de 35 ug/mL de cloranfenicol e 35 ug/mL de canamicina para o plaqueamento em meio LB solido.

4.9.1. Expressão da proteína XP_001464106.1 em *Escherichia coli* cepa Rosetta

As colônias crescidas em LB solido foram selecionadas e semeadas em 10 mL de meio LB liquido contendo 35 ug/mL de canamicina e 35 ug/mL de cloranfenicol. As

bactérias foram divididas em grupos: Grupo A (Grupo controle), bactérias transformadas com vetor vazio induzidas com 0.5mM de IPTG e; Grupo B (Grupo teste), bactérias transformadas e induzidas com 0.5mM de IPTG. Todos os grupos foram colocados em agitador automático por um período de 12 horas a 37°C a 200rpm. Foram coletadas alíquotas de todos os grupos no volume de 1 mL em microtubos de 1.5mL nos tempos de zero horas, 1 hora, 2 horas, 4 horas e 6 horas após indução. Todas as alíquotas foram centrifugadas a 2500 x g por 15 minutos a temperatura ambiente. O meio de cultura foi separado do *pellet* e ambos foram armazenados a - 20°C.

4.9.2. Análise eletroforética em gel de policrilamida da expressão da proteína XM_001464069.1 em sistema procaríoto.

A expressão da proteína foi avaliada por SDS-eletroforese em gel de policrilamida unidimensional (SDS-PAGE). Para este teste, utilizamos um volume de 250 mL de cultura e, também, usamos as amostras alíquotadas mencionadas no item 4.9.1. O pellet de cada uma das alíquotas foi ressuscitado em 10 mL de tampão de lise I (12,5 mM Na₂HPO₄; 12,5 mM NaH₂PO₄; 0,5M NaCl e 40 mM de Imadazol) e homogeneizado por inversão e, após isso, cada tubo do homogeneizado foi levado a aparelho sonicador (BioLab) aplicando amplitude de 90 % (com valor mínimo de 40%) por 30 segundos e repetindo essa ação no total de três vezes, dando intervalos de 30s entre cada repetição. Em seguida, todos os tubos foram centrifugados a 4000 x g por 30 minutos a 4°C para separar os extratos solúveis de insolúveis. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos de fundo cônico de 50 mL e ao pellet foram adicionados 10 mL de tampão de lise II (12,5 mM Na₂HPO₄; 12,5 mM NaH₂PO₄; 0,5 M NaCl; 6M Uréia e 10 mM de Imadazol) e realizado segundo tratamento afim de recuperar as proteínas insolúveis. Seguiu-se as mesmas condições aplicadas durante o primeiro tratamento. Ambas as amostras foram analisadas em gel de policrilamida a 10% com espessura de 1 mm corado com Coomassie Brilliant Blue R (Sigma), aplicando 90V na fase concentradora e 180V na fase separadora.

Foram alíquotados 1 mL de ambos os tratamentos 1 mL e mantidos em estoque a -80°C. Foram transferidos 25 µL de amostra de cada tratamento para novos microtubos de 1,5 mL e adicionados 5 µL de tampão de amostra 5x concentrado, as amostras foram então fervidas por 5 minutos e, posteriormente, aplicadas em gel de

policrilamida a 10% com espessura de 1 mm, aplicando 90 V na fase concentradora e 180 V na fase separadora e corado com *Coomassie Brilliant Blue* (Sigma). O material restante foi designado para purificação de proteína.

4.10. Expressão de proteínas em modelo eucariótico

Leishmania tarentolae (*L. tarentolae*)

Formas promastigotas de *L. tarentolae* (Jenabioscience) foram cultivadas em meio BHI suplementado com 0.25% de Hemina e 1/1000 de penicilina e estreptomicina (PenStrep). Geneticina (G-418) foi adicionada na concentração de 50 ug/mL após eletroporação. O cultivo dos parasitos foi feito a temperatura de 26°C em ambiente protegido de iluminação.

4.10.1. Eletroporação em *L. tarentolae*

O protocolo seguido para a metodologia foi o recomendado pelo fabricante (Jenabioscience). Inicialmente, um pré-inóculo foi realizado em volume de 10 mL de meio BHI suplementado com soro fetal bovino, Hemina e PenStrep e incubado em frasco de cultura de células por 72h à 26°C. A cultura foi diluída em 1:10 em 10mL do mesmo meio de cultura e foi mantida em 26°C por 24 - 48 horas. No dia seguinte, checkou-se a densidade óptica (D.O.) e, quando atingida a D.O. de 1.4, em análise de comprimento de onda de 600nm no aparelho Ultrospec® 1000 (Amersham pharma biotech), as células foram centrifugadas por 3 minutos em 2000 x g a temperatura ambiente. Após centrifugação foi estimada uma concentração 6×10^8 células/mL, com base nas recomendações do fabricante. O pellet foi ressuscitado com 2,5 mL de meio de cultura remanescente e incubado em gelo por 10 minutos. Paralelamente, foram introduzidos 20µg de plasmídeo pLEXY (Anexo C) com o inserto em 50µL de água destilada em cubeta de eletroporação, sendo incubada no gelo. Foram adicionados 350 uL de células pré-refrigeradas nos tubos contendo DNA, esse foi levado ao gelo. As cubetas foram eletroporadas a 450 V, 450. Após o pulso, as cubetas voltaram ao gelo por 10 minutos. As células eletroporadas foram transferidas para frasco de cultura de células arejado contendo 10mL de meio BHI suplementado com hemina, penicilina e estreptomicina e, após período de 24h, foi adicionado

geneticina, após isso, os frascos foram colocados para incubar por 48 horas a 26°C em local protegido da luz.

4.10.2. Coleta de material para análise de expressão do gene LDBPK_130760 em *L. tarentolae*

Para verificar se as *L. tarentolae* estariam expressando a proteína codificada pelo gene em análise, dividimos as culturas destes parasitos em grupos diferentes: Grupo A (grupo controle), *L. tarentolae* selvagens; e Grupo B (grupo teste), transfectadas com vetor ligado ao inserto que codifica a proteína XP_001464106.1. Todos os grupos foram colocados em estufa por um período de 48 horas a 26°C. Foram coletadas alíquotas de todos os grupos no volume de 10 mL em tubos falcon de 15 mL durante cada nova semeadura por um período total de 60 dias, duas semeaduras por semana. Todas as alíquotas foram centrifugadas a 2500 x *g* por 15 minutos a temperatura 4°C. O sobrenadante foi removido e o pellet de cada alíquota foi armazenado a - 20°C.

4.10.3. Extração de DNA de *L. tarentolae*

A extração de DNA dos cinetoplastidas foram realizadas de acordo com o método de fervura modificado (Bashiruddin, 1988). As alíquotas contendo o pellet das culturas, item 3.9.2, foram ressuspensas em 1 mL de PBS (NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2mM0; pH 7.4) e centrifugadas a 1500 x *g* por 10 min à 4°C. O pellet foi lavado por três vezes com PBS e centrifugado nas mesmas condições. A cada lavagem, os sobrenadantes eram descartados. Após a última lavagem, o pellet foi ressuspendido em 100µL de PBS 1x e levado ao banho maria para fervura. O material foi fervido a 100°C por 5 min. Após fervura, os tubos foram centrifugados nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi removido para novo microtubo de 1,5 mL e o pellet descartado. Foram usados 5 µL do sobrenadante para reações de PCR.

4.10.4. Análise eletroforética em gel de policrilamida da expressão da proteína XP_001464106.1 em sistema eucarioto

A expressão da proteína foi avaliada por SDS-PAGE. Para este teste, aumentamos o volume da cultura para 250 mL, mantidos a temperatura de 26°C

durante o crescimento. Ao atingir DO de 1.4, conforme item 4.9.1, a densidade celular da cultura estaria aproximadamente em 6×10^7 células/mL. As culturas foram transferidas para tubos de fundo cônico de 50 mL e centrifugados a $2000 \times g$ por 20 min a 4°C. Após essa etapa, os procedimentos aplicados foram os mesmos do item 3.9.2.

4.11. Purificação da proteína recombinante dos sistemas eucarioto e procaríoto por cromatografia de afinidade.

A purificação foi realizada segundo o protocolo do fabricante (Qiagen), com as seguintes alterações: Adicionamos 1 mL da matriz Ni-NTA (Qiagen) a uma minicoluna de 3 mL, permitindo a passagem do sobrenadante por ação gravitacional e retendo as matrizes. Em seguida, em colunas diferentes, foram adicionados 2 mL de solução de lise I (12,5 mM Na_2HPO_4 ; 12,5 mM NaH_2PO_4 ; 0,5 M NaCl e 10 mM de Imadazol) e de lise II (12,5 mM Na_2HPO_4 ; 12,5 mM NaH_2PO_4 ; 0,5 M NaCl; 6M de Uréia e 10 mM de Imadazol) de acordo com as amostras que receberam os tratamentos do item 3.9.1. Depois de equilibrar a matriz, adicionou-se as amostras sônicas do sistema procaríoto e do sistema eucarioto. Todo material que passou pela matriz foi coletado. Posteriormente, foram adicionados 4 mL de solução de lavagem I (12,5 mM Na_2HPO_4 ; 12,5 mM NaH_2PO_4 ; 0,5 M NaCl e 40 mM de Imadazol) e solução de lavagem II (12,5 mM Na_2HPO_4 ; 12,5 mM NaH_2PO_4 ; 0,5 M NaCl; 6M de Uréia e 40 mM de Imadazol), coletando sempre o material de fluxo de passagem. Por fim, a proteína foi recuperada com 1 mL de solução de eluição I (12,5 mM Na_2HPO_4 ; 12,5 mM NaH_2PO_4 ; 0,5 M NaCl e 250 mM de Imadazol) e solução de eluição II (12,5 mM Na_2HPO_4 ; 12,5 mM NaH_2PO_4 ; 0,5 M NaCl; 6M uréia e 250 mM de Imadazol) e coletou-se o material em microtubos de 1,5 mL, armazenando a -20°C.

4.11.1. Redução da concentração de uréia por diálise

As proteínas purificadas de bactéria que foram submetidas ao tratamento II tiveram de passar por membrana de diálise afim de reduzir a concentração de uréia. A membrana de celulose tubular de diálise (Sigma), diâmetro de 16mm, comprimento de 12 cm e retenção de proteínas maiores que 12 kDa foi usada para esse processo. A membrana foi preparada de acordo com as normas do fabricante, uma das

extremidades foi vedada e a amostra foi adicionada dentro da membrana e, consecutivamente, a outra extremidade foi lacrada. A membrana com a amostra foi colocada em recipiente contendo 2000 mL de PBS e deixada sob agitação constante por 12h a 4°C. Posteriormente, o material dialisado foi recuperado e transferido para novo microtubo de 1,5 mL e armazenado a -20°C.

4.12. Western Blotting

As amostras obtidas do item 4.10 foram separadas eletroforéticamente e transferidas para membrana de nitrocelulose de 0.45 µm (Bio-Rad), seguindo a metodologia de Towbin e cols (1979). A transferência foi realizada usando o sistema Miniprotean Cell® (Bio-Rad) e o marcador de peso molecular pré-marcado utilizado foi Novex®sharp Pre-Stained (Invitrogen).

Após a transferência, a membrana foi bloqueada com PBS Tween 0.01%, com 2.5% de leite desnatado (Molico - Nestle) e colocado para incubar por 12 h a 4 °C. Posteriormente, a membrana foi lavada três vezes com PBS Tween 0.01% por 5 minutos e colocada em agitação. Foram adicionados anticorpo primário anti-His Tag (LifeTechnologies) na proporção de 1:500 para os ensaios de detecção de calda de histidina e soro na proporção de 1:200 em PBS nos ensaios de teste da proteína heteróloga contra anticorpos do hospedeiro, ambas membranas foram colocadas para incubar a temperatura ambiente sob agitação constante. Após o tratamento com o anticorpo primário/soro do paciente, foram realizadas três lavagens em PBS Tween 0.01% por 5 min. As membranas receberam tratamentos com anticorpo secundário anti IgG murino (Life Technologies) conjugado com fosfatase alcalina nos ensaios para detecção da proteína heteróloga e anticorpo secundário anti-IgG canino conjugado com HRP para ensaios de reatividade da proteína, ambos tratamentos com anticorpos secundários foram feitos nas diluições de 1:1000, seguida de incubação a temperatura ambiente por 1 hora sob agitação constante. Anticorpo anti -His Tag conjugado com fosfatase alcalina (Sigma) foi diluído em PBS leite 2% (1:10.000). Depois, foram realizadas cinco lavagens com PBS Tween 0.01% e, por último, a membrana foi revelada em BCIP/NBT (Sigma), na concentração indicada pelo fabricante. A revelação foi interrompida com água destilada.

4.13. Ensaio de Imunoabsorbância Enzimática (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay* - ELISA)

Microplacas de alta afinidade de ligação com fundo plano de 96 cavidades (Greiner bioone) foram sensibilizadas separadamente com 100µL/ poço, contendo 5 µg/mL das proteínas purificadas dos itens 4.9.2 e 4.11, em tampão de revestimento (carbonato-bicarbonato) pH 9,6 (0.03 M NaHCO₃; 0.015 M Na₂CO₃) e incubadas por 12h a 4°C. Em seguida, os excessos de antígenos foram removidos por meio de três lavagens com PBS pH 7,4 contendo 0,05% de *Tween*-20 (PBS-T). Os sítios de adesão livres foram bloqueados com 100µL/poço de PBS pH 7,4 acrescidos de 10% de SFB (soro fetal bovino) da Gibco, seguido por incubação de 1 h a temperatura ambiente. Ao final, repetiu-se o procedimento de lavagem. Os soros dos cães foram diluídos a 1:50, 1:100 e 1:1000 em PBS/SFB 10% e adicionados 100 µL/poço, em duplicata. Após incubação de 1 h a temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas com PBS-T. O conjugado, composto por anticorpos anti-IgG canino marcado com HRP (Novex – Life Technologies) foi diluído 1: 2000 em PBS/SFB 10% e, em seguida, 100 µL/poço foram adicionados às placas seguida por incubação de 1 h a temperatura ambiente, sendo envolvidas por papel alumínio durante essa etapa. Após incubação, o excesso do conjugado foi retirado através de cinco lavagens com PBS-T. A revelação da reação foi feita pela adição de 50 µL/poço de H₂O₂ (Dinâmica) em tampão fosfato-citrato pH 5,0 adicionado de cromógeno OPD (*o-Phenylenediamine dihydrochloride* - Sigma). A reação foi feita em local sob proteção de luz, passados 10 minutos, essa foi interrompida pelo acréscimo de 50 µL/poço de H₂SO₄ (ácido sulfúrico). A leitura foi feita em espectrofotômetro (*BioTeK- Synergy HT*) a 490 nm.

Para estabelecer o ponto de corte da reação entre soro reagentes e não reagentes foram usados cinco animais controles negativos, cujos soros foram coletados na Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG. Assim, o “*cut-off*” foi calculado utilizando-se a média aritmética dos valores de absorbância dos negativos, acrescentando-se ao valor, três desvios padrão da média.

4.14. Análise estatística

Os resultados obtidos pelo ELISA, item 4.13, foram analisados pelo programa Graphic Pad Prism 5 (GraphPad Software). O teste de análises de colunas - teste t foi

aplicado. A aplicação do teste t foi realizada de forma pareada para verificar o valor de significância (*p value*) dos resultados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O diagnóstico laboratorial para leishmaniose visceral canina e humana pode ser realizado por diversas técnicas que variam da evidência direta do parasito em tecidos do hospedeiro, procura pelo DNA do parasito em amostras do hospedeiro e, mais comumente, testes que envolvem reações antígeno-anticorpo (Pereira, 2013; Sakkas e cols, 2016). Contudo, a busca por metodologias que possam ser aplicadas em laboratórios de rotina acaba a melhor alternativa sendo o diagnóstico sorológico (Pereira e cols, 2013). Em busca de aprimorar os ensaios sorológicos diversas pesquisas foram e continuam sendo realizadas com o intuito de encontrar um marcador para diagnóstico sorológico de LV que tenha uma alta sensibilidade, especificidade, com uma fácil aplicação e baixos custos (Gao e cols; Menezes-Sousa e cols, 2015). Nesse contexto, muitos antígenos de superfície e secretados de *Leishmania* passaram a serem alvejados como possíveis marcadores de diagnóstico, uma vez que poderiam estar interagindo com células B e, assim, produzindo anticorpos (Vergnes e cols, 2002; Peacock e cols, 2007; Silverman e cols, 2008).

Nos estudos realizados por Peacock e cols (2007) e por Silverman e cols (2007 e 2008) foram apontadas uma grande quantidade de proteínas que estariam sendo secretadas por *Leishmania* e que, ainda, não foram estudadas. Baseado nos trabalhos relatados, esse estudo teve como objetivo analisar a Metallo-peptidase da subunidade de processamento mitocondrial do Clã ME, família M16, subfamília M16B para diagnóstico sorológico de LV.

Contudo, previamente aos testes *in vitro* se faz necessário uma sondagem do possível candidato por meio de análises *in silico* que visaram analisar se a MPP possuía proteínas ortólogas nos organismos a serem diagnosticados e determinar se o antígeno candidato apresentava determinantes imunogênicos (Carvalho e cols, 2011; Wen e cols, 2016).

5.1. Análise *in silico*

A análise *in silico* teve como alvo a proteína XP_001464106.1 de *L. infantum*, uma proteína composta por 528 aminoácidos (**Figura 8A**) de 57.656 kDa, codificada pela sequência de DNA XM_001464069.1 do gene LDBPK_130760, depositada no banco de dados *Nucleotide* do NCBI, composta por 1587 nucleotídeos (**Figura 8B**). O estudo inicialmente abordou sequências similares entre organismos eucariotos

unicelulares da família *Trypanosomatidae* (**Figura 9**) e organismos eucariotos multicelulares afim de encontrar similaridades entre elas. As análises em busca de proteínas com identidades >60% em organismos eucariotos multicelulares visam descartar proteínas que possuam ortólogas nesses organismos, esse fato interferiria em testes de imunogenicidade da proteína alvo.

A

```
MFRRVVAPAPVAATAACAGQARSIEYKFGQTPLTQPFGGTSRLPPGPSSKPPVAAGKVEITKLHNG
ARVITHNLGGPSVSVGAYILAGPAYDPPSAPGTGAMMHLALTTSNYNNSLFLQDRNIRSVGAAQSHF
EKHKHYIGIRIDARADKWKAAPTSLSQRRLQNLQKQAEQFSLNLVQDNIFTCIAAPRFHEPDER
FRDTIDNQVEELRWQCPAEYAKQMLETVAFYREPLGNPRFVPAMSNGLIISVLEQYSRYVPSRVV
VSGVNVDAALIAEYENTPFPHSASAPHHARAQPCAVNWKDEAAQYTGGERHDHEDRPKVMGKTP
DMDPEIIAVGWLAYGKDRKMTKDHAAASMVVVALMDIGFSGRMRCGAPDEMHEHTGLRAFYSY
QTAGLIGFTAKEPQAAVRMVTDAVRMVQANKASVADSMLSVAKKMARTQFMVQNVDTIRDYCD
YLGTCLAVDSDSLATSVEEVDAINSVNAVVDVKRYETMFSNKTSLYGHGEMLGFPSMRQMGL
```

B

```
ATGTTCCGCGTGTAGTCGCTCCGGCGCGGTGGCGGCCACCGCAGCCTGCGCTGGGCAGGCTCGCAGCAT
CTACGAGTACAAGTTCGGTCAGACCCCCCTCACCCAACCGTTTGGCGGAACCTCTCGCCTGCCGCTGGCCC
CTCGTCGAAGCCTGCCCGGTTGCTGCCGGGAAGGTGGAGATCACGAAGCTGCACAACGGCGCGCGCGTCA
TCACGCACAACCTCGGTGGACCGTGGTGTCCGTTGGTGCCTACATACTCGCGGGCCCCGCCTACGACCCAC
CGAGCGCGGGGACGCGGAGCCATGATGCACCTTCCCTGACGACGAGCACTACAATAATTCGCTGTTC
AGCTTGACCGCAACATTCGAGTGTCCGGCGCGCCAGTCGCACTTCGAGAAGCACAAAGCACTACATCGGCA
TTCGCATCGACGCCCGCGGACAAGTGGAAAGAGCGCCGCGCGGACGTCATCGCTTTCACAGCGCGCGCAG
CTGCAGAACCAGAAGCAAGCGGAGCAGCAGTTCTCGTTGAATCTGGTGCAGGACAACATCTTACCTGCATC
CGCGCGCCCCGCTTCCACGAGCCGATGTGGAGCGCTTCCGTGACACCATTGACAACCAGGTGCGAGGAGCT
CCGCTGGCAATGCCAGCCGAGTACGCGAAGCAGATGCTGGAGACGGTCCGCTTCTACCGTGAGCCGCTCG
GCAACCCCTCGCTTTCGTCGGCGGATGAGCAACGGCATCATTTGAGCAGCGTACTGCTGGAGCAGTACAGCC
GCTACGTCGTGCGTCCGCGCTCGTCTCCGGCGTCAACGTCGATCACGCCGCGCTGATTCCGAGTACG
AGAACACCCGTTCCACACTCCGCTCGCACCGCACCCAGCCCGCGCGCAGCCGTCGCGGTTGAACTGG
AAGGATGAGCGCGCTCAGTACACCGGGGGGAGCGCCACGACCAGGACCGCCCAAGTAAATGGGAA
CGAAGCCGGACATGGACCCGGAGTCCATCAGCCGTCGGCTGGCTCGCTACGGCAAAGACAGGAAGATG
ACGAAGGACCAGCCGCTCGATGTCGTTGGGGCGCTGATGGACATCGGGTTACGCGCCGCATGCGCTG
CGGCGCCCCGGATGAAATGCACGAGCACACGGGCCCTGCGCGCCTTCTACAGCCCCACCAAACGGCTGGCC
TGATCGGCTTACGGCGAAGGCAGAGCCGACGGCAGCGGTCGCGATGGTACGGACGCTGTGAGGATGGTG
CAAGCAAACAAGGCCTGTGTCGGGACTCGATGCTGTCGGTGGCGAAAAAATGGCGAGAACGCAAGTTCAT
GGTGCGAATGTCGACACCATTCGCGACTACTGCGACTACCTGGCACCTGCCTCGCCGTGGATAGCGACTC
GACCCTAGCCACATCGGTGCAAGAGGTTGTGCGACGCCATCAACTCTGTCAACGCGGTGGATGTGAAGCGGGT
GTACGAGACGATGTTCTCGAACAAGACCAGCCTGTACGGCCACGGCGAGATGCTCGGCTCCCTTCCATGCG
CCAGATGGGTCTGTAG
```

Figura 8: Sequências proteica e nucleotídica da MPP **A** Sequência da proteína XP_001464106.1. **B** Sequência de referência XM_001464069.1 do gene LDBPK_130760. Sequências disponíveis no NCBI, nos bancos “Protein” e “Nucleotide”.

Posteriormente, foi verificado se a proteína teria qualidades como possível alvo para diagnóstico, então, foram analisadas suas propriedades físico-químicas, seus sítios de fosforilação, suas modificações pós-traducionais por adição de glicosídeos e, também, analisada a presença de possíveis epítopos lineares para células B. De acordo com Gupta (2007) e Wen e cols (2016), a verificação das qualidades citadas são importantes fatores que influenciam na imunogenicidade do antígeno como, por

exemplo, o tamanho da molécula que deve estar acima de 14 kDa pois, geralmente, moléculas de grande massa molecular (albumina do ovo e tireoglobulina) são melhores imunógenos por serem mais propensas a possuírem áreas imunogênicas formadas por um ou mais aminoácidos com ou sem modificações pós-traducionais (fosforilação e glicosilação) que estimulem o sistema imune (Johnson, 2009; Chauhan e cols, 2013). Nos trabalhos de Wen e cols (2016) e de Carvalho e cols (2011), as proteínas selecionadas para cada estudo tiveram, em sua maioria, uma massa maior que 14 kDa, e suas análises *in silico* envolveram as qualidades citadas anteriormente.

As análises baseadas nas informações da ferramenta *Blastn* (**Apêndice D**) revelaram sequências com identidade >85% entre alguns membros do gênero *Leishmania* (*L. donovani*, *L. infantum*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. paramensis* e *L. braziliensis*). De acordo com Peacock e cols (2007), os genes expressos por espécies-específicas de parasitos mostraram níveis de expressão diferentes, os quais podem estar correlacionados à patogênese de sua respectiva doença. Ao verificar nos bancos de dados do *NCBI*, usando as ferramentas *Blastp* e *Blastn*, por proteínas ortólogas a proteína XP_001464106.1 em *Canis familiaris*, *Homo sapiens* e *Mus musculus* foram encontradas proteínas com identidade menor que 18%, sugerindo que elas talvez não possuíssem a mesma função e que a MPP em estudo poderia ser usada nestes organismos (Duthie e cols, 2016).

Os resultados do alinhamento múltiplo com mais de 60% de identidade sugerem que a MPP esteja presente nas outras espécies de *Leishmania* e que em ensaios *in vitro* poderia ocorrer reatividade com esses organismos, porém, em *Trypanosoma cruzi* a proteína apresenta cerca de 50% de identidade a qual sugere que possa ser uma proteína diferente (Carvalho e cols, 2011). Contudo, trabalhos na literatura utilizaram proteínas que apresentaram altas identidades, porém, essas proteínas tiveram regiões que se diferenciavam uma das outras e estas foram usadas para formar uma sequência quimera usando resíduos de uma mesma proteína ou mesclando com resíduos de outras proteínas que pode ser usada para diagnóstico (Soto e cols; 1998; Rosati e cols, 2001; Bottino e cols, 2013; Duthie e cols, 2016).

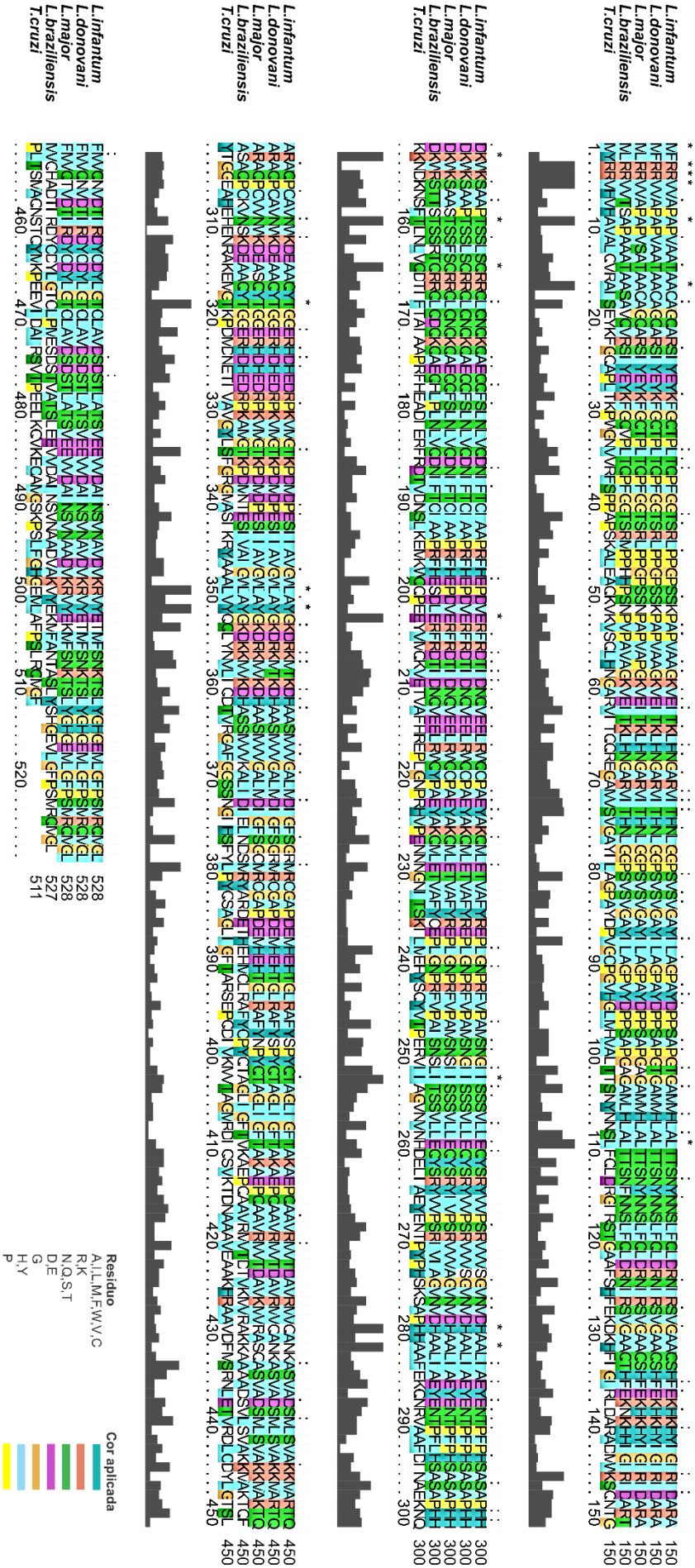


Figura 9: Alinhamento múltiplo entre trypanosomatídeos. *L. infantum* (ref XP_001464106.1), *L. donovani* (ref XP_003859287.1), *L. major* (ref XP_001681831.1), *L. braziliensis* (ref XP_001563211.2) e *T. cruzi* (ref XP_814023.1). Todas referências disponíveis no banco de dados do NCBI

5.1.1. Análise da estrutura físico-química da proteína

Com auxílio da ferramenta PredictProtein (Rost e Sander, 1993a, 1993b; 1994a, 1994b; Rost e cols, 2004), foi feita uma caracterização preliminar de propriedades físico-químicas da proteína como: porcentagem relativa de estruturas secundárias, famílias de proteínas relacionadas, acessibilidade relativa ao solvente, composição de estrutura primária e secundária (**Figura 10**). De acordo com a **Figura 10A**, a proteína referida é majoritariamente composta por *loops* e hélices, com uma porcentagem menor de folhas beta. Ao conciliar esses dados com a literatura foi visto que a composição da estrutura secundária pode dotar a proteína com propriedades antigênicas, como visto em Wen e cols (2016). Alanina e valina, que são aminoácidos hidrofóbicos, aparecem em maior concentração (**Figura 10B**). Na **Figura 10C** há uma estimativa de 47,35% de resíduos de aminoácidos expondo mais de 16% de sua superfície, o servidor correlacionou às áreas em branco com o símbolo *** como áreas intermediárias entre a interface exposta e não exposta ao solvente, além disso, foram encontradas 5 possíveis áreas de interação proteína-proteína (**Figura 10D**). Esses dados sugerem que há uma grande chance de que possíveis aminoácidos com características imunogênicas possam interagir com células do sistema imune do hospedeiro, como citado por Gupta (2007).

Os dados do programa sugerem que a localização subcelular da proteína esteja em mitocôndrias em organismos animais, cloroplastos em plantas e no citoplasma em bactérias (**Apêndice E**), esses dados estão de acordo com os disponíveis sobre a proteína XP_001464106.1 pelo GenBank.

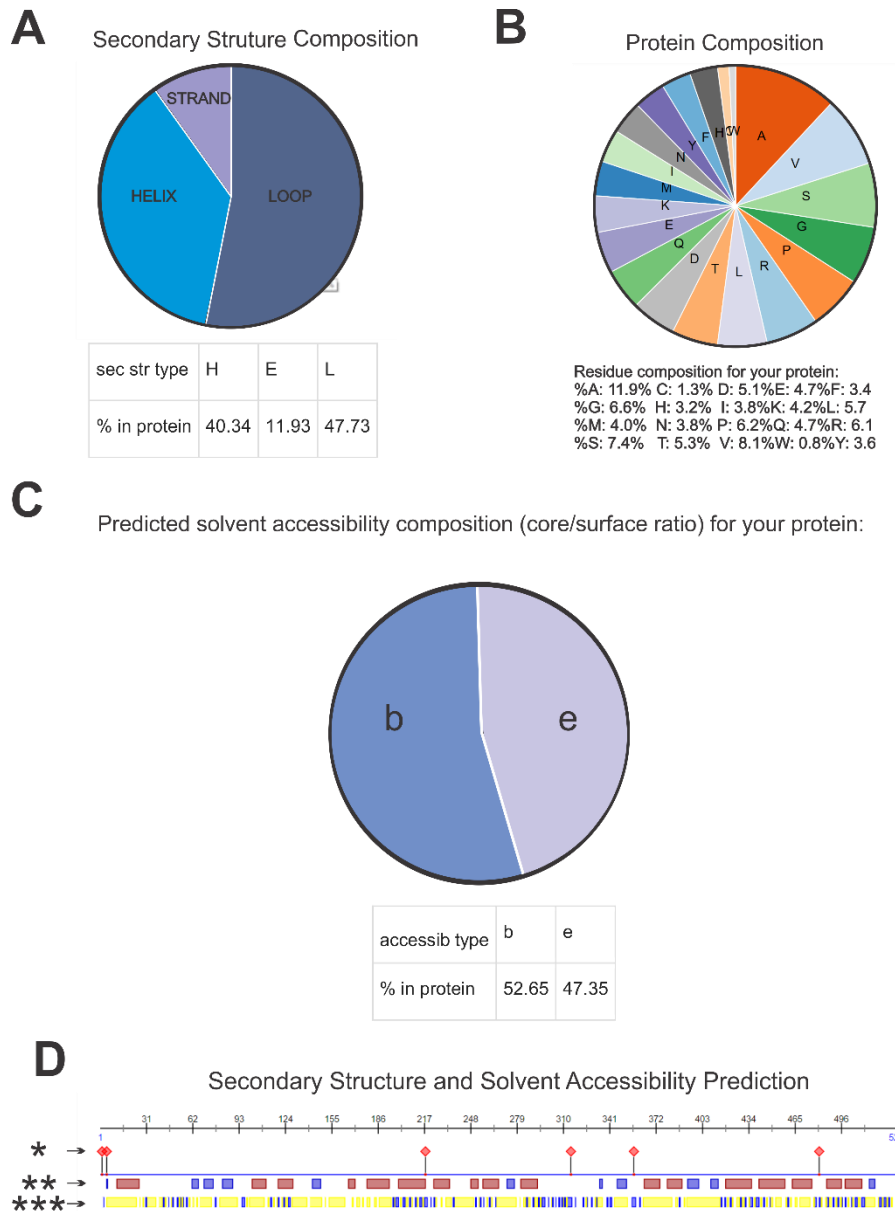


Figura 10: Análise da estrutura físico-química da proteína pela ferramenta PredictProtein. A Composição da estrutura secundária onde H: α -hélice, E: folhas- β e L: laços. **B** Composição da estrutura primária. **C** Acessibilidade dos resíduos de aminoácidos, onde b: resíduos enterrados, e: resíduos com mais de 16% de sua estrutura voltada para o solvente. **D** Correlação da sequência proteica com sua estrutura secundária e pontos de acesso ao solvente, onde * mostra pontos de interação proteína-proteína, ** (PROFsec) correspondem a estrutura secundária com folhas- β (azul) e α -hélices (vermelho) *** correspondem aos pontos de acesso dos resíduos não expostos ao solvente (amarelo) e expostos ao solvente (azul) da proteína. Os dados foram preditos pelo servidor com uma precisão média acima de 72%

5.1.2. Análise de epítopos lineares para células B

De acordo com a literatura, a análise de epítopos para células B são divididas em duas categorias: linear ou não linear. O primeiro consiste em analisar os resíduos de aminoácidos que estão adjacentes um ao outro na sequência primária, enquanto o

segundo consiste em analisar os resíduos de aminoácidos na forma nativa da proteína que estão separados na estrutura primária, mas, contudo, são postos em proximidade (Bottino e cols, 2013). Neste trabalho não houve possibilidade de identificar epítopos não lineares devido a falta de informações tridimensionais da estrutura da interação MPP-anticorpo e, por essa razão, optamos por identificar epítopos lineares que podem ser preditos por programas.

Utilizando a ferramenta Bepipred v1.0 (Larsen e Nilsen, 2006), preditor de epítopos lineares para células B, foram revelados possíveis epítopos lineares para células B (**Tabela 2**). Para cada aminoácido avaliado pelo servidor foram atribuídos dados e gerados escores de predição. As posições dos epítopos lineares de células B foram previstas para serem localizadas nos resíduos com as pontuações mais altas no escore, usando o ponto de corte de 1.3 ao invés do padrão de 0.35, uma vez que, de acordo com os Larsen e Nielsen (2006) um ponto de corte de 1.3 confere uma especificidade teórica de 96% do epítopo, visto que com o ponto de corte padrão de 0.35 confere apenas especificidade teórica de 75%. Os dados abaixo sugerem 46 resíduos que podem fazer parte de possíveis epítopos lineares para células B, com potencial reação a anticorpos em experimentos *in vitro*.

Tabela 2: Predição de epítopos lineares para células B.

#	SEQNAME	SOURCE	FEATURE	START	END	SCORE	N/A	?
#	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
GI_322497501	EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOPE	39	39	1.386	. .	G E
GI_322497501	EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOPE	43	43	1.821	. .	R E
GI_322497501	EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOPE	44	44	1.886	. .	L E
GI_322497501	EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOPE	45	45	2.027	. .	P E
GI_322497501	EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOPE	46	46	2.196	. .	P E
GI_322497501	EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOPE	47	47	2.319	. .	G E
GI_322497501	EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOPE	48	48	2.452	. .	P E
GI_322497501	EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOPE	49	49	2.706	. .	S E
GI_322497501	EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOPE	50	50	2.735	. .	S E
GI_322497501	EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOPE	51	51	2.426	. .	K E
GI_322497501	EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOPE	52	52	2.085	. .	P E
GI_322497501	EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOPE	53	53	1.801	. .	A E
GI_322497501	EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOPE	54	54	1.621	. .	P E
GI_322497501	EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOPE	55	55	1.391	. .	V E
GI_322497501	EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOPE	92	92	1.475	. .	A E
GI_322497501	EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOPE	93	93	2.236	. .	Y E
GI_322497501	EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOPE	94	94	2.469	. .	D E
GI_322497501	EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOPE	95	95	2.480	. .	P E
GI_322497501	EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOPE	96	96	2.608	. .	P E
GI_322497501	EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOPE	97	97	2.733	. .	S E
GI_322497501	EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOPE	98	98	2.716	. .	A E
GI_322497501	EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOPE	99	99	2.276	. .	P E
GI_322497501	EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOPE	100	100	1.848	. .	G E
GI_322497501	EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOPE	155	155	1.308	. .	S E
GI_322497501	EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOPE	173	173	1.318	. .	Q E
GI_322497501	EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOPE	290	290	1.371	. .	P E
GI_322497501	EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOPE	291	291	1.420	. .	F E

GI_322497501_EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOP	292	292	1.494	. .	P E
GI_322497501_EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOP	293	293	1.359	. .	H E
GI_322497501_EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOP	296	296	1.358	. .	S E
GI_322497501_EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOP	315	315	1.345	. .	A E
GI_322497501_EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOP	316	316	1.383	. .	Q E
GI_322497501_EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOP	317	317	1.352	. .	Y E
GI_322497501_EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOP	320	320	1.369	. .	G E
GI_322497501_EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOP	321	321	1.310	. .	E E
GI_322497501_EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOP	322	322	1.509	. .	R E
GI_322497501_EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOP	323	323	1.654	. .	H E
GI_322497501_EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOP	324	324	1.668	. .	D E
GI_322497501_EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOP	325	325	1.574	. .	H E
GI_322497501_EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOP	326	326	1.451	. .	E E
GI_322497501_EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOP	335	335	1.322	. .	K E
GI_322497501_EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOP	336	336	1.510	. .	P E
GI_322497501_EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOP	337	337	1.912	. .	D E
GI_322497501_EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOP	338	338	1.999	. .	M E
GI_322497501_EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOP	339	339	1.560	. .	D E
GI_322497501_EMB_CBZ	BEPIPRED-1.0B	EPITOP	413	413	1.327	. .	E E
#	-----						

O ponto de corte usado para definição de um aminoácido dentro de um epitopo foi de 1.3, pela ferramenta BepiPred. Os dados, referentes à coluna indicada por "?" indicam pela letra "E" quando o aminoácido é previsto como sendo parte de um epitopo linear de célula B (pontuação acima do limiar) e "." como sendo região não pertencente a epitopos (pontuação abaixo do limiar). Os dados foram precedidos pelos símbolos de seus respectivos aminoácidos seguida por um '|' (barra vertical). No total 219 aminoácidos foram incluídos em possíveis epitopos lineares para células B, equivalente a 41% dos aminoácidos da proteína.

Ao correlacionar os dados da **Tabela 2** com a **Figura 10D**, é possível sugerir que parte (12/46) dos possíveis epitopos lineares de células B estão voltados para o solvente ou em estado intermediário (23/46), teoricamente aumentando a probabilidade de reconhecimento antígeno-anticorpo em possíveis ensaios *in vitro* (**Figura 11**). Os dados mostraram que a MPP tem potencial para ser reconhecida por células B pois estão situadas em resíduos expostos ao solvente a qual aumenta a chance de interagirem com células do sistema imune e, assim, gerarem anticorpos. Além disso, esses achados sugeriram regiões onde encontramos mais de 4 aminoácidos seguidos a qual aumentam a chance de serem reconhecidos por células B (Bottino e cols, 2013). Outro ponto a ser visto é que a presença de epitopos lineares podem influenciar na especificidade do teste como citado por alguns autores, que relataram que a presença de epitopos lineares nos candidatos a marcadores de diagnóstico podem aumentam sua especificidade para o organismo testado (Gupta, 2007; Menezes-Sousa e cols, 2014).

Além disso na tabela em **Apêndice A**, teríamos um total de 219 resíduos em zonas de possíveis epitopos lineares para células B usando um ponto de corte padrão de 0.35, como citado por Larsen e Nilsen (2006).

Correlação dos pontos de acesso com epitopos

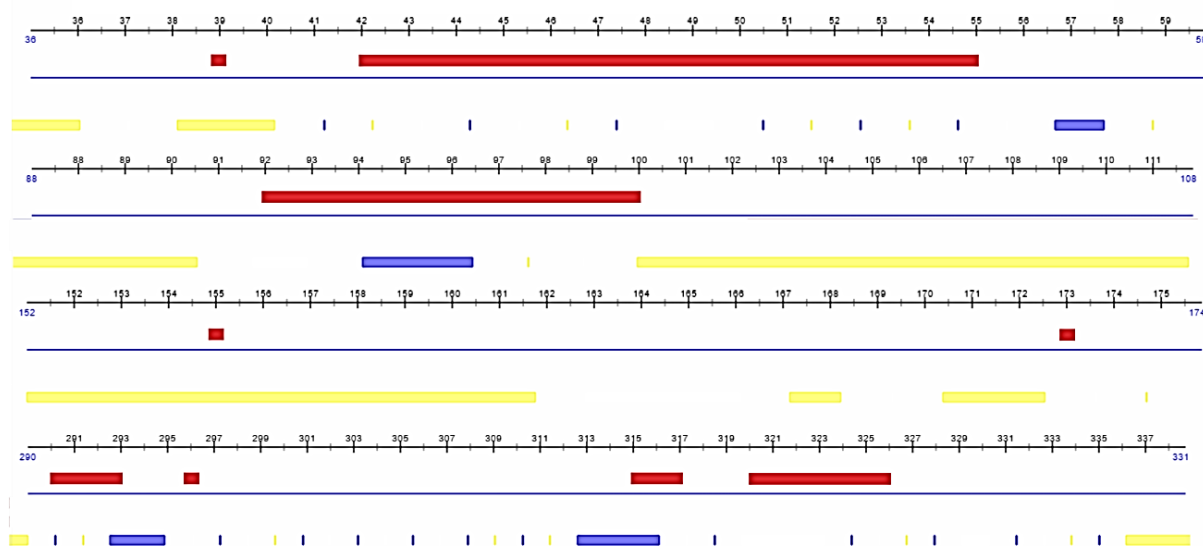


Figura 11: Correlação dos dados do PredictProtein com BepiPred. Pontos de acesso ao solvente dos resíduos expostos ao solvente da proteína em Azul; pontos de acesso enterrados ao solvente da proteína em Amarelo; epitopos sugeridos em vermelho e; área não marcada entre as cores amarelo e azul correspondem a pontos de acesso intermediários.

5.1.3. Análise de sítios de fosforilação

Usando a ferramenta NetPhos v2.0 (Bloom e cols, 1999; Johnson, 2009), preditor de potenciais sítios de fosforilação em células eucariotas, foram preditos pelo servidor escores gerados numa escala de 0 - 1, de algumas áreas como possíveis sítios de fosforilação em sequências independentes com uma sensibilidade na faixa de 69% a 96% e ponto de corte fixo em 0,5 (**Figura 12A**). Havendo fosforilação em algum ponto da sequência de aminoácidos da proteína, seja em resíduos de serina, treonina ou tirosina, há possibilidade de afetar vias de sinalização e processos celulares que medeiam metabolismo, transcrição, progressão do ciclo celular, diferenciação, citoesqueleto, movimento celular, e funções imunológicas e a imunogenicidade das proteínas e seus epitopos (Johnson, 2009).

A análise de sítios de fosforilação revelou potenciais fosforilações ao longo da sequência de aminoácidos (**Figura 12B**), nos resíduos de serina em 13 posições, nos resíduos de treonina em 6 posições e nos resíduos de tirosina em 1 posição. A correlação destes dados com o da **Figura 11** sugere que 2 aminoácidos de serina nas posições 49 e 97 seriam fosforilados em áreas de possíveis epitopos lineares para

células B que se encontram em zonas que estariam com seus pontos de acesso em posição intermediária de acesso ao solvente.

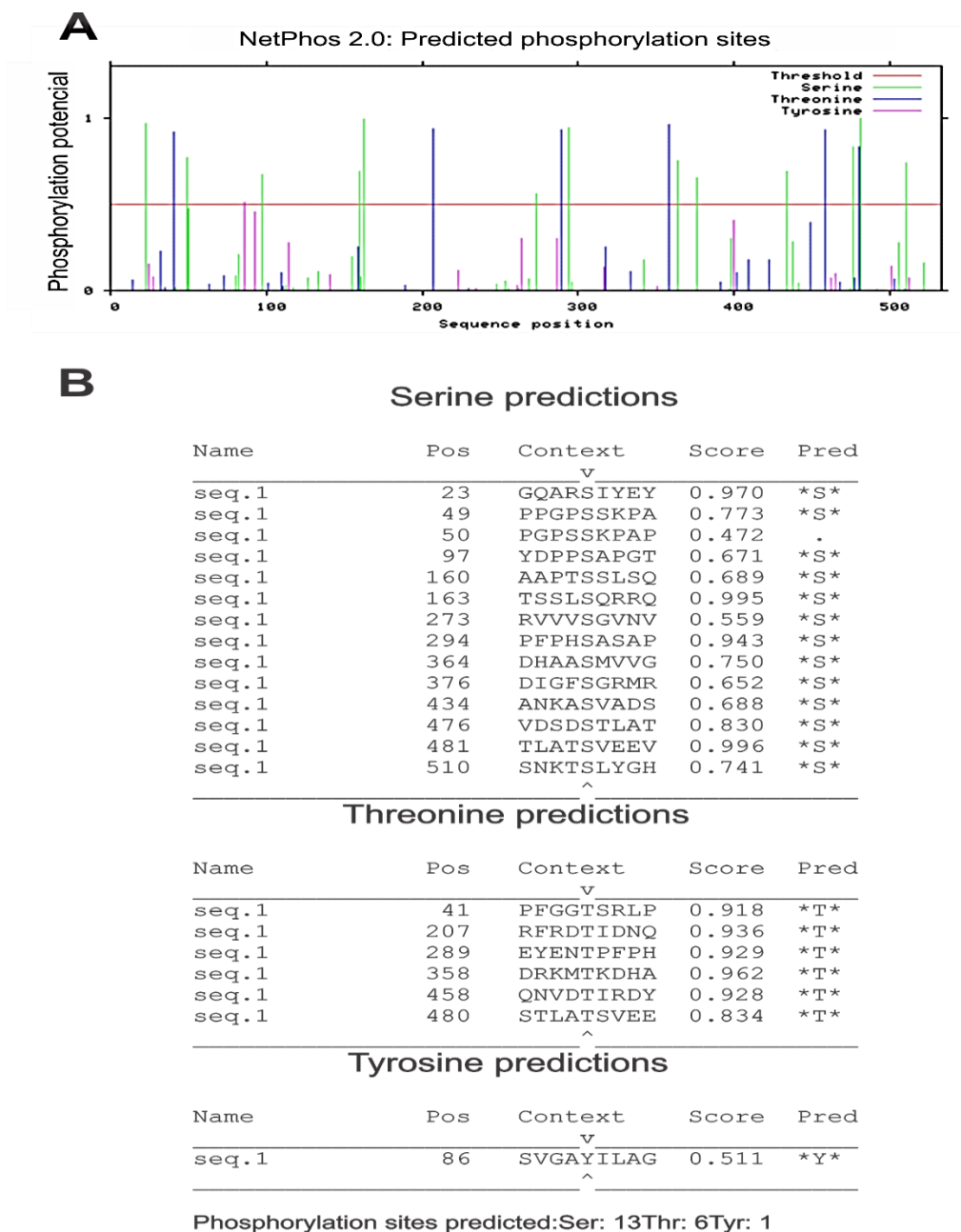


Figura 12: Predição de sítios de fosforilação com a ferramenta NetPhos v2.0. **A** Gráfico dos possíveis sítios de fosforilação; **B** Sítios de fosforilação de serina, treonina e tirosina sugeridos pelo servidor.

5.1.4. Análise de sítios de glicosilação

Usando a ferramenta GlycoEP (Chauhan e cols, 2013), preditor de sítios de glicosilação para proteínas de organismos eucariotos, o servidor atribui um escore ao

aminoácido (**Figura 13A**) baseado na similaridade de 40-60% com dados de outras proteínas glicosiladas, com ponto de corte padrão de 0.0. Os aminoácidos são preditos como glicosídicos ligados a N-,O- e C-. Foi utilizado a ferramenta YinOYang v1.2 (GUPTA, 2001, 2002), para predição de O-β-glicosilações, esta ferramenta atribui dados numa escala de a 0 a 1 com ponto de corte fixo de 0.5. O preditor YinOYang encontrou possíveis O-beta-glicosilações em 18 resíduos de treonina e serina (**Figura 13B**). O GlycoEP revelou 3 resíduos com potenciais N-glicosilações (**Figura 13C**).

De acordo com Chauhan e cols, (2013), havendo modificações pós-traducionais por glicosilações na proteína, diversas funções biológicas podem ser afetadas, como: forma da proteína / manutenção da estrutura, regulação da forma (dobra) de proteínas, rigidez da membrana plasmática, atividades enzimáticas, na imunogenicidade, na antigenicidade, na patogenicidade e no papel das interações antígeno-hospedeiro.

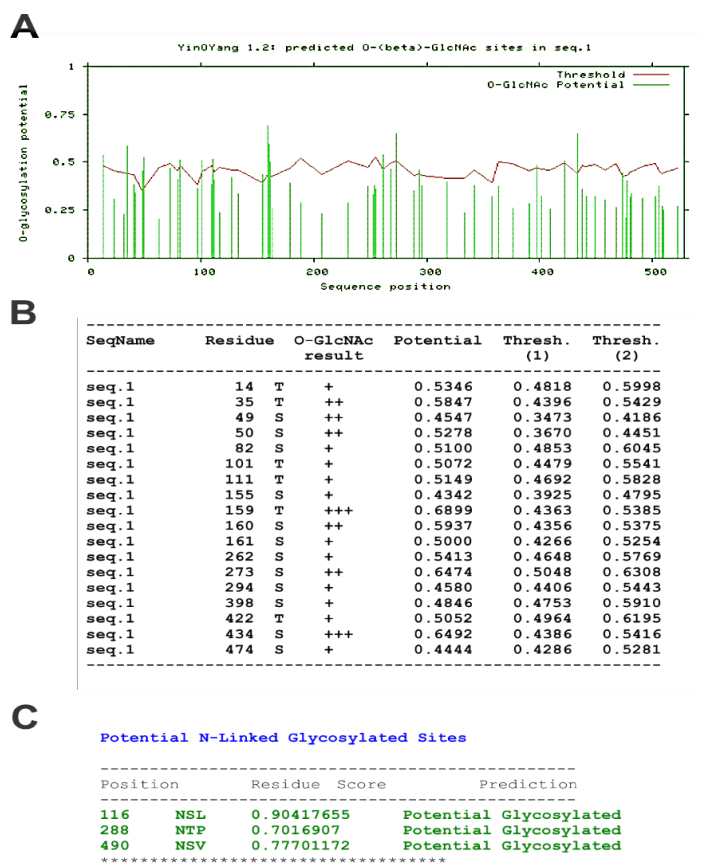


Figura 13: Predição de sítios de glicosilação com as ferramentas GlycoEP e YinOYang v1.2. A Gráfico dos possíveis sítios de glicosilação pelo servidor YinOYang. **B** Sítios de glicosilação de serina, treonina sugeridos pelo servidor YinOYang. **C** Sítios de glicosilação sugeridos pelo servidor GlycoEP.

O GlycoEP também não detectou O-, e C-glicosilações. A análise comparativa entre os dados de fosforilação e glicosilação revelaram 3 possíveis zonas em comuns (**Apêndice G**). Ao correlacionar os dados adquiridos nas demais predições, encontramos zonas em comum de glicosítios nas regiões preditas de epitopos lineares para células B majoritariamente em áreas de acesso intermediário ao solvente (**Apêndice G**).

Ao correlacionar os dados das predições com os alinhamentos entre tripanossomatídeos (**Figura 14**) encontramos zonas em comum que podem indicar possíveis reações cruzadas em testes de imunodiagnóstico entre as *Leishmanias*, contudo, muitas dessas zonas com determinantes imunogênicos não são mantidos em *T. cruzi* o que pode sugerir que a MPP não reaja a soros sensibilizados ao *T. cruzi*. Outro fato a ser visto são os aminoácidos que tiveram determinantes imunogênicos em comum, o que sugere que fosforilações e glicosilações possam atuar como haptenos e, assim, aumentar a imunogênicidade do resíduo a qual estão ligados (Gribben e cols, 1990; Johnson, 2009; Chauhan e cols, 2013). Outro fato a ser visto é que a aquisição da rMPP poderá mostrar em ensaios preliminares *in vitro* se haverá reações cruzadas com outros organismos que comumente são reconhecidos para testes sorológicos em cães, como *Ehrlichia canis* e *Babesia*, e em humanos, como *T. cruzi* (Krawczak e cols, 2015; Ruithe e cols, 2016). Além disso, as áreas de maior potencial imunogênico poderão ser usadas para criar quimeras, fato já visto na literatura que combinaram áreas de maior imunogenicidade entre uma ou mais proteínas e que resultaram no aumento de sua sensibilidade e especificidade do teste (Bottino e cols, 2013; Ruithe e cols, 2016), como visto nos trabalhos de Soto e cols (1998) e de Rosati e cols (2001) que conseguiram uma sensibilidade de 73-93% e especificidade de 96-100%.

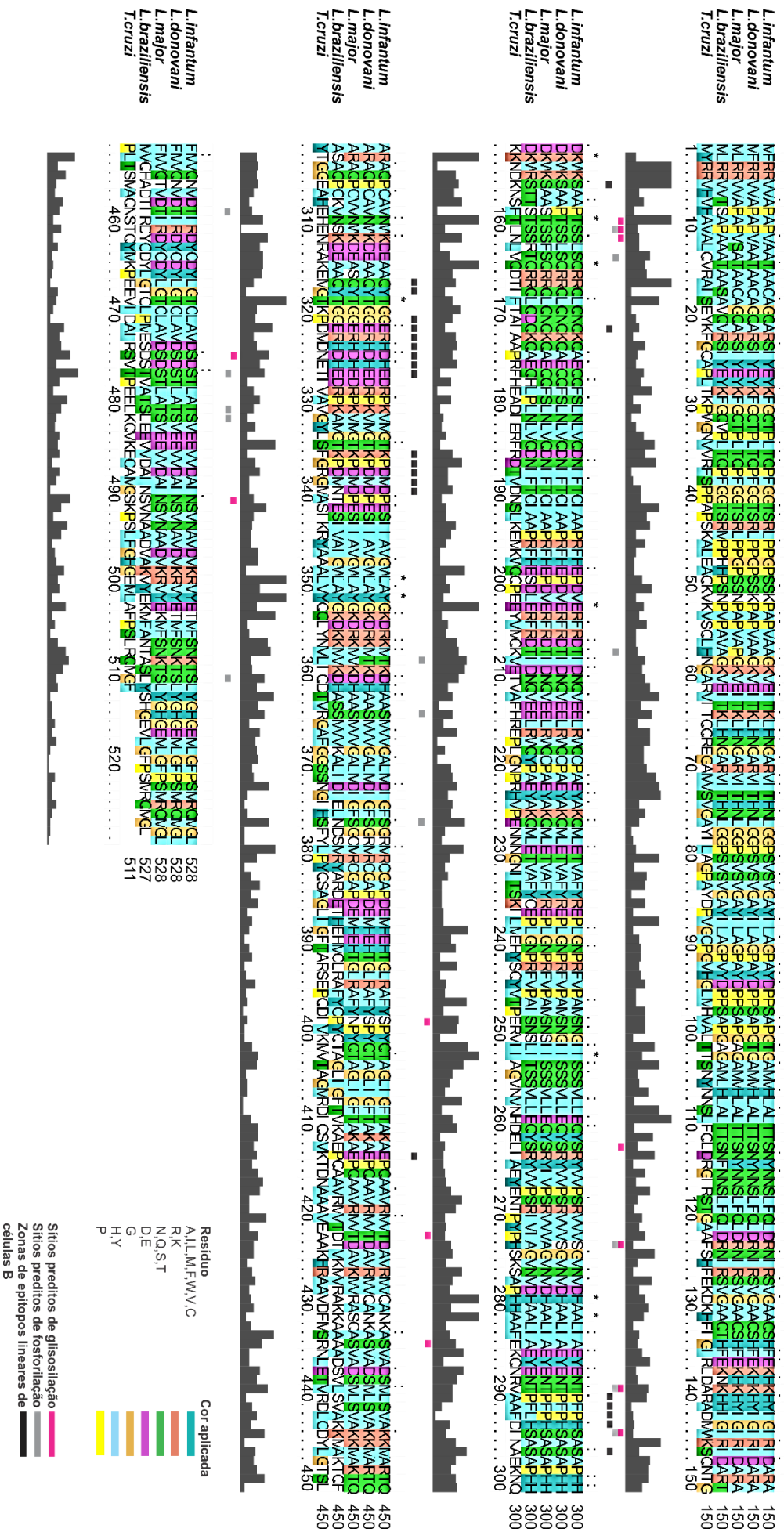


Figura 14: Correlação dos dados preditos em *L. infantum* contra sequências de outros trypanosomatídeos. *L. infantum* (ref XP_001464106.1), *L. donovani* (ref XP_003859287.1), *L. major* (ref XP_001681831.1), *L. braziliensis* (ref XP_001563211.2) e *T. cruzi* (ref XP_814023.1) mostrando possíveis epitopos lineares de células B, possíveis sítios de glicosilação e fosforilação encontradas na *L. infantum*. Todas referências disponíveis no banco de dados do NCBI

5.3. Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

A estratégia de realizar a análise preliminar *in silico* para depois tomar a decisão de prosseguir para testes *in vitro* foi citada por vários trabalhos que tiveram o intuito de encontrar marcadores de diagnóstico de parasitos (Faria, 2010; Carvalho e cols, 2011; Lima e cols, 2016). Após a análise *in silico* decidimos que a MPP teria qualidades imunogênicas para prosseguir para testes *in vitro*, com isso, desenhamos os *primers* que amplificariam a região do gene que codifica a MPP (**Tabela 1**) e realizamos as reações de amplificação utilizando amostra de DNA total de *Leishmania chagasi*. A padronização dos *primers* (**Figura 15A** e **Apêndice H**) foi conduzida segundo a metodologia de Taguchi, citada por Viljoen e cols (2005).

Os resultados da padronização apontaram que a reação I como insatisfatória devido à grande formação de dímeros de *primers* indicado pela seta vermelha na **Figura 15A** (Viljoen e cols, 2005). A reação II (**Figura 15B**) foi apontada como satisfatória, apresentando um bom sinal de banda e sem sinal de formação de dímeros, a temperatura considerada ótima para a reação foi de 65°C encontrada no produto com melhor sinal de banda. De acordo com a literatura, a padronização da reação de PCR é necessária para evitar a formação de dímeros de primers que poderiam interferir em reações de ligação enzimática entre produto da reação de PCR com vetor de clonagem (Viljoen e cols, 2005).

Os amplicons de número 5 da **Figura 15B** e de número 5 do **Apêndice H** foram selecionados para serem ligados através da ação da enzima ligase ao vetor pGEM-T easy, conforme o item 4.5. A transformação e seleção bacterianas foram realizadas de acordo com os itens 4.5.2 e 4.5.3. O DNA plasmidial foi extraído como indicado no item 4.5.4.

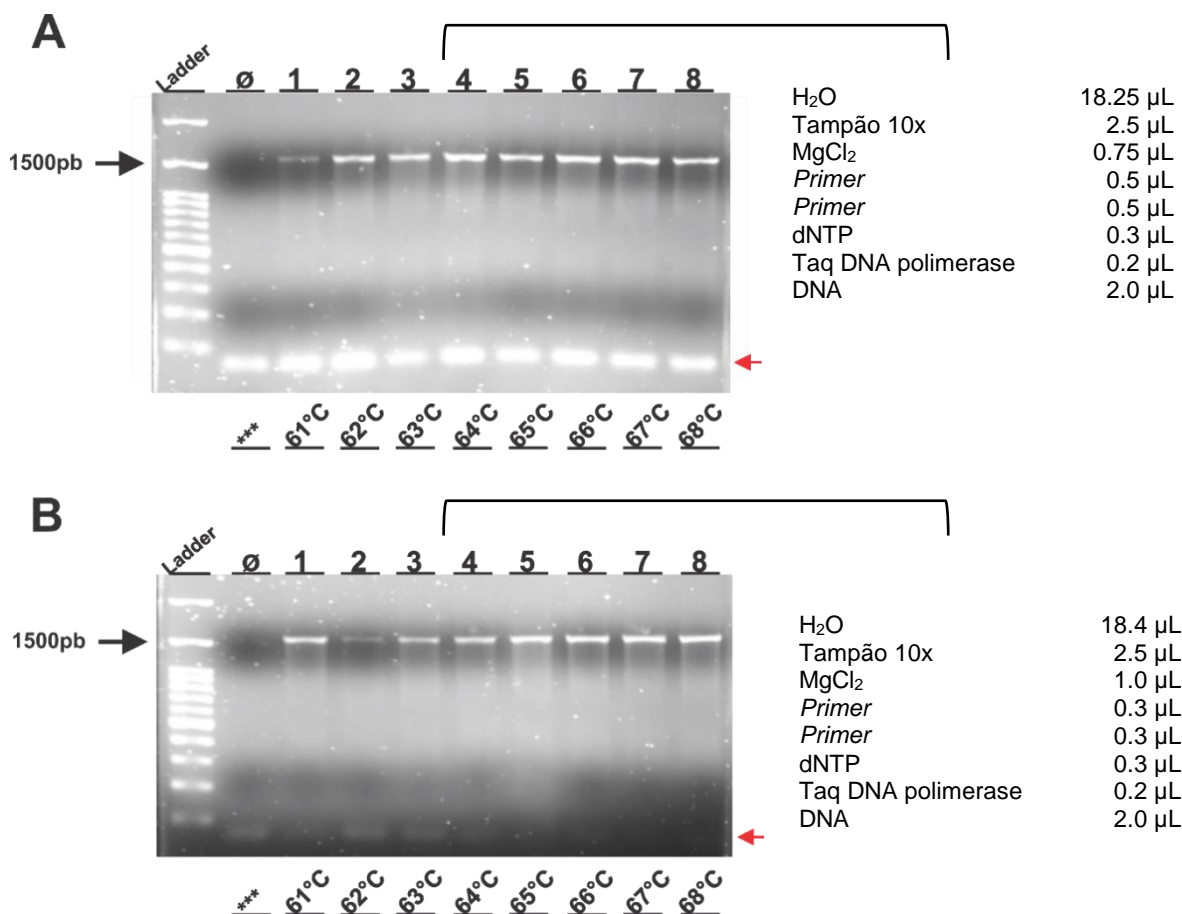


Figura 15: Imagem da padronização das PCRs do gene LDBPK_130760 usando os primers LC01/02 em gel de agarose a 0,8%. Reações de PCR em diferentes temperaturas de anelamento e concentrações de reagentes em A (reação I) e B (reação II). Controle Negativo, uso de 2 µL de H₂O tri-distilada (ø); produtos das reações I e II (1-8) e; Marcador de peso molecular (Ladder) de 100pb Kasvi. Seta preta indicando banda de altura de 1500pb. Seta vermelha mostrando resquícios de componentes da reação de PCR.

Para confirmar a presença do gene inserido na após extração plasmidial, foi realizada PCR usando 1 µL de DNA plasmidial com os primers respectivos para validar a presença do gene de interesse, como mostram as **Figura 16A** e **Apêndice H**. Com isso, os clones foram selecionados e alíquotados, de acordo com o item 4.7, para serem sequenciados.

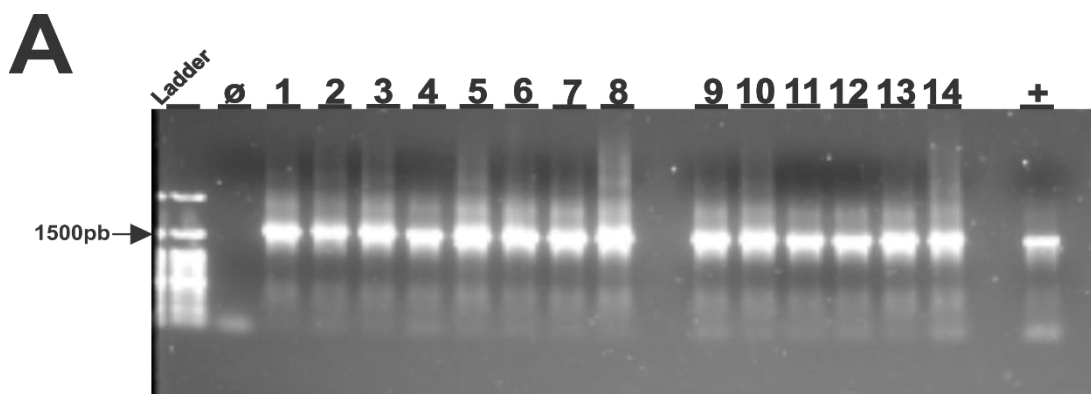


Figura 16: Análise em gel de agarose da presença do gene LDBPK_130760 no DNA plasmidial extraído. A Análise molecular por PCR do DNA plasmidial extraído. Marcador de peso molecular (Ladder) de 100pb kasvi; Controle Negativo, uso de 2 μ L de H₂O tri-distilada Ø, clones 1-14, controle positivo (+) DNA total de *Leishmania donovani*. Seta preta indicando banda de 1500pb. Gel de agarose a 0,8%.

5.4. Análise do Sequenciamento

Dos 16 clones enviados para sequenciamento, aproximadamente 40,9% deles apresentaram uma baixa qualidade do sequenciamento e foram descartadas devido à impossibilidade de identificar a sequência de DNA amplificada. Cerca de 59,1% foram alinhados com sequências contidas no banco de dados GenBank/NCBI para identificar a identidade das sequências inseridas nos clones.

A análise do alinhamento das sequências pelas ferramentas Clustal O e SnapGene permitiram identificar as sequências que tiveram inserções, deleções ou trocas de bases, dessa forma, as sequências que tiveram mutações que alterariam na codificação do padrão de aminoácidos pertencentes à proteína foram removidas. A **Figura 17A** mostra sequências alinhadas com o banco de dados GenBank/NCBI e seus respectivos valores de *E-value* e similaridade, identificados na análise pela ferramenta BLASTn. Os valores de similaridade mostraram-se significativos, sendo que 17/32 sequências apresentaram valores de identidade de 99% nas áreas reconhecidas como DNA de *Leishmania donovani*. O tamanho médio das sequências dos clones foram de 655 nts, sendo que o maior corresponde a 901 nts e o menor de 140 nts.

A

Leishmania donovani mitochondrial processing peptidase alpha subunit, putative (LDBPK_130760) mRNA, complete cds
Sequence ID: [ref|XM_003859239.1](#)|Length: 1587|Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
671 bits(363)	0.0	366/367(99%)	1/367(0%)	Plus/Plus

Leishmania donovani mitochondrial processing peptidase alpha subunit, putative (LDBPK_130760) mRNA, complete cds
Sequence ID: [ref|XM_003859239.1](#)|Length: 1587|Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1057 bits(572)	0.0	586/592(99%)	4/592(0%)	Plus/Plus

Leishmania donovani mitochondrial processing peptidase alpha subunit, putative (LDBPK_130760) mRNA, complete cds
Sequence ID: [ref|XM_003859239.1](#)|Length: 1587|Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1413 bits(765)	0.0	767/768(99%)	0/768(0%)	Plus/Plus

B

Leishmania donovani mitochondrial processing peptidase alpha subunit, putative (LDBPK_130760) mRNA, complete cds
Sequence ID: [ref|XM_003859239.1](#)|Length: 1587|Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
723 bits(391)	0.0	391/391(100%)	0/391(0%)	Plus/Plus

```
Query 1 TTCCGCCGTGTAGTCGCTCCGGCGCCGGTGGCGGCCACCGCAGCCTGCGCTGGGCAGGCT 60
|
|
|
Sbjct 4 TTCCGCCGTGTAGTCGCTCCGGCGCCGGTGGCGGCCACCGCAGCCTGCGCTGGGCAGGCT 63
Query 61 CGCAGCATCTACGAGTACAAGTTCGGTCAGACCCCTCACCCAACCGTTGGCGGAACC 120
|
|
|
Sbjct 64 CGCAGCATCTACGAGTACAAGTTCGGTCAGACCCCTCACCCAACCGTTGGCGGAACC 123
Query 121 TCTCGCCTGCCGCCTGGCCCTCGTCGAAGCCTGCCCGGTTGCTGCCGGAAGGTGGAG 180
|
|
|
Sbjct 124 TCTCGCCTGCCGCCTGGCCCTCGTCGAAGCCTGCCCGGTTGCTGCCGGAAGGTGGAG 183
Query 181 ATCACGAAGCTGCACAACGGCGCGCGCTCATCACGCACAACCTCGGTGGACCGTCGGTG 240
|
|
|
Sbjct 184 ATCACGAAGCTGCACAACGGCGCGCGCTCATCACGCACAACCTCGGTGGACCGTCGGTG 243
Query 241 TCCGTTGGTGCCCTACATACTCGCCGGCCCGCCTACGACCCACCGAGCGCGCCGGGCACG 300
|
|
|
Sbjct 244 TCCGTTGGTGCCCTACATACTCGCCGGCCCGCCTACGACCCACCGAGCGCGCCGGGCACG 303
Query 301 GGAGCCATGATGCACCTTGCCCTGACGACGAGCAACTACAATAATTCGCTGTTCCAGCTT 360
|
|
|
Sbjct 304 GGAGCCATGATGCACCTTGCCCTGACGACGAGCAACTACAATAATTCGCTGTTCCAGCTT 363
Query 361 GACCGCAACATTGCGAGTGTGCGCGCCGCC 391
|
|
|
Sbjct 364 GACCGCAACATTGCGAGTGTGCGCGCCGCC 394
```

Figura 17: Análise do sequenciamento dos clones. **A** Análise por BLASTn (GenBank/NCBI) com destaque para os valores de *E-value*, identidade e lacunas (Gaps) para cada um dos trechos do DNA. **B** Alinhamento do clone 05 com o servidor de dados BLASTn (GenBank/NCBI), utilizando o *hit* de maior escore encontrado.

Os clones de número 5 (*primers* LC01/02 – **Figura 16A**) e 13 (*primers* LC10/11 – **Apêndice H**) foram eleitos para serem submetidos a midprep, conforme item 4.5.4, devido ao alto escore obtido e continham mínimas alterações nucleotídicas que não resultariam na troca de aminoácidos. Sequências com mutações do tipo inserção ou mutação foram descartadas, uma vez que tais alterações poderiam gerar alterações na fase de leitura do gene, alterando bastante a estrutura primária da proteína a ser gerada.

5.5. Expressão de proteína em sistema procarioto

Previamente à expressão de proteínas, foi realizada análise molecular por PCR para verificar a presença do gene que codifica a proteína XP_001464106.1 em bactérias *E. coli* da linhagem *Rosetta* usando 1 uL da bactéria cultivada e submetido a análise eletroforética em gel de agarose (**Figura 18**). Em base do resultado da PCR, elegemos um dos clones, sendo eleito o de número 6, para prosseguir o experimento e, por conseguinte, o modelo procarioto foi submetido a expressão de proteínas por indução de IPTG. Os resultados do SDS-PAGE (**Figura 19A**) mostraram a proteína sendo expressa em uma relação de indução por tempo no sistema procarioto.

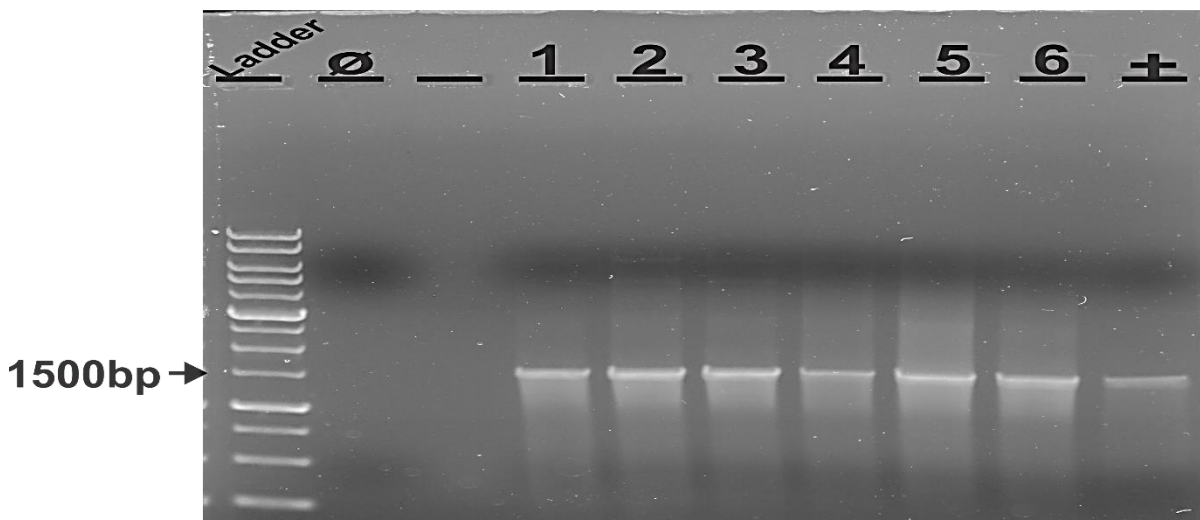


Figura 18: Verificação da presença do gene LDBPK_130760 no vetor de expressão após transformação bacteriana. Análise molecular usando *primers* LC10/LC11. Marcador de peso molecular (Ladder) de 1Kb Kasvi, 0 Controle Negativo, 1-6 Clones e + Controle Positivo (DNA genômico).

Na mesma figura, é possível sugerir que a proteína é encontrada majoritariamente nas membranas e não secretada, quando comparada as amostras contendo somente sobrenadante. Na **Figura 19B**, ao analisar as amostras sonicadas, verifica-se sua solubilidade. Comparando as amostras, vimos que a proteína se encontram majoritariamente no extrato insolúvel a qual acreditamos estar correlacionado a formação de corpos de inclusão

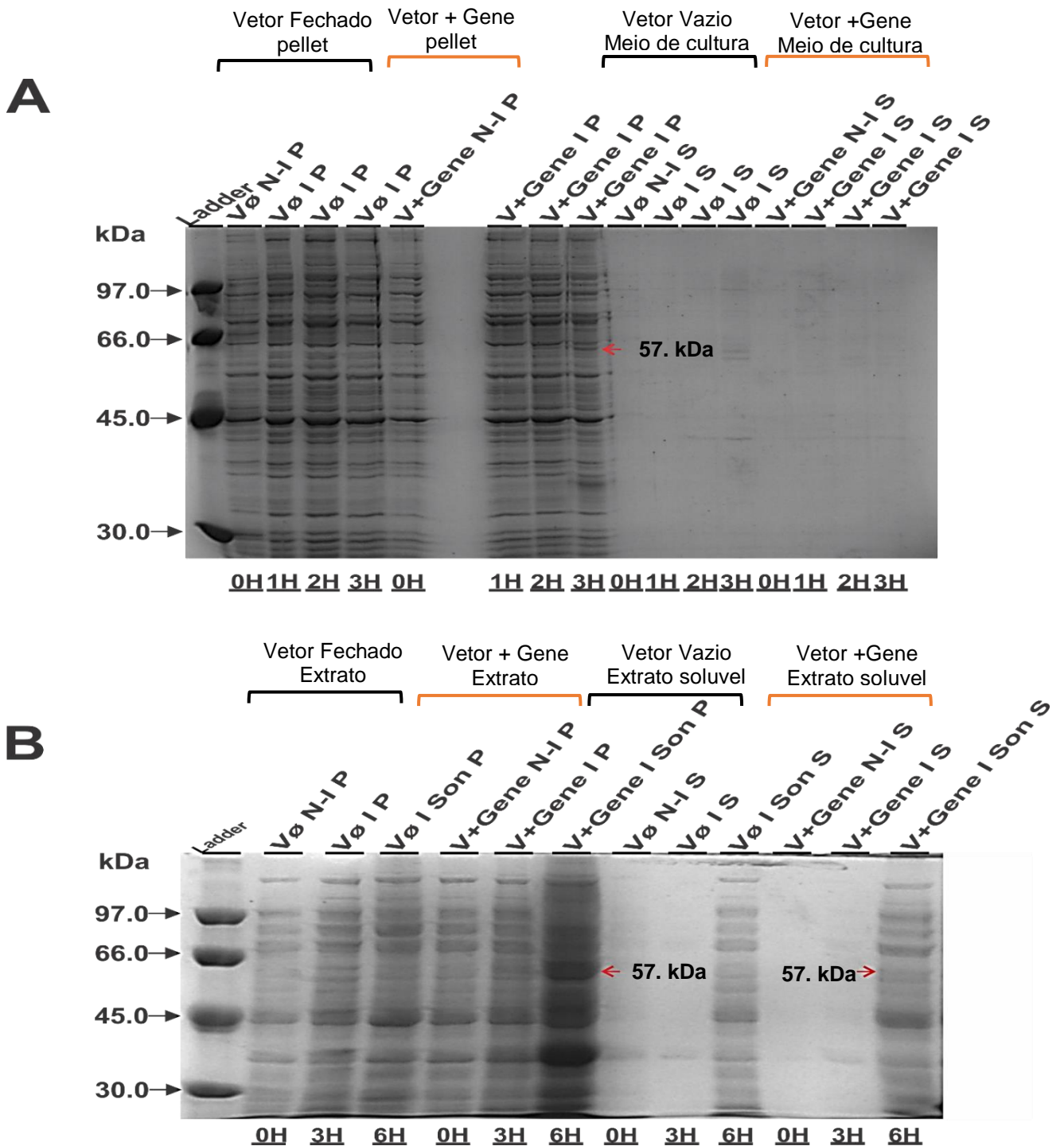


Figura 19: Análise da expressão da rMPP em sistema procaríoto em escala de tempo por indução de IPTG no meio de cultura e análise de solubilidade após sonicação. A Análise por SDS-PAGE relação bactérias induzidas por IPTG x Tempo. **B** Relação bactérias não sonicadas x sonicadas. Marcador de baixo peso molecular – Amersham (Ladder), vetor fechado não induzido pellet ($V\emptyset$ N-I P), vetor fechado induzido pellet ($V\emptyset$ I P), vetor fechado induzido sonificado pellet ($V\emptyset$ I Son P), vetor ligado ao gene não induzido pellet (V+Gene N-I P), vetor ligado ao gene induzido pellet (V+Gene I P), vetor ligado ao gene induzido sonificado pellet (V+Gene I Son P), vetor fechado não induzido sobrenadante ($V\emptyset$ N-I S), vetor fechado induzido sobrenadante ($V\emptyset$ I S), vetor fechado induzido sonificado sobrenadante ($V\emptyset$ I Son S), vetor ligado ao gene não induzido sobrenadante (V+Gene N-I S), vetor ligado ao gene induzido sobrenadante (V+Gene I S), vetor ligado ao gene induzido sonificado sobrenadante (V+Gene I Son S). Seta vermelha indicando proteína de estudo.

O clone de numero 6 (**Figura 18**) foi cultivado e, posteriormente, foi submetido ao processo de purificação, conforme o item 4.11. A análise das fases da purificação da rMPP (**Figura 20**) indicou que ocorria o enriquecimento (aumento da concentração) da proteína heteróloga durante o processo de purificação e, também, verificou-se que outras proteínas oriundas da bactéria estavam presentes no purificado, estas teriam em sua composição resíduos de histidina que foram retidos pela matriz de zinco usada pelo método de purificação por cromatografia de afinidade (Bornhorst e Falke, 2000; Gräslund e cols, 2008) e, a presença destas proteínas poderiam influenciar os resultados de outros ensaios, como no preparo das placas de ELISA ou , ate mesmo, nos testes sorológicos.

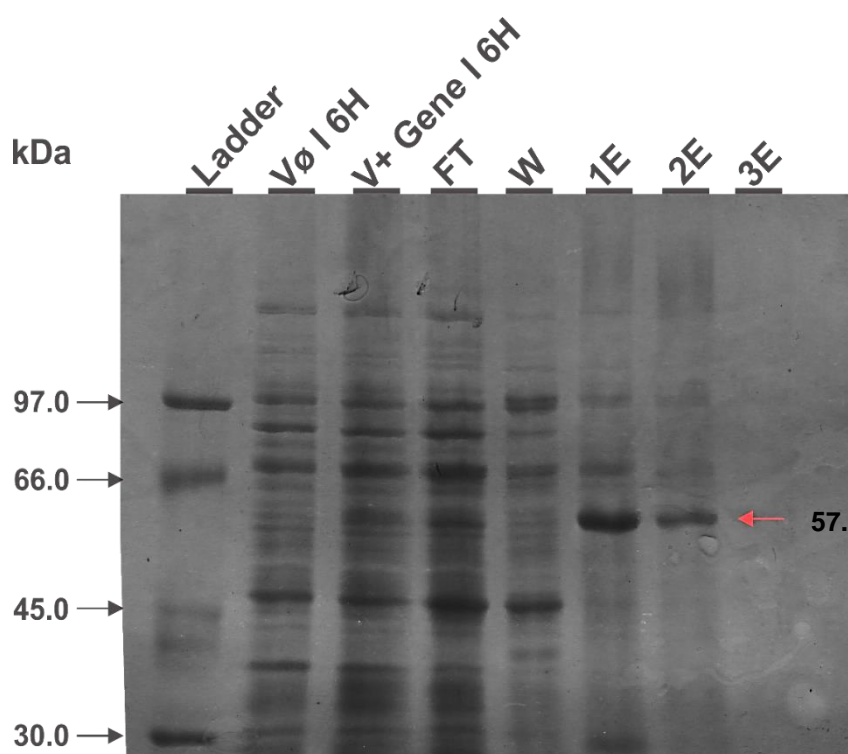


Figura 20: Etapas da purificação da rMPP do extrato insolúvel do sistema procarioto. Análise das etapas da purificação por SDS-PAGE. Marcador de peso molelcular (Ladder) Amersham de 97 kDa; vetor fechado induzido 6 horas (Vø I P 6H), vetor + Gene induzido 6 horas (V+ Gene I 6H); *Flow thrrough* (FT), *Wash* (W); 1E Primeira eluição; 2E Segunda eluição e 3E Terceira eluição.

O resultado do *imuno blotting* com anticorpo anti-His Tag (**Figura 21**) detectou proteínas com pesos moleculares próximos ao esperado de 57.656 kDa, foram especuladas que as bandas próximos a 60 kDa seriam a rMPP, uma vez que a essa proteína recebeu a adição da calda de histidina e, devido a isso, poderia ter

aumentado a massa da rMPP. Na mesma imagem, encontramos diferentes bandeamentos de menor massa que a rMPP, que de acordo com Mahmood e Yang (2012), seriam proteínas degradadas que geraram produtos de tamanhos variados.

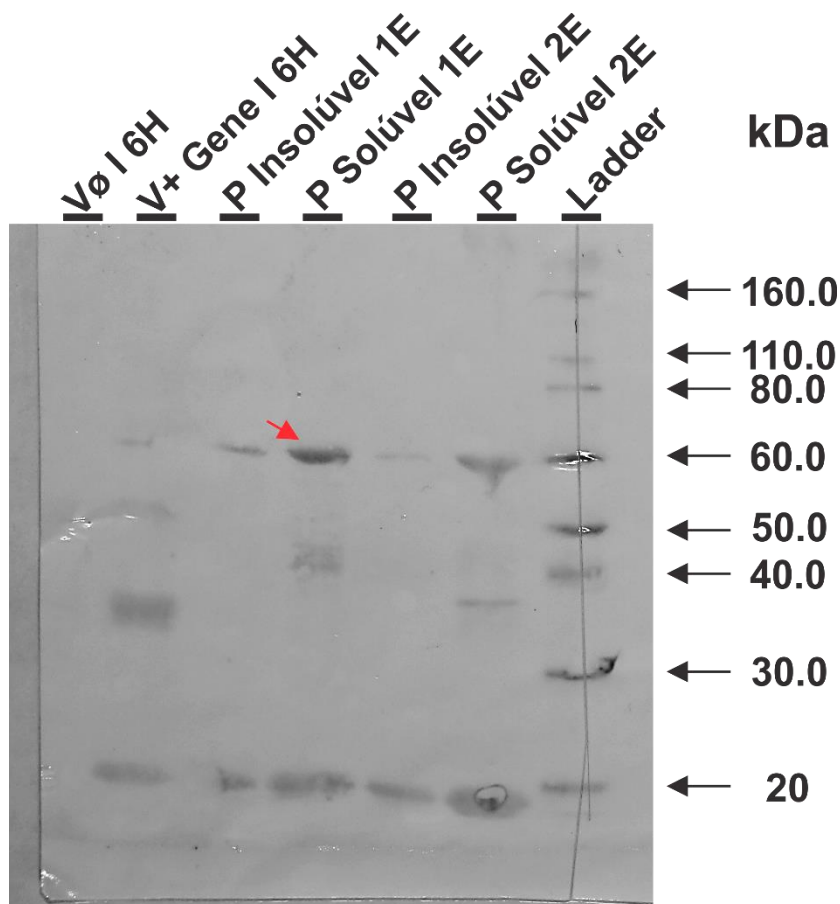


Figura 21: Detecção da rMPP por *Western blotting* com anticorpo anti calda de histidina da rMPP de sistema procarioto. Western blotting do purificado. Bactéria com vetor fechado e induzida por 6 horas (Vø 1 6H); Bactéria com vetor ligado ao gene induzida por 6 horas (V+Gene 1 6H); Porção insolúvel da Primeira eluição (P Insolúvel 1E); Porção solúvel da Primeira eluição (P Solúvel 1E); Porção insolúvel da Segunda eluição (P Insolúvel 2E); Porção solúvel da Segunda eluição (P Solúvel 2E); Marcador de peso molecular (Ladder) Novex Invitrogen;.

5.6. Expressão de proteína em modelo eucarioto

Após 14 dias da eletroporação das culturas de *L. tarentolae*, foram coletados 5 mL do cultivado e realizada extração de DNA, conforme o item 4.10.3, para análise molecular por PCR da integração do gene de estudo no sistema eucarioto. O resultado da PCR da cultura (**Figura 22**) sugeriu que o gene estava presente na *L. tarentolae* transfetada quando comparado a cultura de *L. tarentolae* tipo selvagem. A cultura do cinetoplastida com presença do gene integrado foi submetida a sonicação com tratamento de soluções sem/com uréia, item 4.10.4, e realizada purificação de

proteína, conforme item 4.11, analisado por SDS-PAGE. O resultado seria uma proteína com modificações semelhantes às encontradas em eucariotos (trypanosomatídeos) (Dortay e Mueller-Roeber, 2010; Niimi, 2012).

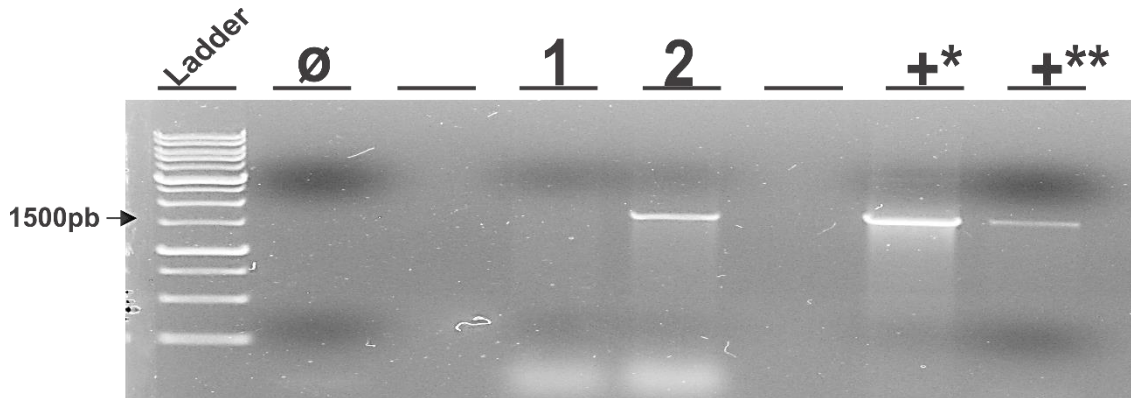


Figura 22: Análise molecular por PCR da presença do gene LDBPK_130760 em *L. tarentolae* transfetada usando os primers LC10/11. 1Kb Kasvi (Ladder); Negativo, uso de 2 µL de H₂O tri-distilada (Ø); *L. tarentolae* Wild Type (1); *L. tarentolae* eletroporada (2); Positivo, pGEM ligado ao gene LDBPK_130760 (+*) e Positivo, DNA genômico de *L. chagasi* (+**).

A análise por SDS-PAGE (**Figura 23**) indicou que as proteínas estavam eram encontradas no extrato solúvel da *Leishmania tarentolae*. Este fato era esperado devido as mudanças pós-traducionais que ocorrem em organismos eucariotos e que podem influenciar em sua solubilidade (Niimi, 2012).

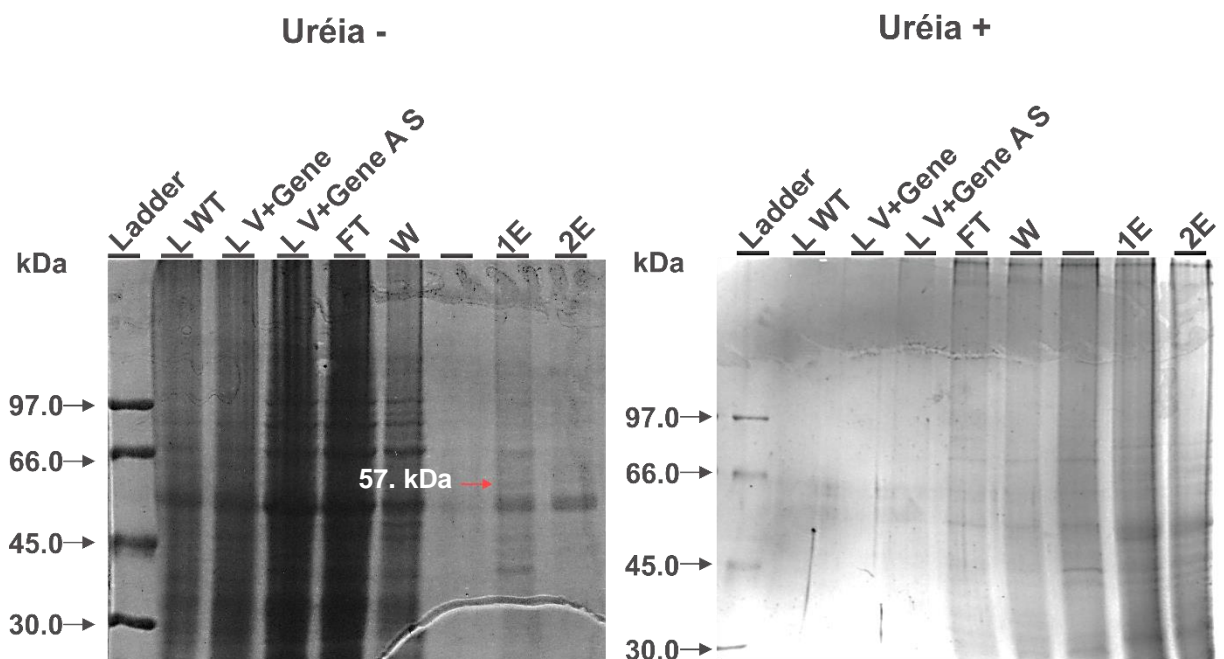


Figura 23: Etapas da purificação da rMPP de sistema eucarioto dos extratos solúvel e insolúvel. Amostras que receberam tratamento sem uréia (Uréia -) e amostras que receberam tratamento com uréia (Uréia +); Ladder Amersham; *L. tarentolae* wild type (L WT), *L. tarentolae* transfetada com o gene (L V+ Gene); *L. tarentolae* transfetada com o gene antes de sonicar (L V+ Gene A S) Flow through (FT), Wash (W); 1E Primeira eluição; 2E Segunda eluição.

O purificado foi submetido a *western blotting* com anticorpo anti-*His Tag* (**Figura 24**) com intuito de verificar presença da rMPP nas amostras do parasito total transfectado e, como controle, o tipo selvagem. A análise do *imunoblotting* sugere que a proteína está sendo expressa no modelo eucarioto, contudo, sua expressão é menor acentuada quando comparada ao sistema procarioto. Tal fato pode ser justificado pela diferença dos tempos de replicação entre os organismos. As proteínas de ambos os sistemas foram quantificadas para uso posterior em análise imunológica contra soros de cães por ELISA.

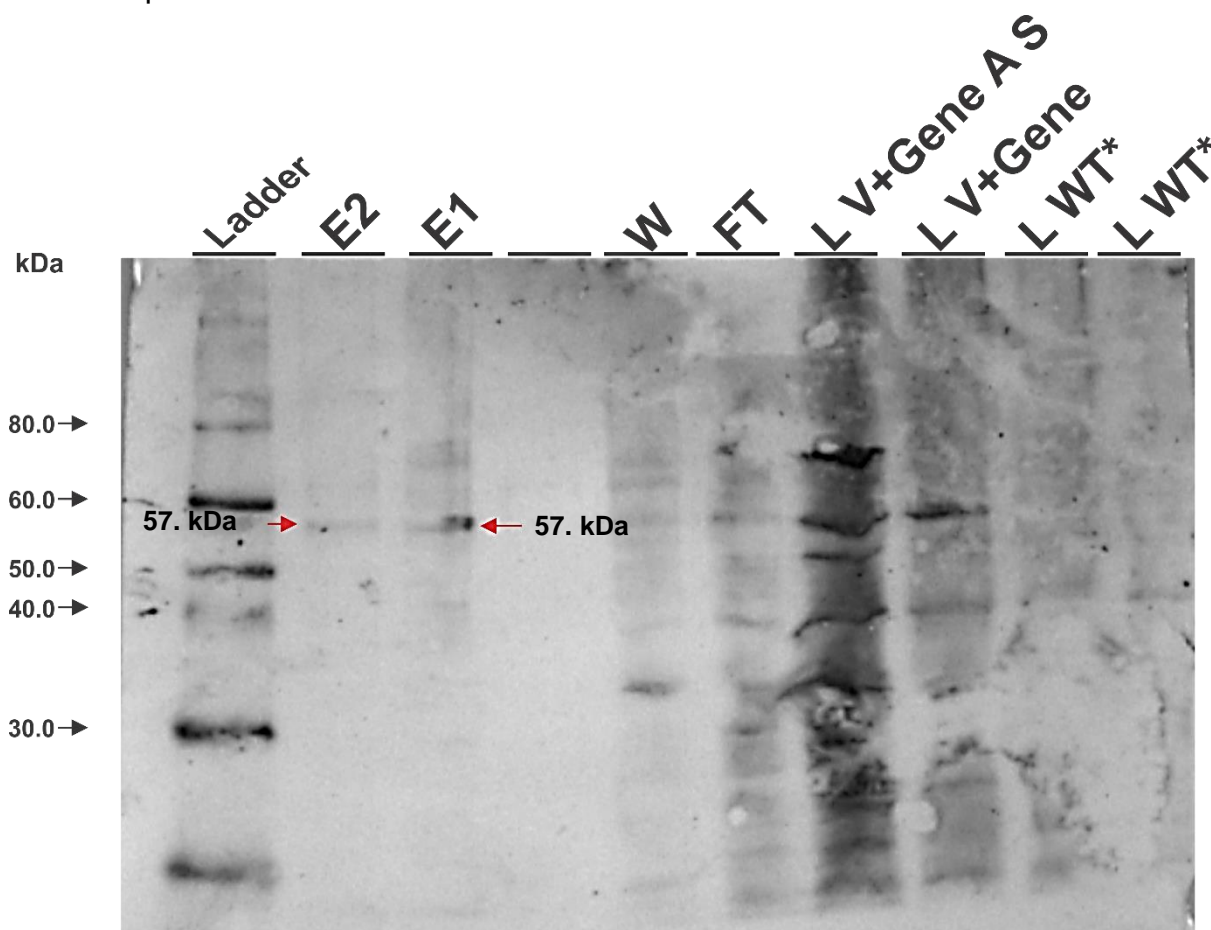


Figura 24: Detecção da rMPP por *Western blotting* com anticorpo anti calda de histidina da rMPP de sistema eucarioto. *L. tarentolae* wild type (L WT*); *L. tarentolae* wild type (L WT**); *L. tarentolae* transfetada contendo o gene (L V+ Gene); *L. tarentolae* transfetada antes de sonificar (L V+Gene A S); *Flow through* (FT), *Wash* (W); 1E Primeira eluição; 2E Segunda eluição.

5.7. Ensaio de Imunoabsorbância Enzimática - ELISA

Avaliando o potencial da rMPP para diagnóstico de LV, realizamos a análise preliminar do perfil sorológico usando o método de ELISA, este método foi escolhido para a realização dos ensaios por ser amplamente aplicado em laboratórios

de rotina devido a sua fácil padronização e execução (Pereira; Sousa e cols, 2013). Depois de escolhido o ensaio sorológico foram realizados o teste sorológico envolvendo 10 amostras de soro de cães, sendo 5 de cães infectados com a forma visceral da doença e 5 de cães saudáveis, uma vez que os animais infectados produzem anticorpos específicos contra os parasitos do complexo *L. donovani*. Outro fato importante consiste na ausência desta proteína no organismo *Canis familiaris*, esse dado pode indicar o uso desta metalo-peptidase em possível diagnóstico. Infelizmente não foi possível realizar a análise sorológica em soros de humanos.

Pelo imunoenensaio ELISA, observou-se que, na **Figura 25A e 25B**, todos os animais infectados apresentavam altas taxas de anticorpos específicos da classe IgG nas diluições de 1:50 e 1:100 com a rMPP, contudo, esta proteína do sistema eucarioto (**Figura 25B**) também influenciavam animais não infectados a apresentarem níveis altos de IgG, fato não ocorrido no sistema procarioto. Somente nos ensaios envolvendo a proteína heteróloga do sistema procarioto de 1:50 e 1:100 (**Figura 25A**) houve resultados que estão de acordo com os obtidos pelo Laboratório de Leishmanioses, departamento de parasitologia – UFMG, que confirmaram a positividade dos cães para leishmaniose visceral. A análise do ensaio na diluição de 1:1000 na **Figura 25B** revelou que esta tinha maior sensibilidade que as demais diluições no ensaio do mesmo sistema, onde 80% dos animais infectados apresentaram reatividade contra a proteína heteróloga.

Ao comparar as **Figuras 25A e 25B**, nota-se diferenças das taxas de IgG contra as proteínas heterólogas de ambos sistemas, esse fato pode estar relacionado a qualidade da purificação da rMPP, a qual acreditamos ter interferido nos resultados de ELISA da rMPP de sistema eucarioto. Contudo, se não houvesse tal interferente, as comparações dos resultados obtidos mostrariam que os ensaios em sistema procarioto tiveram maior desempenho que o sistema eucarioto, porém, somente na diluição 1:1000 que houve animais negativos acima do ponto de corte estimado, fato não ocorrido no sistema eucarioto.

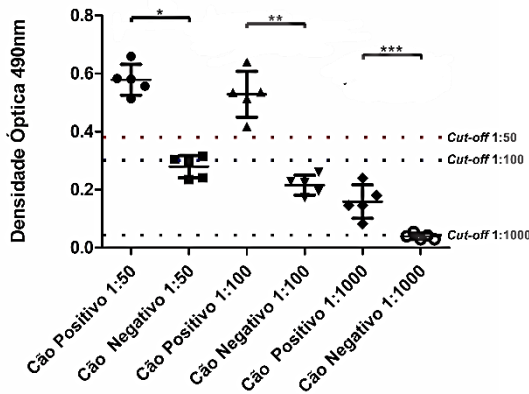
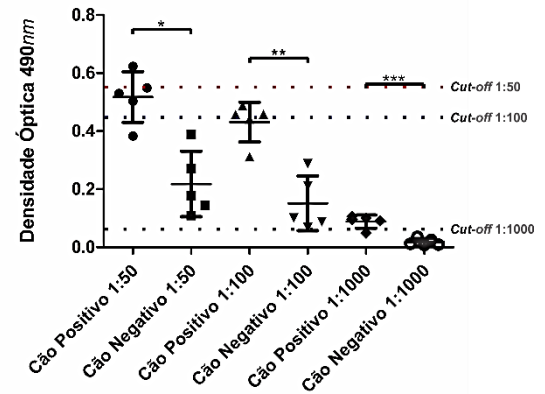
A**Proteína Heteróloga - Sistema Procarioto****B****Proteína Heteróloga - Sistema Eucarioto**

Figura 25: Avaliação de antigenicidade da proteína XP_001464106.1 dos sistemas procarioto e eucarioto por ELISA. A Avaliação da proteína heteróloga obtida de sistema procarioto em diferentes diluições de soro. * p value <0.001; ** p value <0.001; e *** p value <0.01. **B** Avaliação da proteína heteróloga obtida de sistema eucarioto em diferentes diluições de soro. * p value <0.01; ** p value <0.01; e *** p value <0.01.

Os dados do teste de ELISA das **Figuras 25A e 25B** foram submetidos a análise estatística de colunas. Os resultados obtidos pelo uso do teste t aplicados a todos os ensaios foram p value <0.01, mostrando significância estatística (du Prel e cols, 2009) e dando credibilidade na hipótese de uso desta proteína em possível diagnóstico para LV.

Diversos autores adotaram estratégias similares para identificar um possível candidato a marcador de diagnóstico (Carvalho e cols, 2011; Bottino e cols, 2013; Menezes-Sousa e cols, 2014; Duthie e cols, 2016). A grande maioria dos autores fez uso de proteínas recombinantes para imunoenaios e mostraram uma maior sensibilidade e especificidade comparadas aos ensaios com uso extratos totais de proteínas solúveis de *Leishmania* (Soto e cols, 1998; Maia e cols, 2012). Contudo, a escolha do candidato a marcador para diagnóstico com maior sensibilidade e especificidade dependerá do grau de exclusividade (espécie ou gênero-específico), isso acarretará redução em reações cruzadas entre espécies de organismos parasitários (Peacock e cols, 2007; Sousa e cols, 2013). Nosso resultado preliminar mostrou que a rMPP pode discriminar cães infectados de cães saudáveis e que possui p value <0.01 que valida a hipótese de uso deste antígeno como marcador de diagnóstico, contudo,

nos testes realizados por outros autores há necessidade de aumentar nosso número de amostra (n) para poder verificar se a rMPP pode realmente manter essa discriminação de infectados e não infectados (Bottino e cols, 2013; Menezes-Sousa e cols, 2014; Gao e cols, 2015; Agallou e cols, 2016). Além disso, o aumento de n amostral poderá contribuir nos dados de reatividade de soros infectados com outras espécies de tripanossomatídeos e, assim, poderá ser determinado sua sensibilidade, especificidade, valores preditivos negativos e positivos. Se a rMPP tiver reatividade com outros organismos poderá ser, então, selecionada as áreas de maior antigenicidade que apareçam nos parasitos do complexo *donovani* e combina-las em proteínas quimeras aumentando, assim, sua especificidade e sensibilidade como visto, por exemplo, por Soto e cols (1998) e Rosati e cols (2001). Além disso, combinações entre a proteína recombinante com outros marcadores já usados comercialmente (rK26 e rK39) poderiam aumentar sua sensibilidade e especificidade, além de eliminar reações cruzadas (Gao e cols, 2015; Vallur e cols, 2016) entre organismos similares (*T. cruzi*), que podem ocorrer em humanos, ou micro-organismos que ocorrem em *canídeos*, como *Ehrlichia canis* e *Babesia* (Krawczak e cols, 2015).

Por essas razões, o novo candidato a marcador de diagnóstico desenvolvido pelo presente trabalho tem potencial para ser tornar um marcador de diagnóstico para LV, contudo, necessita de novos testes para determinar sua sensibilidade, especificidade e possíveis reações cruzadas, assim como ocorrido com outras diversas proteínas recombinantes, entre elas k39, KMP II, Peroxidoxinas, LACK, histonas nucleossomais (H2A, H2B, H3 e H4) e proteínas de choque térmico (HSP60, 70 e 83) (Menezes e cols 2015).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho avaliou a proteína metalopeptidase, clã ME, família M16 para diagnóstico de LV, os dados do imunoenensaio (ELISA) mostraram significância estatística, porém, faz-se necessário aumentar a amostra e realizar novos testes para determinar sua sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo. Além disso, há necessidade de verificar a ocorrência de reações cruzadas contra parasitos que causem a leishmaniose tegumentar, devido ao fato de que o gene que codifica tal proteína estar presente em genomas de outras espécies de *Leishmania*.

Há necessidade de verificar possíveis combinações entre a proteína recombinante com marcadores já encontrados comercialmente, analisando se há alterações em sua sensibilidade e especificidade.

Contudo, o gene que traduz essa proteína não é totalmente presente no genoma de espécies de *T.cruzi*, isso pode indicar uma atenuação das reações cruzadas entre esses *trypanosomatideos*. Outras proteínas, também, foram citadas como gênero-específicas na literatura e, com isso, se faz necessário o estudo de sua expressão entre espécies diferentes de *Leishmania* e a sua aplicação como marcadores em diagnóstico.

A obtenção da MPP recombinante possibilitará também o avanço em estudos que objetivem sua caracterização funcional e bioquímica, como determinação de localização intracelular e secreção (com uso de anticorpos específicos), tanto na forma promastigota quanto amastigota. A futura cristalização e resolução da estrutura tridimensional da MPP possibilitará o estudo e desenho de inibidores para ensaios de cinética enzimática e de inibição *in vitro* e *in vivo*.

7. BIBLIOGRAFIA

ABBAS A K.; LICHTMAN A. H.; PILLAI S. **Imunologia Celular e Molecular**. Saunders Elsevier. São Paulo. 7º edição, 545 paginas, 2011.

ADLER S, BER M. Transmission of *Leishmaniatropica* by the bite of *Phlebotomus papatasi*. **Ind J Med Res** 29:803. 1941. Disponível em: <<http://www.cabdirect.org/abstracts/19421000279.html;jsessionid=02F063C122471AB14ED024769620BABF>>

AGALLOU M.; ATHANASIOU E.; SAMIOTAKI M.; PANAYOTOU G.; KARAGOUNI E. Identification of Immunoreactive *Leishmania infantum* Protein Antigens to Asymptomatic Dog Sera through Combined Immunoproteomics and Bioinformatics Analysis. **PLoS ONE** 11(2): e0149894. 2016. Disponível em: <[doi:10.1371/journal.pone.0149894](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149894)>

AKHOUNDI M.; KUHLS K.; CANNET A.; VOTÝPKA J.; MARTY P.; DELAUNAY P. e cols. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Negl Trop Dis** 10(3): e0004349. Disponível em: <[doi: 10.1371/journal.pntd.0004349](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349)>

ALMEIDA A. B.P.F.; SOUSA V. R. F.; GASPARETTO N. D.; SILVA G. F.R.; FIGUEIREDO F. B.; DUTRA V.; NAKAZATO L.; MADEIRA M. F. Canine visceral leishmaniasis: diagnostic approaches based on polymerase chain reaction employing different biological samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 76, 321–324. 2013. Disponível em <doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.03.017>

ALRAJHI A. A. Cutaneous leishmaniasis of the Old World. **Skin Therapy Lett.** Feb; 8(2) :1-4. 2003. Disponível em: <PMID:12728282 >

ALTAMIRANO-ENCISO, A. J.; MARZOCHI, M.C. A.; MOREIRA, J. S.; SCHUBACH, A. O. e MARZOCHI, K. B. F.: On the origin and spread of cutaneous and mucosal leishmaniasis, based on pre- and post-Colombian historical sources? **Hist Cienc Saude Manguinhos**, Sep-Dec;10(3):852-82. 2003. Disponível em: <PMID: 14994709>

ALVAR J, VE´LEZ ID, BERN C, HERRERO M, DESJEUX P. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**; 7(5):e35671. Disponível em: <[doi: 10.1371/journal.pone.0035671](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671)>

ASHFORD R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology** 30,1269-1281. 2000. Disponível em: < PMID: 11113254 >

BAÑULS A. L.; HIDE M.; PRUGNOLLE F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Adv Parasitol**, 64:1-109. 2007. Disponível em: <PMID: 17499100>

BASHIRUDDIN J. B. Extraction of DNA from Mycoplasmas. *Mycoplasma Protocols: a Laboratory Manual*. **New Jersey, Humana Press Inc.**1998 Chap 17; p141-144. Disponível em:<10.1385/0-89603-525-5:141>

BHARGAVA P.; SINGH R. Developments in Diagnosis and Antileishmanial Drugs. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, 2012:626838. 2012. Disponível em: <doi:10.1155/2012/626838>

BIFELD E.; CLOS J. The genetics of Leishmania virulence. **Med Microbiol Immunol**, Dec; 204(6):619-34. 2015. Disponível em: <doi: 10.1007/s00430-015-0422-1>

BLOM N.; GAMMELTOFT S.; BRUNAK, S. Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. **Journal of Molecular Biology**: 294(5): 1351-1362, 1999. Disponível em: <PMID: 10600390>

BLOM N.; SICHERITZ-PONTÉN T.; GUPTA R.; GAMMELTOFT S.; BRUNAK S. Prediction Of Post-Translational Glycosylation And Phosphorylation Of Proteins From The Amino Acid Sequence. **Proteomics**, jun;4(6):1633-49. 2004. Disponível em: <PMID: 15174133>

BOARINO A.; BOLLO E.; PRUNOTTO L.; CANALE L.; USLENGHI F.; POLETTI P. Application of a recombinant protein for the serological diagnosis of canine leishmaniasis. **Comp Immunol Microbiol Infect Di**, Nov;31(6):527-36. 2008. Disponível em: <doi: 10.1016/j.cimid.2007.09.002>

BORNHORST J. A.; FALKE J. J. Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. **Methods Enzymo**, 326: 245–254. 2000. Disponível em: <PMC2909483>

BOTTINO C. G.; GOMES L. P. PEREIRA J. B. e cols. Chagas disease-specific antigens: characterization of epitopes in CRA/FRA by synthetic peptide mapping and evaluation by ELISA-peptide assay. **BMC Infect Dis**. 13: 568. 2013. Disponível em: <doi: 10.1186/1471-2334-13-568>

CARVALHO G. B; SILVA-PEREIRA R. A; PACÍFICO L. G; FONSECA C. T. Identification of Schistosoma mansoni candidate antigens for diagnosis of schistosomiasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. Nov;106(7):837-43. 2011. Disponível em: <PMID: 22124556>

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Acessado em 15 de janeiro de 2016. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/health_professionals/>

CHAPPUIS F.; SUNDAR S.; HAILU A.; GHALIB H.; RIJAL S.; PEELING W. R.; ALVAR J.; BOELAERT M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology** , S7-S16 . 2007. Disponível em: <doi:10.1038/nrmicro1748>

CHAUHAN J. S.; RAO A.; RAGHAVA G. P. In silico platform for prediction of N-, O- and C-glycosites in eukaryotic protein sequences. **PLoS One**; Jun 28;8(6): e67008. 2013. Disponível em:<doi: 10.1371/journal.pone.0067008. Print 2013>

CLEM A. A Current Perspective on Leishmaniasis. **J Glob Infect Dis**. May-Aug; 2(2): 124–126. 2010. Disponível em: <doi: 10.4103/0974-777X.62863>

DAS L.; DATTA N.; BANDYOPADHYAY S.; DAS K. P. Successful Therapy of Lethal Murine Visceral Leishmaniasis with Cystatin Involves Up-Regulation of Nitric Oxide and Favorable T Cell Response. **J Immunol**, 166:4020-4028. 2000. Disponível em: <doi: 10.4049/jimmunol.166.6.4020>

DAVIDSON N. R. Leishmaniasis. **Protozoal Tropical Infections**, 33, Issue 8, Pages 43–46. 2005. Disponível em: <doi:10.1016/S1357-3039(07)70001-4>

DAWIT G.; GIRMA Z.; SIMENEW K. A Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of Leishmaniasis. **J Bacteriol Parasitol** 4:166. 2012. Disponível em: < doi:10.4172/2155-9597.1000166>

DAYAKAR A.; CHANDRASEKARAN S.; VERONICA J.; MAURYA R. Role of leptin in human visceral leishmaniasis? **Medical Hypotheses**, 77, 416–418. 2011. Disponível em: < doi: 10.1016/j.mehy.2011.05.032>

de MORAIS G. C. V.; LIMA A. K. C.; TERRA R.; SANTOS R. F.; SILVA S. A. G.; DUTRA P. M. L. The Dialogue of the Host-Parasite Relationship: *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* Infection. **BioMed Research International**, volume, Article ID 324915, 19 pages. 2015. Disponível em: < doi: 10.1155/2015/324915>

de Ruiter C. M.; van der Veer C.; Leeflang M. M.; Deborggraeve S.; Lucas C.; Adams E. R. Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. **J Clin Microbiol.**, Sep;52(9):3147-55. 2014. Disponível em: <doi: 10.1128/JCM.00372-14>

DESJEUX P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, Sep;27(5):305-18. 2004. Disponível em: <PMID: 15225981>

DESY S.; SCHNEIDER A.; MANI J. *Trypanosoma brucei* has a canonical mitochondrial processing peptidase. **Mol Biochem Parasitol**. 2012 Oct;185(2):161-4. 2012. Disponível em: <doi: 10.1016/j.molbiopara.2012.07.005>

DORTAY H.; MUELLER-ROEBER B. Research A highly efficient pipeline for protein expression in *Leishmania tarentolae* using infrared fluorescence protein as marker. **Microb Cell Fact**, May 10;9:29. 2010. Disponível em: <doi: 10.1186/1475-2859-9-29>

DUTHIE S.M; RAMAN S.V; PIAZZA M. F; REED G.S. The Development and Clinical Evaluation of Second-Generation Leishmaniasis Vaccines. **Vaccine**, January 5; 30(2): 134–141. 2012. Disponível em: <doi: 10.1016/j.vaccine.2011.11.005>

DUTHIE M. S.; FAVILA M.; HOFMEYER K. A.; e cols. Strategic evaluation of vaccine candidate antigens for the prevention of Visceral Leishmaniasis. **Vaccine**. May 27;34(25):2779-86. 2016. Disponível em: <doi: 10.1016/j.vaccine.2016.04.067>

du PREL J-B.; HOMMEL G.; ROHRIG B.; BLETTNER M. Confidence Interval or P-Value? **Dtsch Arztebl Int.** May; 106(19): 335–339. 2009. Disponível em: <doi: 10.3238/arztebl.2009.0335>

DVORÁK J.; MASHIYAMA S. T.; BRASCHI S.; SAJID M.; KNUDSEN G. M.; HANSELL E.; LIM K. C.; HSIEH I.; BAHGAT M.; MACKENZIE B.; MEDZIHRADESKY K. F.; BABBITT P. C.; CAFFREY C. R.; MCKERROW J. H. Differential use of protease families for invasion by schistosome cercariae. **Biochimie**, Feb;90(2):345-58. 2008. Disponível em: <PMID: 17936488>

EBRAHIM G. J. Leishmaniasis. **Jornal of tropical pediatrics**, Vol 46, page 128-130. 2000. Disponível em: < PMID:10893911>

ESCOLL P.; MONDINO S.; ROLANDO M.; BUCHRIESER C. Targeting of host organelles by pathogenic bacteria: a sophisticated subversion strategy. **Nat Rev Microbiol.** Jan;14(1):5-19. 2016. Disponível em: <doi: 10.1038/nrmicro.2015>

FERREIRA, M. U. **Parasitologia contemporânea**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2012. 439 páginas.

FSADNI C.; FSADNI P.; PISCOPO T.; AZZOPARDI C. M. Laryngeal leishmaniasis in Malta. **J Infect**, Feb;54(2): e61-3. 2006. Disponível em: <PMID: 16797076>

GAO X. B.; XIAO M.; WANG J.; LIU Y. J.; LIU Q. Z.; QI M. L. Optimization of candidate proteins for serological screening of Chlamydia trachomatis infection. **Genet. Mol. Res.** 14 (4): 12240-12246. 2015. Disponível em: <DOI http://dx.doi.org/10.4238/2015.October.9.12>

GEIGER A.; HIRTZ C.; BÉCUE T.; BELLARD E.; CENTENO D.; GARGANI D.; ROSSIGNOL M.; CUNY G.; PELTIER J. B. Exocytosis and protein secretion in Trypanosoma. **BMC Microbiology**, 10:20. 2010. Disponível em: <doi: 10.1186/1471-2180-10-20>

GRIBBEN J. G.; DEVEREUX S.; THOMAS N. S.; e cols. Development of antibodies to unprotected glycosylation sites on recombinant human GM-CSF. **Lancet.** Feb 24;335(8687):434-7. 1990. Disponível em: <PMID: 1968169>

GOSSAGE S. M.; ROGERS M. E.; BATES P. A. Two separate growth phases during the development of Leishmania in sand flies: implications for understanding the life cycle. **Int J Parasitol**, Sep 15;33(10):1027-34. 2003. Disponível em: <PMID: 13129524>

GOTO H.; LINDOSO J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, vol 8, n.04 pp. -419-43, 2010. Disponível em: < doi:10.1586/eri.10.19>

GRÄSLUND S.; NORDLUND P.; WEIGELT J.; e cols. Protein production and purification. **Nat Methods**, February; 5(2): 135–146. 2008. Disponível em: <doi:10.1038/nmeth.f.202>

GRIMALDI G. JR.; TESH R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin Microbiol Rev**, Jul;6(3):230-50. 1993. Disponível em: <PMID: 8358705>

GUPTA R.; BRUNAK, S. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. **Pacific Symposium on Biocomputing**, v. 7, p. 310-322, 2002. Disponível em: < PMID: 11928486 >

GUPTA K. R. **Immunology and Medical Microbiology**. 2007. Disponível online:<<http://nsdl.niscair.res.in/jspui/bitstream/123456789/454/1/Antigens.pdf>>

HASHIGUCHI Y.; GOMEZ E. L.; KATO H.; MARTINI L. R.; VELEZ L. N.; UEZATO H. Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. **Trop Med Health**. 44: 2. 2016. Disponível em: <doi: 10.1186/s41182-016-0002-0>

HERENIO E. M.; FORTES R. C.; RINCON G. Prevalência da Leishmaniose visceral em cães do Distrito Federal, segundo dados do centro de zoonoses de Brasília. **J Health Sci Inst**. ;32(2):126-9. 2014. Disponível em: <http://www.unip.br/comunicacao/publicacoes/ics/edicoes/2014/02_abr-jun/V32_n2_2014_p126a129.pdf>

HIDE M; BUCHETON B; KAMHAWI S; BRAS-GONÇALVES R; SUNDAR S; LEMESRE J.-L; BANULS A.-L. Understanding Human Leishmaniasis: The Need for an Integrated Approach. Encyclopedia of Infectious Diseases: **Modern Methodologies**, 2007. 747 páginas.

JISHA V. N; SMITHA R. B.; PRADEEP S.; E COLS. Versatility of microbial proteases. **Advances in Enzyme Research**, Vol.1, No.3, 39-51. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4236/aer.2013.13005>>

JOHNSON L. N. The regulation of protein phosphorylation. **Biochem Soc Trans**, Aug;37(Pt 4):627-41. 2009. Disponível em: <doi: 10.1042/BST0370627>

IVENS A. C.; PEACOCK C. S.; WORTHEY E. A.; MURPHY L.; AGGARWAL G.; BERRIMAN M.; SISK E.; RAJANDREAM MA, ADLEM E, AERT R, ANUPAMA A, APOSTOLOU Z, ATTIPOE P, BASON N, BAUSER C, BECK A, BEVERLEY SM, BIANCHETTIN G, BORZYM K, BOTHE G, BRUSCHI CV, COLLINS M, CADAG E, CIARLONI L, CLAYTON C, COULSON RM, CRONIN A, CRUZ AK, DAVIES RM, DE GAUDENZI J, DOBSON DE, DUESTERHOEFT A, FAZELINA G, FOSKER N, FRASCH AC, FRASER A, FUCHS M, GABEL C, GOBLE A, GOFFEAU A, HARRIS D, HERTZ-FOWLER C, HILBERT H, HORN D, HUANG Y, KLAGES S, KNIGHTS A, KUBE M, LARKE N, LITVIN L, LORD A, LOUIE T, MARRA M, MASUY D, MATTHEWS K, MICHAELI S, MOTTRAM JC, MÜLLER-AUER S, MUNDEN H, NELSON S, NORBERTCZAK H, OLIVER K, O'NEIL S, PENTONY M, POHL TM, PRICE C, PURNELLE B, QUAIL MA, RABBINOWITSCH E, REINHARDT R, RIEGER M, RINTA

J, ROBBEN J, ROBERTSON L, RUIZ JC, RUTTER S, SAUNDERS D, SCHÄFER M, SCHEIN J, SCHWARTZ DC, SEEGER K, SEYLER A, SHARP S, SHIN H, SIVAM D, SQUARES R, SQUARES S, TOSATO V, VOGT C, VOLCKAERT G, WAMBUTT R, WARREN T, WEDLER H, WOODWARD J, ZHOU S, ZIMMERMANN W, SMITH DF, BLACKWELL JM, STUART KD, BARRELL B, MYLER PJ. The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*. **Science**, Jul 15;309(5733):436-42. 2005. Disponível em: <PMID: 16020728>

KRAWCZAK FDA. S.; REIS I. A.; SILVEIRA J. A.; AVELAR D. M.; MARCELINO A. P.; WERNECK G. L.; LABRUNA M. B.; PAZ G. F. *Leishmania*, *Babesia* and *Ehrlichia* in urban pet dogs: co-infection or cross-reaction in serological methods? **Rev Soc Bras Med Trop**. Jan-Feb;48(1):64-8. 2015. Disponível em: <doi: 10.1590/0037-8682-0291-2014>

LAINSON R.; SHAW J. J.; SILVEIRA F. T.; BRAGA R. R. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 81(3):517. 1987. Disponível em: <PMID: 3686647 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3686647>>

LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, 1 (2). 2010. Disponível em: <<http://doi.org/10.5123/S2176-62232010000200002>>

LAMBERTZ U.; SILVERMAN J. M.; NANDAN D.; MCMASTER W. R.; CLOS J.; FOSTER L. J.; REINER N. E. Secreted virulence factors and immune evasion in visceral leishmaniasis. **J Leukoc Biol**, Jun;91(6):887-99. 2012. Disponível em:<doi: 10.1189/jlb.0611326>

LARSEN J. E. P.; LUND O. D.; NILSEN M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome Res.**; 2: 2. 2006. Disponível em: < PMID: 16635264>

LEE J. J. **Illustrated Guide To The Protozoa**. Publicado por Allen Press, Volume 1. 689 paginas.

LEISHMAN, W. B.; M. B.; R. AM. C. On the possibility of the occurrence of Trypanosomiasis in India. **The British Medical Journal**, 1 (2213), 1252-1254. 1903. Disponível em: <<http://PMC2513550>>

MADALOSSO G.; FORTALEZA M. C.; RIBEIRO F. A.; RIBEIRO F. A.; CRUZ L. L; NOGUEIRA A. P.; LINDOSO A. L. J. American Visceral Leishmaniasis: Factors Associated with Lethality in the State of Sao Paulo, Brazil. **Journal of Tropical Medicine** Volume 2012, Article ID 281572, 7 page. 2012. Disponível em: <doi:10.1155/2012/281572>

MAIA Z.; LÍRIO M.; MISTRO S.; MENDES C. M.; MEHTA S. .; BADARO R. Comparative study of rK39 *Leishmania* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis. **PLoS Negl Trop Dis**. Jan;6(1):e1484. 2012. Disponível em: <doi: 10.1371/journal.pntd.0001484>

MAHMOOD T.; YANG P. C. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. **N Am J Med Sci.** Sep;4(9):429-34. 2012. Disponível em: <doi: 10.4103/1947-2714.100998>

MENDES T. A. O.; CUNHA J. L. R.; LOURDES R. A.; e cols. Identification of Strain-Specific B-cell Epitopes in Trypanosoma cruzi Using Genome-Scale Epitope Prediction and High-Throughput Immunoscreening with Peptide Arrays. **PLoS Negl Trop Dis.** Oct; 7(10): e2524. 2013. Disponível em: <doi: 10.1371/journal.pntd.0002524>

MENEZES-SOUZA D; MENDES T. A. O; NAGEM R. A. P. e cols. 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.** ; 9(6): e99216. 2014. Disponível em: <doi: 10.1371/journal.pone.0099216>

MENEZES-SOUZA D; MENDES T. A. O; GOMES MDS, BARTHOLOMEU D. C; FUJIWARA R. T. Improving Serodiagnosis of Human and Canine Leishmaniasis with Recombinant Leishmania braziliensis Cathepsin L-like Protein and a Synthetic Peptide Containing Its Linear B-cell Epitope. **PLoS Negl Trop Dis** 9(1): e3426. 2015. Disponível em: <doi:10.1371/journal.pntd.0003426>

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MDS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral.** Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral.pdf>

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MDS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana.** Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2007. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_2ed.pdf>

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MDS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral.** Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf>

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MDS). **Situação Epidemiológica - Dados.** Acessado dia 5 de junho de 2016a. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/fevereiro/24/LTA-Casos-14.pdf>>

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MDS). **Situação Epidemiológica - Dados.** Acessado dia 5 de junho de 2016b. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/maio/20/LV-Casos.pdf>>

MOTTA M. C.; MARTINS A. C.; DE SOUZA S. S.; CATA-PRETA C. M.; SILVA R.; KLEIN C. C.; DE ALMEIDA L. G.; DE LIMA CUNHA O.; CIAPINA L. P.; BROCCHI M.; COLABARDINI A. C.; DE ARAUJO LIMA B.; MACHADO C. R.; DE ALMEIDA SOARES C. M.; PROBST C. M.; DE MENEZES C. B.; THOMPSON C. E.; BARTHOLOMEU D. C.; GRADIA D. F.; PAVONI D. P.; GRISARD E. C.; FANTINATTI-GARBOGGINI F.; MARCHINI F. K.; RODRIGUES-LUIZ G. F.; WAGNER G.; GOLDMAN G. H.; FIETTO J. L.; ELIAS M. C.; GOLDMAN M. H.; SAGOT M. F.; PEREIRA M.; STOCO P. H.; DE MENDONÇA-NETO R. P.; TEIXEIRA S. M.; MACIEL T. E.; DE OLIVEIRA MENDES T. A.; ÜRMÉNYI T. P.; DE SOUZA W.; SCHENKMAN S.; DE VASCONCELOS A. T. Predicting the proteins of *Angomonas deanei*, *Strigomonas culicis* and their respective endosymbionts reveals new aspects of the trypanosomatidae family. **PLoS One** ;8(4): e60209. 2013. Disponível em: <doi: 10.1371/journal.pone.0060209>

NEUBER H. Leishmaniasis. **JDDG**; 9:754–765. 2008. Disponível em: doi:<10.1111/j.1610-0387.2008.06809>

NIIMI T. Recombinant protein production in the eukaryotic protozoan parasite *Leishmania tarentolae*: a review. **Methods Mol Biol**; 824:307-15. 2012. Disponível em: <doi: 10.1007/978-1-61779-433-9_15>

PEACOCK C. S.; SEEGER K.; HARRIS D.; MURPHY L. e cols. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nat Genet.** Jul;39(7):839-47. 2007. Disponível em: <doi: 10.1038/ng2053>

PACE D. Leishmaniasis. **J Infect, Nov**; 69 Suppl 1: S10-8. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.016>

PAI-DHUNGAT J.V; PARIKH F. Kala-Azar (Leishmaniasis). **Journal of the association of physicians of Índia**, Mar;63(3):105-6. 2015. Disponível em: <PMID: 26543976>

PEREIRA, M. R.; ROCHA, F. S.; MELO, C. G.; MAGALHÃES, C. L. T.; CALIGIORNE, R. B. Aplicação das técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR) e em tempo real (qPCR) para detecção do genoma *Leishmania* sp em amostras biológicas. **Revista de Saúde Pública do SUS/MG**, 1 (1), 57-58. 2013. Disponível em: <http://ISSN 2318- 2598>

RANI K.; RANA R.; DATT S. Review On Latest Overview Of Proteases. **International Journal of Current Life Science**. Vol.2, Issue, 1, pp. 12– 18, January, 2012. Disponível em: <ISSN: 2249-1465>

RATHI S. K.; PANDHI R. K.; CHOPRA P.; KHANNA N. Post-kala-azar dermal leishmaniasis: a histopathological study. **Indian J Dermatol Venereol Leprol.** Jul-Aug; 71(4):250-3. 2005. Disponível em: <PMID: 16394433>

RAWLINGS N. D.; BARRETT A. J.; FINN R. D. Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Res** 44, D343-D350. 2015. Disponível em: <doi: 10.1093/nar/gkv1118>

ROGERS L.. Preliminary note on the development of Trypanosoma in cultures of the Cunningham-Leishman-Donovan bodies of cachexial fever and kala-azar. **Lanct**,167:215-216,1904. Disponível em: < DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)03458-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(01)03458-4)>

ROGERS M. B.; HILLEY J. D.; DICKENS N. J.; WILKES J.; BATES P. A.; DEPLEDGE D. P.; HARRIS D.; HER Y.; HERZYK P.; IMAMURA H.; OTTO T. D.; SANDERS M.; SEEGER K.; DUJARDIN J. C.; BERRIMAN M.; SMITH D. F.; HERTZ-FOWLER C.; MOTTRAM J. C. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of Leishmania. **Genome Res**, Dec;21(12):2129-42. 2011. Disponível em: <doi: 10.1101/gr.122945.111.>

ROSATI S.; ORTOFFI M.; PROFITI M.; MANNELLI A.; MIGNONE W.; BOLLO E.; GRADONI L. Prokaryotic expression and antigenic characterization of three recombinant *Leishmania* antigens for serological diagnosis of canine leishmaniasis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 10:1153-1156. 2003. Disponível em: <doi: 10.1128/CDLI.10.6.1153-1156.2003>

ROSS, M. R.; F. R. S.; F. R. C. S.; C. B. Further notes on Leishman's bodies. **The British Medical Journal**, 2 (2239), 1401. 1903. Disponível em:<<http://PMC2514909>>

ROST B.; SANDER C. Improved prediction of protein secondary structure by use of sequence profiles and neural networks. **Proc Natl Acad Sci U S A.** Aug 15; 90(16): 7558–7562. 1993b. Disponível em: <PMCID: PMC47181>

ROST B.; YACHDAV G.; LIU J. PredictProtein server *Nucleic Acids Res.* **Nucleic Acids Res**, Jul 1; 32: W321–W326. 2004. Disponível em: <doi: 10.1093/nar/gkh377>

ROST B.; SANDER C. Combining evolutionary information and neural networks to predict protein secondary structure. **Proteins.** May;19(1):55-72. 1994. Disponível em: <PMID: 8066087>

ROST B.; SANDER C. Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. **J Mol Biol**, Jul 20;232(2):584-99. 1993a. Disponível em: <PMID: 8345525>

SAMBROOK J.; RUSSELL D. W. The inoue method for preparation and transformation of competent e. Coli: "ultra-competent" cells. **CSH Protoc.** 2006 Jun 1. 2006. Disponível em: <doi: 10.1101/pdb.prot3944>

SBARDELLA D.; FASCIGLIONE G. F.; GIOIA M.; CIACCIO C.; TUNDO G. R.; MARINI S.; COLETTA M. Human matrix metalloproteinases: An ubiquitous class of enzymes involved in several pathological processes. **Mol Aspects Med**, Apr;33(2):119-208. 2012. Disponível em:<doi: 10.1016/j.mam.2011.10.015>

SAKKAS H.; GARTZONIKA C.; LEVIDIOTOU S. Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. **J Vector Borne Dis**, Jan-Mar;53(1):8-16. 2016. Disponível em: <PMID: 27004573>

SANTOS A. L.; BRANQUINHA M. H.; D'AVILA-LEVY C. M. The ubiquitous gp63-like metalloprotease from lower trypanosomatids: in the search for a function. **An Acad Bras Cienc**. Dec;78(4):687-714. 2006. Disponível em: <PMID: 17143406>

SARKARI B.; ASHRAFMANSOURI M.; HATAM G.; HABIBI P.; KHABISI A. S. Performance of an ELISA and Indirect Immunofluorescence Assay in Serological Diagnosis of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis in Iran. **Interdiscip Perspect Infect Dis**, 2014: 505134. 2014. Disponível em: <doi: 10.1155/2014/505134>

SEHGAL R.; GOYAL K.; KANWAR R.; SEHGAL A.; KANWAR J. R. Immunology of Leishmaniasis and Future Prospective of Vaccines. **Intech**. 2012. Disponível em: <doi: 10.5772/39291>

SHIMOKATA K.; KITADA S.; OGISHIMA T.; ITO A. Role of a-Subunit of Mitochondrial Processing Peptidase in Substrate Recognition. **J Biol Chem**, Sep 25;273(39):25158-63. 1998. Disponível em: <PMID: 9737975>

SILVERMAN J M., CHAN S. K , ROBINSON D.P, DWYER D. M., NANDAN D., FOSTER L. J.,REINER N. E. : Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. **Genome Biology** 2008, 9: R35. Disponível em:< doi:10.1186/gb-2008-9-2-r35>

SILVERMAN J. M.; CLOS J.; DE'OLIVEIRA C. C.; SHIRVANI O.; FANG Y.; WANG C.; FOSTER L. J.; REINER N. E. An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. **J Cell Sci**, Mar 15;123(Pt 6):842-52. 2010. Disponível em:<doi: 10.1242/jcs.056465>

SILVERMAN J. M.; REINER N. E. *Leishmania* exosomes deliver preemptive strikes to create an environment permissive for early infection. **Front Cell Infect Microbiol**, Jan 9;1:26. 2012. Disponível em: <doi: 10.3389/fcimb.2011.00026>

SILVA JUNIOR G. B.; BARROS E. J.; DAHER EDE F. Kidney involvement in leishmaniasis--a review. **Braz J Infect Dis**, 18(4):434-40. 2014. Disponível em: <doi: 10.1016/j.bjid.2013.11.013>

SINGH, S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. Review Article. **Indian Journal of Medical Research**, 123, 311-330. 2006. Disponível em: <<http://icmr.nic.in/ijmr/2006/march/0312.pdf>>

SMITH F. D.; PEACOCK S. C.; CRUZ K. A. Comparative genomics: From genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. **International Journal for Parasitology**, 37, 1173–1186. 2007. Disponível em: <doi: 10.1016/j.ijpara.2007.05.015>

SOTO M.; REQUENA J. M.; QUIJADA L.; ALONSO C. Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **J. Clin. Microbiol.** 36:58-63. 1998. Disponível em: <PMCID: PMC124807>

SOUZA, A. P.; SOTO, M.; COSTA, J. M. L.; BOAVENTURA, V. S.; OLIVEIRA, C. I.; CRISTAL, J. R.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Towards a More Precise Serological Diagnosis of Human Tegumentary Leishmaniasis Using *Leishmania* Recombinant Proteins. **PLOS One**, 8 (6), 2013. Disponível em: <<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0066110>>

TSUKAYAMA, P.; NÚÑEZ, J. H.; SANTOS, M. L.; SOBERÓN, V.; LUCAS, C. M.; MATLASHEWSKI, G.; LLANOS-CUENTAS, A.; ORE, M.; BALDEVIANO, G. C.; EDGEL, K. A.; LESCOANO, A. G.; GRAF, P. C. F.; BACON, D. J. A FRET-Based RealTime PCR Assay to Identify the Main Causal Agents of New World Tegumentary Leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 7 (1), 2013. Disponível em: <<http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001956>>

VALLUR A. C.; REINHART C.; MOHAMATH R.; e cols. Accurate serodetection of asymptomatic *Leishmania donovani* infection by use of defined antigens. **J Clin Microbiol** 54:1025–1030. 2016. Disponível em:<[doi:10.1128/JCM.02620-15](https://doi.org/10.1128/JCM.02620-15)>

VERMELHO A. B.; BRANQUINHA M. H.; D'AVILA-LEVY C. M.; SANTOS A. L. S.; DIAS E. P. S.; MELO A. C. N. Biological Roles of Peptidases in Trypanosomatids. *The Open Parasitology Journal*, 4, 5-23. **The Open Parasitology Journal**, 2010, 4, 5-23. Disponível em: <ISSN 1874-4214/10>

VILJOEN G. J.; NEL L. H.; CROWTHER J. R.; Molecular Diagnostic PCR Handbook. Netherlands, Springer 2005, 325 paginas.

VINCZE .; POSFAI J.; ROBERTS R. J. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. **Oxford Journals, Nucleic Acids Research** Vol 31, Issue 13 Pp. 3688-3691. 2003. Disponível em: <PMID: 12824395>

WALLER R. F.; MCCONVILLE M. J. Developmental changes in lysosome morphology and function *Leishmania* parasites. **Int J Parasitol**, Nov; 32(12):1435-45. 2002. Disponível em: <PMID: 12392909>

WEN, Y.; YAN X.; WEN P. e cols. Immunogenicity of the recombinant HxuCBA proteins encoded by hxCBA gene cluster of *Haemophilus parasuis* in mice, **Gene** Disponível em: <doi.org/10.1016/j.gene.2016.07.001>

WIJEYARATNE P.M; ARSENAULT L.K.J; MURPHY C.J. Endemic disease and development: the leishmaniasis. **Acta. Tropica**, 56, 349-364. 1994. Disponível em: <[doi:10.1016/0001-706X\(94\)90106-6](https://doi.org/10.1016/0001-706X(94)90106-6)>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis**. Fact sheet 2016. Acessado em 04 de abril de 2016a. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis**. Acessado em 04 de abril de 2016b. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Technical Report Series. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control**

of Leishmaniases. Geneva, 22–26, March 2010. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf>

WRIGHT, J. H. Protozoa in a case of tropical ulcer ("Delhi sore"). **Journal of Medical Research**, 10 (3), 472-482.7. 1904. Disponível em: <<http://PMC2105980>>

ZAPPACOSTA R.; CLAUDI R.; MAGNASCO S.; DELL'OSA E. Leishmania life cycle images in the cutaneous cytologic smear of an immunocompetent patient. **J Cytol**, Jan; 27 (1):35-6. 2010. Disponível em: <doi: 10.4103/0970-9371.66695>

8. APÊNDICES

Apêndice A: Predição de epitopos lineares para células B. O ponto de corte padrão para definição de um aminoácido dentro de um epitopo é de 0,35, pela ferramenta Bepipred. Os dados, referentes à coluna indicada por "?" indicam pela letra "E" quando o aminoácido é previsto como sendo parte de um epitopo linear de célula B (pontuação acima do limiar) e "." como sendo região não pertencente a epitopos (pontuação abaixo do limiar). Para uma análise conveniente, os dados foram precedidos pelos símbolos de seus respectivos aminoácidos seguida por um '|' (barra vertical). No total 219 aminoácidos foram incluídos em possíveis epitopos lineares para células B, equivalente a 41% dos aminoácidos da proteína.

#	SEQNAME	SOURCE	FEATURE	START	END	SCORE	N/A	?
#	-----		-----					
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	8	8	0.500	.	P E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	9	9	0.597	.	A E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	10	10	0.927	.	P E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	11	11	0.974	.	V E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	12	12	0.900	.	A E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	13	13	0.686	.	A E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	14	14	0.503	.	T E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	15	15	0.389	.	A E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	16	16	0.557	.	A E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	17	17	0.527	.	C E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	18	18	0.562	.	A E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	19	19	0.477	.	G E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	29	29	0.443	.	F E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	30	30	0.417	.	G E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	31	31	0.608	.	Q E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	32	32	0.851	.	T E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	33	33	0.909	.	P E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	34	34	1.065	.	L E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	35	35	1.192	.	T E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	36	36	1.129	.	Q E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	37	37	1.124	.	P E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	38	38	1.130	.	F E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	39	39	1.386	.	G E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	40	40	1.047	.	G E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	41	41	1.110	.	T E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	42	42	1.283	.	S E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	43	43	1.821	.	R E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	44	44	1.886	.	L E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	45	45	2.027	.	P E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	46	46	2.196	.	P E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	47	47	2.319	.	G E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	48	48	2.452	.	P E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	49	49	2.706	.	S E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	50	50	2.735	.	S E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	51	51	2.426	.	K E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	52	52	2.085	.	P E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	53	53	1.801	.	A E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	54	54	1.621	.	P E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	55	55	1.391	.	V E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	56	56	1.034	.	A E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	57	57	0.870	.	A E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	58	58	0.460	.	G E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	76	76	0.538	.	L E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	77	77	0.797	.	G E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	78	78	0.887	.	G E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	79	79	0.857	.	P E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	80	80	0.865	.	S E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	81	81	1.022	.	V E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	82	82	0.655	.	S E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	90	90	0.491	.	G E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	91	91	0.882	.	P E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	92	92	1.475	.	A E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	93	93	2.236	.	Y E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	94	94	2.469	.	D E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	95	95	2.480	.	P E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	96	96	2.608	.	P E
QUERY		BEIPRED-1.0B	EPITOPE	97	97	2.733	.	S E

QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	98	98	2.716	. .	A E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	99	99	2.276	. .	P E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	100	100	1.848	. .	G E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	101	101	1.278	. .	T E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	102	102	0.669	. .	G E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	112	112	0.406	. .	S E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	113	113	0.564	. .	N E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	114	114	0.575	. .	Y E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	130	130	0.575	. .	A E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	132	132	0.368	. .	Q E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	133	133	0.511	. .	S E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	134	134	0.395	. .	H E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	135	135	0.405	. .	F E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	149	149	0.394	. .	R E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	150	150	0.496	. .	A E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	151	151	0.906	. .	D E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	152	152	0.901	. .	K E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	153	153	1.065	. .	W E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	154	154	1.104	. .	K E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	155	155	1.308	. .	S E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	156	156	1.295	. .	A E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	157	157	1.270	. .	A E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	158	158	1.216	. .	P E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	159	159	1.174	. .	T E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	160	160	1.073	. .	S E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	161	161	1.017	. .	S E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	162	162	0.874	. .	L E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	163	163	0.744	. .	S E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	167	167	0.511	. .	Q E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	168	168	0.578	. .	L E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	169	169	0.698	. .	Q E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	170	170	0.680	. .	N E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	171	171	0.888	. .	Q E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	172	172	0.953	. .	K E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	173	173	1.318	. .	Q E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	174	174	0.944	. .	A E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	175	175	0.875	. .	E E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	176	176	0.354	. .	Q E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	196	196	0.905	. .	F E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	197	197	0.923	. .	H E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	198	198	0.962	. .	E E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	199	199	0.852	. .	P E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	200	200	0.526	. .	D E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	201	201	0.723	. .	V E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	202	202	0.772	. .	E E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	203	203	0.649	. .	R E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	204	204	0.383	. .	F E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	207	207	0.392	. .	T E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	208	208	0.363	. .	I E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	209	209	0.697	. .	D E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	210	210	0.731	. .	N E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	211	211	0.373	. .	Q E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	220	220	0.379	. .	P E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	221	221	0.405	. .	A E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	222	222	0.768	. .	E E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	223	223	0.461	. .	Y E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	236	236	0.363	. .	E E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	237	237	0.568	. .	P E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	238	238	0.966	. .	L E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	239	239	0.970	. .	G E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	240	240	0.774	. .	N E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	241	241	0.603	. .	P E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	242	242	0.538	. .	R E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	243	243	0.629	. .	F E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	244	244	0.463	. .	V E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	286	286	0.391	. .	Y E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	287	287	0.630	. .	E E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	288	288	1.069	. .	N E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	289	289	1.252	. .	T E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	290	290	1.371	. .	P E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	291	291	1.420	. .	F E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	292	292	1.494	. .	P E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	293	293	1.359	. .	H E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	294	294	1.294	. .	S E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	295	295	1.205	. .	A E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	296	296	1.358	. .	S E

QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	297	297	1.145	. .	A E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	298	298	1.124	. .	P E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	299	299	1.002	. .	H E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	300	300	1.104	. .	H E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	301	301	0.924	. .	A E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	302	302	0.827	. .	R E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	303	303	0.731	. .	A E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	304	304	0.439	. .	Q E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	305	305	0.464	. .	P E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	307	307	0.393	. .	A E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	308	308	0.522	. .	V E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	309	309	0.599	. .	N E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	310	310	0.599	. .	W E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	311	311	0.616	. .	K E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	312	312	0.728	. .	D E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	313	313	0.900	. .	E E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	314	314	0.950	. .	A E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	315	315	1.345	. .	A E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	316	316	1.383	. .	Q E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	317	317	1.352	. .	Y E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	318	318	1.273	. .	T E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	319	319	1.218	. .	G E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	320	320	1.369	. .	G E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	321	321	1.310	. .	E E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	322	322	1.509	. .	R E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	323	323	1.654	. .	H E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	324	324	1.668	. .	D E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	325	325	1.574	. .	H E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	326	326	1.451	. .	E E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	327	327	1.269	. .	D E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	328	328	1.098	. .	R E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	329	329	0.973	. .	P E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	330	330	1.094	. .	K E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	331	331	1.194	. .	V E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	332	332	1.008	. .	M E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	333	333	1.104	. .	G E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	334	334	1.107	. .	T E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	335	335	1.322	. .	K E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	336	336	1.510	. .	P E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	337	337	1.912	. .	D E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	338	338	1.999	. .	M E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	339	339	1.560	. .	D E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	340	340	0.965	. .	P E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	341	341	0.741	. .	E E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	354	354	0.599	. .	D E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	355	355	0.716	. .	R E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	356	356	1.029	. .	K E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	357	357	0.926	. .	M E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	358	358	0.832	. .	T E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	359	359	0.542	. .	K E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	360	360	0.556	. .	D E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	380	380	0.492	. .	R E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	381	381	0.648	. .	C E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	382	382	0.835	. .	G E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	383	383	0.692	. .	A E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	384	384	0.885	. .	P E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	385	385	1.026	. .	D E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	386	386	1.168	. .	E E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	387	387	1.081	. .	M E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	388	388	1.029	. .	H E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	389	389	0.567	. .	E E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	398	398	0.384	. .	S E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	399	399	0.408	. .	P E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	400	400	0.586	. .	Y E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	401	401	0.603	. .	Q E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	410	410	0.444	. .	A E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	411	411	0.977	. .	K E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	412	412	1.096	. .	A E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	413	413	1.327	. .	E E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	414	414	1.037	. .	P E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	415	415	0.973	. .	Q E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	416	416	0.583	. .	A E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	432	432	0.408	. .	K E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	433	433	0.740	. .	A E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	434	434	0.743	. .	S E
QUERY	BEIPRED-1.0B	EPITOPE	435	435	0.576	. .	V E

```

QUERY          BEPIPRE-1.0B EPITOPE          473  473  0.350  . .  D|E
QUERY          BEPIPRE-1.0B EPITOPE          475  475  0.549  . .  D|E
QUERY          BEPIPRE-1.0B EPITOPE          476  476  0.709  . .  S|E
QUERY          BEPIPRE-1.0B EPITOPE          477  477  0.982  . .  T|E
QUERY          BEPIPRE-1.0B EPITOPE          478  478  0.687  . .  L|E
QUERY          BEPIPRE-1.0B EPITOPE          479  479  0.638  . .  A|E
QUERY          BEPIPRE-1.0B EPITOPE          480  480  0.407  . .  T|E
QUERY          BEPIPRE-1.0B EPITOPE          510  510  0.400  . .  S|E
QUERY          BEPIPRE-1.0B EPITOPE          511  511  0.488  . .  L|E
QUERY          BEPIPRE-1.0B EPITOPE          512  512  0.429  . .  Y|E
# -----

```

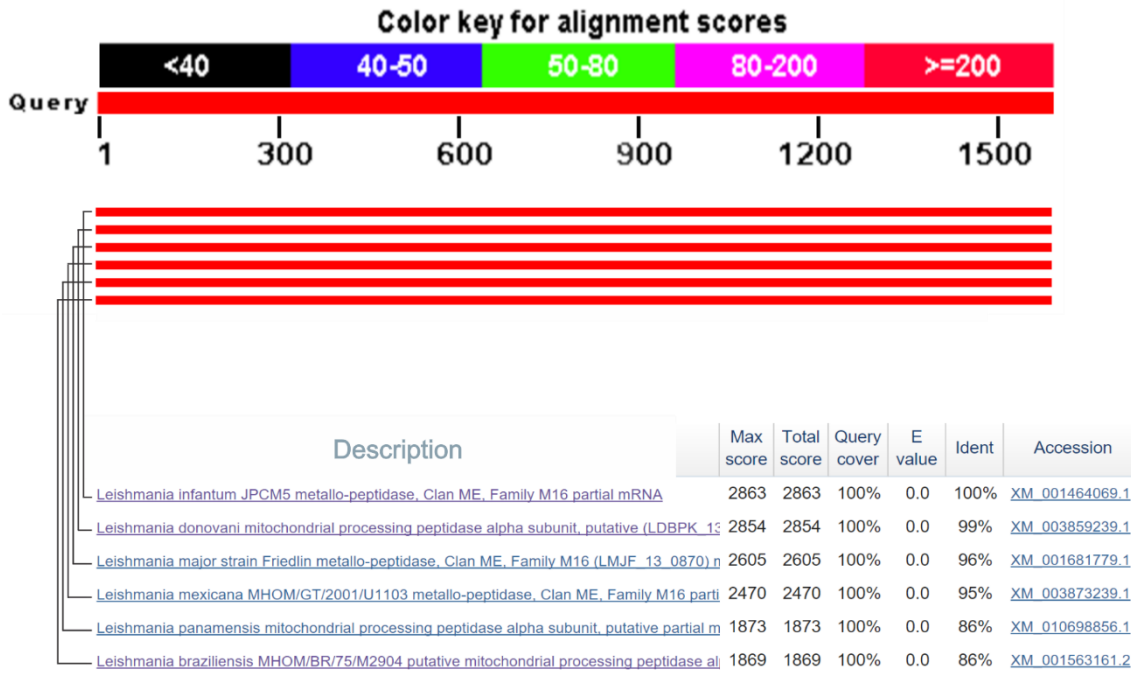
Apêndice B: Proteínas idênticas encontradas no banco de dados do NCBI

Source	CDC Region in Nucleotide	Protein	Name	Organism	Strain	Superkingdom
ReqSeq	NC_018240.1:276214-277800 (-)	XP_003859287.1	mitochondrial processing peptidase alpha subunit, putative [Leishmania donovani]	Leishmania donovani	BPK282A1	Eukaryota
ReqSeq	XM_003859239.1:1-1587 (+)	XP_003859287.1	mitochondrial processing peptidase alpha subunit, putative [Leishmania donovani]	Leishmania donovani	BPK282A1	Eukaryota
ReqSeq	NC_009397.2:273558-275144 (-)	XP_001464106.1	metallo-peptidase, Clan ME, Family M16 [Leishmania infantum JPCM5]	Leishmania infantum JPCM5	JPCM5	Eukaryota
ReqSeq	XM_001464069.1:1-1587 (+)	XP_001464106.1	metallo-peptidase, Clan ME, Family M16 [Leishmania infantum JPCM5]	Leishmania infantum JPCM5	JPCM5	Eukaryota
INSDC	FR799600.2:276214-277800 (-)	CBZ32575.1	mitochondrial processing peptidase alpha subunit, putative [Leishmania donovani]	Leishmania donovani	BPK282A1	Eukaryota
INSDC	FR796445.1:273558-275144 (-)	CAM66482.1	metallo-peptidase, Clan ME, Family M16 [Leishmania infantum JPCM5]	Leishmania infantum JPCM5	JPCM5	Eukaryota

Apêndice C: Enzimas que atuam cortando o gene LDBPK_130760 (código de ref XM_001464069.1) Dados NebCutter.

Specificity	Cuts	Specificity	Cuts
AatII	G _↓ ACGT C	FspEI	CC(N) ₁₂ NNNN _↓
AccI	GT MK _↓ AC	FspI	TGC _↓ GCA
Acil	C CG _↓ C	Haell	R _↓ GCGC Y
AfeI	AGC _↓ GCT	HaellI	GG _↓ CC
AhdI	GACNN _↓ N NNGTC	Hgal	GACGC(N) ₅ (N) ₅ _↓
AluI	AG _↓ CT	Hhal	G _↓ CG C
AlwNI	CAG _↓ NNN CTG	HinP1I	G CG _↓ C
ApeKI	G CWG _↓ C	HincII	GTY _↓ RAC
Avall	G GWC _↓ C	Hinfl	G ANT _↓ C
BaeGI	G _↓ KGCM C	HpaII	C CG _↓ G
BanI	G GYRC _↓ C	HphI	GGTGA(N) ₇ _↓ N
BanII	G _↓ RGCY C	Hpy166II	GTN _↓ NAC
BbvI	GCAGC(N) ₈ NNNN _↓	Hpy188I	TC _↓ N GA
BccI	CCATC NNNN _↓ N _↓	Hpy188III	TC NN _↓ GA
BceAI	ACGGC(N) ₁₂ NN _↓	Hpy99I	_↓ CGWCG
BcgI	_↓ NN (N) ₁₀ CGA(N) ₆ TGC(N) ₁₀ _↓ NN	HpyAV	CCTTC(N) ₅ _↓ N
BcoDI	GTCTCN NNNN _↓	HpyCH4III	AC _↓ N GT
Bfal	C TA _↓ G	HpyCH4IV	A CG _↓ T
BfuAI	ACCTGC NNNN _↓ NNNN _↓	HpyCH4V	TG _↓ CA
BfuCI	_↓ GATC _↓	KasI	G GCGC _↓ C
BglI	GCCN _↓ NNN NGGC	LpnPI	CCDG(N) ₁₀ NNNN _↓
Bmri	ACTGGG NNNN _↓ N _↓	Mbol	GATC _↓
Bpml	CTGGAG(N) ₁₄ _↓ NN	MbolI	GAAGA(N) ₇ _↓ N
BsaBI	GATNN _↓ NNATC	MluCI	_↓ AATT _↓
BsaHI	GR CG _↓ YC	MlyI	GAGTC(N) ₅ _↓
BsaJI	C CNNG _↓ G	MnII	CCTC(N) ₆ _↓ N
BsaXI	_↓ NNN (N) ₉ AC(N) ₅ CTCC(N) ₇ _↓ NNN	MspA1I	CMG _↓ CKG
BseRI	GAGGAG(N) ₈ _↓ NN	MspI	C CG _↓ G
BseYI	C CCAG _↓ C	MspJI	CNNR(N) ₉ NNNN _↓
BsgI	GTGCAG(N) ₁₄ _↓ NN	MwoI	GCNN _↓ NNN NNGC
BsiEI	CG _↓ RY CG	NaeI	GCC _↓ GGC
BsiHKA1	G _↓ WGCW C	NarI	GG CG _↓ CC
BsiWI	C GTAC _↓ G	NciI	CC S _↓ GG
BsII	CCNN _↓ NNN NNGG	NgoMIV	G CCGG _↓ C
BsmAI	GTCTCN NNNN _↓	NlaIII	_↓ CATG
BsmBI	CGTCTCN NNNN _↓	NlaIV	GGN _↓ NCC
BsmI	GAATG _↓ CN	NmeAIII	GCCGAG(N) ₁₉ _↓ NN
Bsp1286I	G _↓ DGCH C	NotI	GC GGCC _↓ GC
BspCNI	CTCAG(N) ₇ _↓ NN	Nrul	TCG _↓ CGA
BspMI	ACCTGC NNNN _↓ NNNN _↓	Nspl	R _↓ CATG Y
BspQI	GCTCTTCN NNN _↓	PleI	GAGTC NNNN _↓ N _↓
BsrBI	CCG _↓ CTC	PluTI	G _↓ GCGC C
BsrDI	GCAATG _↓ NN	PspGI	_↓ CCWGG _↓
BsrFI	R CCGG _↓ Y	PstI	C _↓ TGCA G
BsrI	ACTG _↓ GN	PvuII	CAG _↓ CTG
BssHII	G CGCG _↓ C	RsaI	GT _↓ AC
BssSI	C ACGA _↓ G	SacI	G _↓ AGCT C

BstAPI	GCAN _↓ NNN NTGC	Sall	G TCGA _↓ C
BstNI	CC W _↓ GG	SapI	GCTCTTCN NNN _↓
BstUI	CG _↓ CG	Sau3AI	GATC _↓
BstXI	CCAN _↓ NNNN NTGG	Sau96I	G GNC _↓ C
BtgI	C CRYG _↓ G	ScrFI	CC N _↓ GG
BtgZI	GCGATG(N) ₁₀ NNNN _↓	SexAI	A CCWGG _↓ T
BtsCI	GGATG _↓ NN	SfaNI	GCATC(N) ₅ NNNN _↓
BtsI	GCAGTG _↓ NN	Sfcl	C TRYA _↓ G
BtsIMutI	CAGTG _↓ NN	SfoI	GGC _↓ GCC
Cac8I	GCN _↓ NGC	SgrAI	CR CCGG _↓ YG
CspCI	_↓ NN (N) ₁₁ CAA(N) ₅ GTGG(N) ₁₀ _↓ NN	SphI	G _↓ CATG C
CviAll	C AT _↓ G	StuI	AGG _↓ CCT
CviKI-1	RG _↓ CY	StyD4I	CCNGG _↓
CviQI	G TA _↓ C	StyI	C CWWG _↓ G
DdeI	C TNA _↓ G	TaqI	T CG _↓ A
DpnI	GA _↓ TC	TfiI	G AWT _↓ C
DpnII	GATC _↓	TseI	G CWG _↓ C
DrdI	GACNN _↓ NN NNGTC	Tsp45I	GTSAC _↓
EaeI	Y GGCC _↓ R	TspRI	_↓ NNCASTGNN
EagI	C _↓ GGCC _↓ G	XcmI	CCANNNN _↓ N NNNNTGG
EarI	CTCTTCN NNN _↓	ZraI	GAC _↓ GTC
Ecil	GGCGGA(N) ₉ _↓ NN		
Eco53kl	GAG _↓ CTC		
EcoP15I	CAGCAG(N) ₂₅ NN _↓		
FatI	CATG _↓		
FauI	CCCGCNNNN _↓ NN _↓		
Fnu4HI	GC N _↓ GC		
FokI	GGATG(N) ₉ NNNN _↓		



Apêndice D - Sequências com similaridade ao gene LDBPK_130760 (ref XM_001464069.1): Comparação do gene que codifica a proteína XP_001464106.1 com parasitos da família Trypanosomatidae.

Localization prediction in plant

== Summary of subcellular localization prediction using LOctree ==

Protein Identifier	Predicted Localization	Reliability Index
Intermediate localization prediction	Intermediate localization prediction	Reliability index of intermediate localization predictions
query Chloroplast	6	Not Secreted,Not Nuclear,Mitochondria or Chloroplast,Chloroplast
	5,5,8,8	

Localization prediction in animal

== Summary of subcellular localization prediction using LOctree ==

Protein Identifier	Predicted Localization	Reliability Index
Intermediate localization prediction	Intermediate localization prediction	Reliability index of intermediate localization predictions
query Mitochondria	6	Not Secreted,Not Nuclear,Mitochondria
	2,7,10	

Localization prediction in prokaryotes

== Summary of subcellular localization prediction using LOctree ==

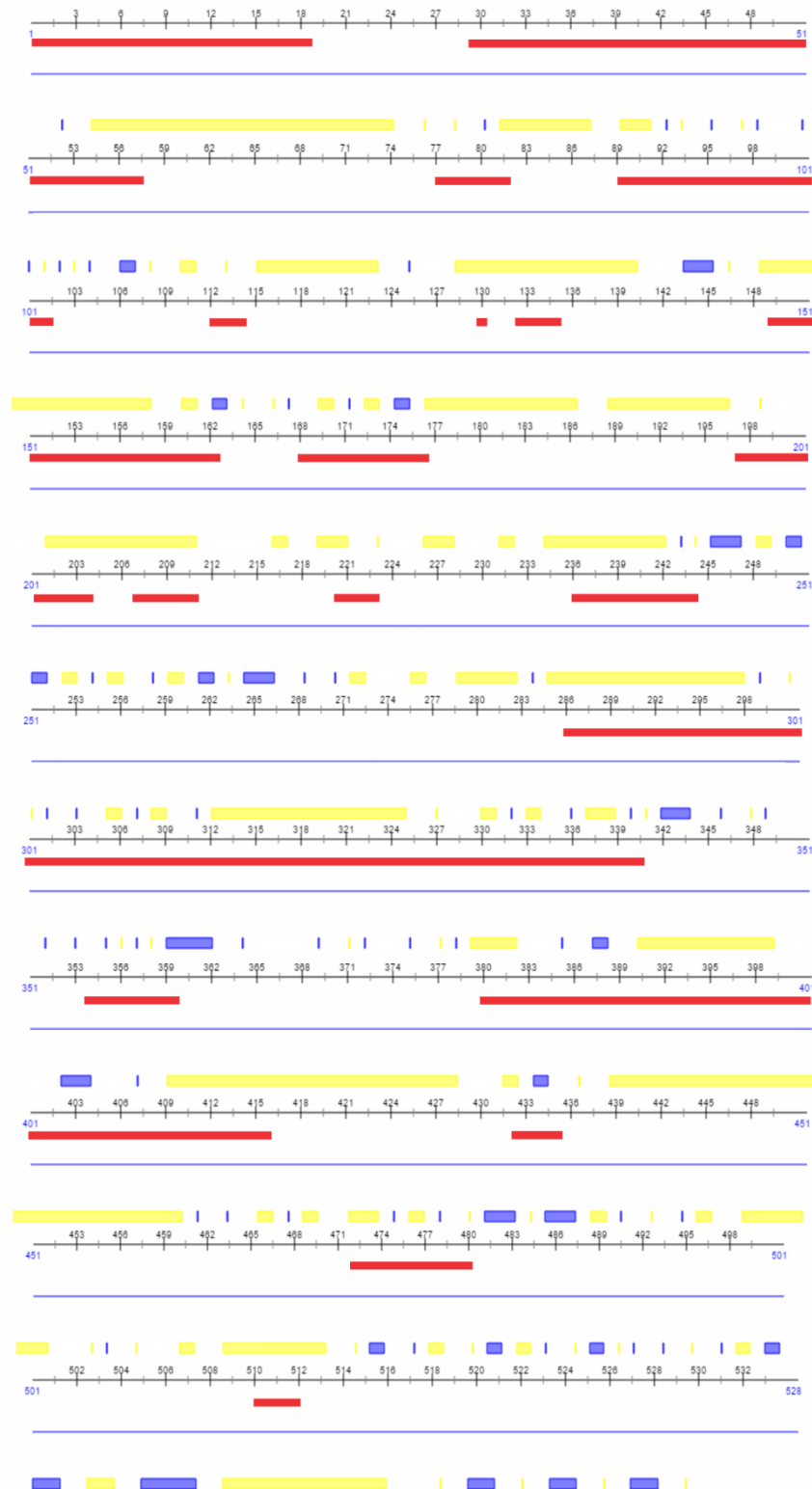
Protein Identifier	Predicted Localization	Reliability Index
Intermediate localization prediction	Intermediate localization prediction	Reliability index of intermediate localization predictions
query Cytoplasmic	2	Cytoplasmic
		2

Prediction of Nuclear Localization Signals (NLS)

This protein does not contain a nuclear localization signal

Apêndice E: Predição da localização subcelular da proteína pela ferramenta PredictionProtein. Os dados sugeridos pelo servidor possuem 74% de precisão para organismos eucariotos que não sejam plantas, 70% para plantas e 84% para organismos procariotos.

Correlação Pontos de Acesso e Epitopos Lineares de Celulas B



Apêndice F: Correlação dos dados do PredictProtein com BepiPred. Barra em azuis regiões expostas da proteína com acesso ao solvente; Barras em Amarelo, regiões da proteína sem acesso ao solvente; Barras em vermelho, epitopos sugeridos pelos programas de predição; área não marcada entre as cores amarelo e azul correspondem a pontos de acesso intermediários. Ponto de corte padrão BepiPred de 0.35 e; Dados PredictionProtein com Porcentagem de acerto de 72%.

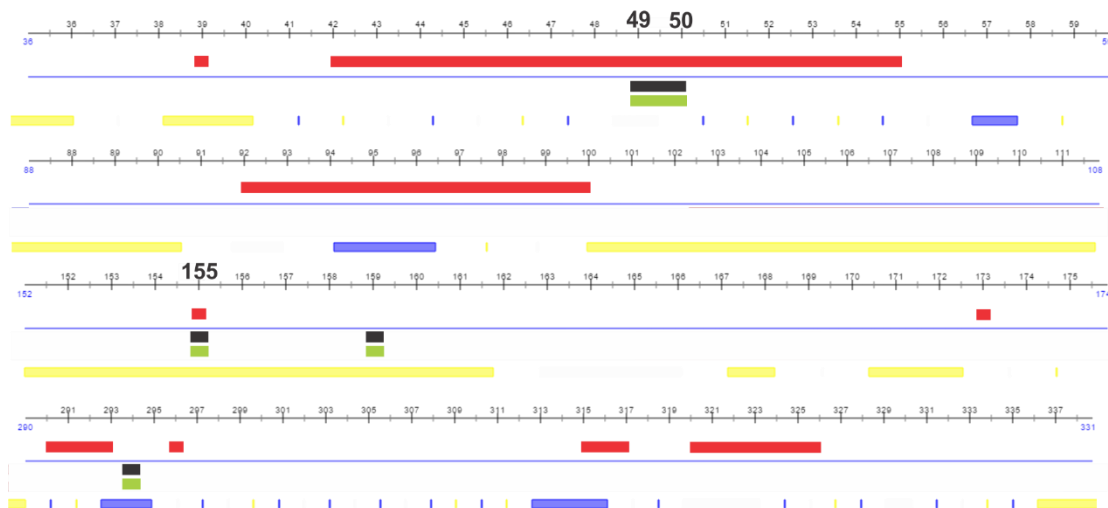
A

```

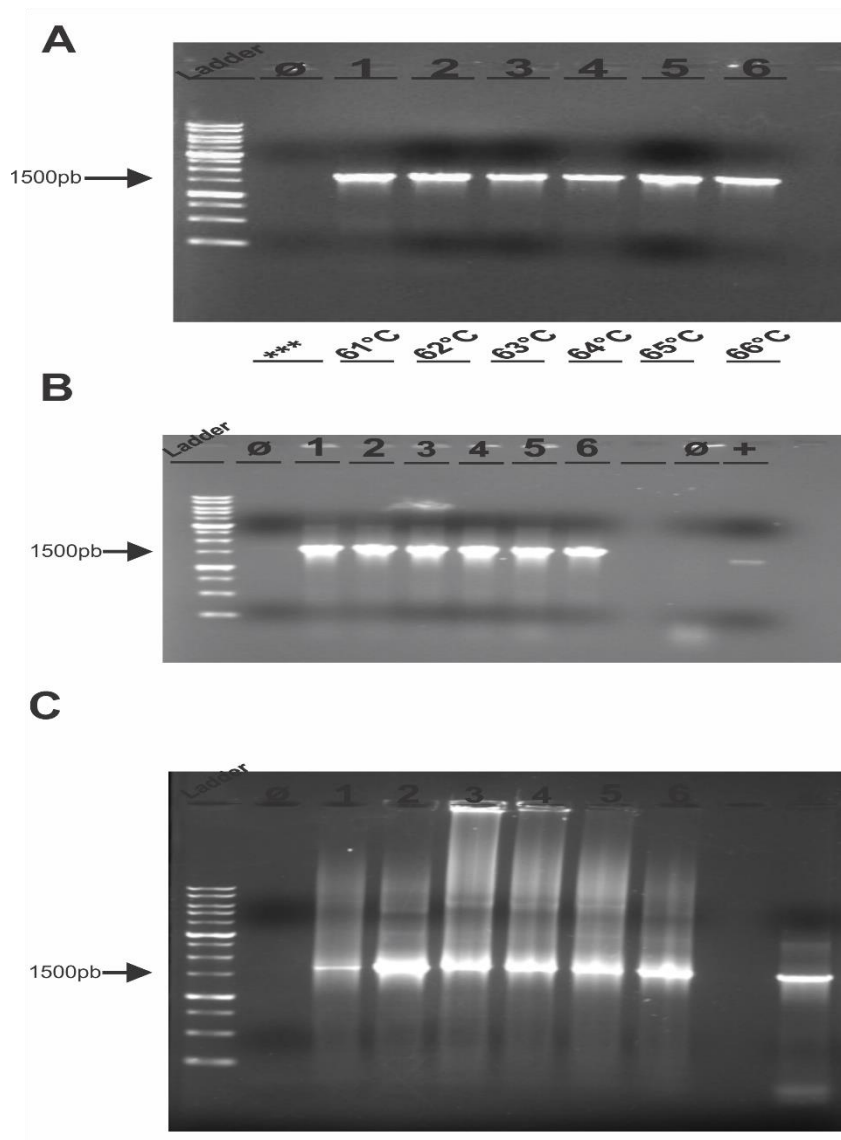
-----
SeqName      Residue  O-GlcNAc  Potential  Thresh.  Thresh.  NetPhos
YinOYang?           result  (o-glcnac)  (1)      (2)      potential
                                           (Thresh=0.5)
-----
seq.1        14  T    +    0.5346   0.4818   0.5998
seq.1        35  T    ++   0.5847   0.4396   0.5429
seq.1        49  S*   ++   0.4547   0.3473   0.4186   0.773   *
seq.1        50  S    ++   0.5278   0.3670   0.4451
seq.1        82  S    +    0.5100   0.4853   0.6045
seq.1       101  T    +    0.5072   0.4479   0.5541
seq.1       111  S    +    0.5149   0.4692   0.5828
seq.1       155  S    +    0.4342   0.3925   0.4795
seq.1       159  T    +++   0.6899   0.4363   0.5385
seq.1       160  S*   ++   0.5937   0.4356   0.5375   0.689   *
seq.1       161  S    +    0.5000   0.4266   0.5254
seq.1       262  S    +    0.5413   0.4648   0.5769
seq.1       273  S*   ++   0.6474   0.5048   0.6308   0.559   *
seq.1       294  S*   +    0.4580   0.4406   0.5443   0.943   *
seq.1       398  S    +    0.4846   0.4753   0.5910
seq.1       422  T    +    0.5052   0.4964   0.6195
seq.1       434  S*   +++   0.6492   0.4386   0.5416   0.688   *
seq.1       474  S    +    0.4444   0.4286   0.5281
-----

```

B



Apêndice G: Correlação dos dados obtidos pela análise *in silico*. **A** Correlação entre os dados obtidos pelos servidores NetPhos e YinoYang. **B** Correlação dos dados da análise *in silico*. Pontos de acesso ao solvente dos resíduos expostos ao solvente da proteína em Azul; pontos de acesso enterrados ao solvente da proteína em Amarelo; área não marcada entre as cores amarelo e azul correspondem a pontos de acesso intermediários; epitopos lineares para células B sugeridos em vermelho; possíveis sítios de fosforilação em verde e; possíveis glicosítios sugeridos em preto. Ponto de corte padrão BepiPred de 0.35 e; Ponto de corte padrão NetPhos de 0.5 e; Dados PredictionProtein com Porcentagem de acerto de 72%.



Apêndice H: Padronização das PCRs. **A** Reações de PCR em diferentes temperaturas de anelamento usando a reação II. Controle Negativo (\emptyset); produtos 1-6 e; Ladder de 1Kb Kasvi. Seta preta indicando banda de altura de 1500pb. **B.** Análise eletroforética da bactéria transformada. **C.** Análise molecular por PCR do DNA plasmidial extraído. Ladder 1Kb kasvi, Controle Negativo (\emptyset), clones 01-06, Controle Positivo (+) DNA genômico de *Leishmania chagasi*. Seta preta indicando banda de 1500pb.

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

Reverso -----
XM_001464069.1 ATGTTCCGCGTGTAGTCGCTCCGGCGCCGGTGGCGGCCACCGCAGCCTGCGCTGGGCAG
Padrao ATGTTCCGCGTGTAGTCGCTCCGGCGCCGGTGGCGGCCACCGCAGCCTGCGCTGGGCAG

Reverso -----
XM_001464069.1 GCTCGCAGCATCTACGAGTACAAGTTCGGTCAGACCCCCCTCACCAACCGTTTGGCGGA
Padrao GCTCGCAGCATCTACGAGTACAAGTTCGGTCAGACCCCCCTCACCAACCGTTTGGCGGA

Reverso -----
XM_001464069.1 ACCTCTCGCCTGCCGCTGGCCCCCTCGTCGAAGCCTGCCCGGTTGCTGCCGGGAAGGTG
Padrao ACCTCTCGCCTGCCGCTGGCCCCCTCGTCGAAGCCTGCCCGGTTGCTGCCGGGAAGGTG

Reverso -----
XM_001464069.1 GAGATCACGAAGCTGCACAACGGCGCGCGGTTCATCACGCACAACCTCGGTGGACCGTCCG
Padrao GAGATCACGAAGCTGCACAACGGCGCGCGGTTCATCACGCACAACCTCGGTGGACCGTCCG

Reverso -----
XM_001464069.1 GTGTCCGTTGGTGCCTACATACTCGCCGGCCCCGCTACGACCCACCGAGCGCGCCGGGC
Padrao GTGTCCGTTGGTGCCTACATACTCGCCGGCCCCGCTACGACCCACCGAGCGCGCCGGGC

Reverso -----
XM_001464069.1 ACGGGAGCCATGATGCACCTTGCCCTGACGACGAGCAACTACAATAATTGCTGTTCCAG
Padrao ACGGGAGCCATGATGCACCTTGCCCTGACGACGAGCAACTACAATAATTGCTGTTCCAG

Reverso -----
XM_001464069.1 CTTGACCGCAACATTGCGAGTGTGGCGCCGCCAGTCGCCTTCGAGAAGCACAAGCAC
Padrao CTTGACCGCAACATTGCGAGTGTGGCGCCGCCAGTCGCCTTCGAGAAGCACAAGCAC

Reverso -----
XM_001464069.1 TACATCGGCATTTCGCATCGACGCCCGCGCGACAAGTGGAGAGCGCCGCGCCGACGTCA
Padrao TACATCGGCATTTCGCATCGACGCCCGCGCGACAAGTGGAGAGCGCCGCGCCGACGTCA

Reverso -----
XM_001464069.1 TCGCTTTCACAGCGCGGCAGCTGCAGAACCAGAAGCAAGCGGAGCAGAGTTCTCGTTG
Padrao TCGCTTTCACAGCGCGGCAGCTGCAGAACCAGAAGCAAGCGGAGCAGAGTTCTCGTTG

Reverso -----
XM_001464069.1 AATCTGGTGCAGGACAACATCTTTACCTGCATCGCCGCGCCCGCTTCCACGAGCCGGAT
Padrao AATCTGGTGCAGGACAACATCTTTACCTGCATCGCCGCGCCCGCTTCCACGAGCCGGAT

Reverso -----
XM_001464069.1 GTGGAGCGCTTCCGTGACACCATTGACAACCAGGTCGAGGAGCTCCGCTGGCAATGCCCA
Padrao GTGGAGCGCTTCCGTGACACCATTGACAACCAGGTCGAGGAGCTCCGCTGGCAATGCCCA

Reverso -----AGACGGTTGCCTTCTACCTTGA--GCCGTGGCA
XM_001464069.1 GCCGAGTACGCGAAGCAGATGCTGGAGACGGTCGCCTTCTACCGTGAGCCGCTCGGCAAC
Padrao GCCGAGTACGCGAAGCAGATGCTGGAGACGGTCGCCTTCTACCGTGAGCCGCTCGGCAAC
***** ***** ** **

Reverso -----
XM_001464069.1 CCTCGCTTCGTGCCGGCGATGAGCAACGGCATCATTtCGAGCAGCGTACTGCTGGAGCAG
Padrao CCTCGCTTCGTGCCGGCGATGAGCAACGGCATCATTTCGAGCAGCGTACTGCTGGAGCAG
*****

Reverso -----
XM_001464069.1 TACAGCC-GTACGTCGTGCCGTGCGCGTTCGTCGTCCTCCGGCGTCAACGTCGATCAGCC
Padrao TACAGCCGCTACGTCGTGCCGTGCGCGTTCGTCGTCCTCCGGCGTCAACGTCGATCAGCC
TACAGCCGCTACGTCGTGCCGTGCGCGTTCGTCGTCCTCCGGCGTCAACGTCGATCAGCC
*****

Reverso -----
XM_001464069.1 GCGCTGATTGCCGAGTACGAGAACACCCCGTTCACACTCCGCTCGGCACCGCACCAC
Padrao GCGCTGATTGCCGAGTACGAGAACACCCCGTTCACACTCCGCTCGGCACCGCACCAC
GCGCTGATTGCCGAGTACGAGAACACCCCGTTCACACTCCG-----

```

Apêndice I: Alinhamento múltiplo do sequenciamento do clone 03 com dados do GenBank. Alinhamento entre a sequência do clone 03 com sequência do gene XP_001464106.1. Sequenciamento com *primer* padrão T7 (Padrão), sequenciamento com *primer* reverso SP6 (Reverso) e referência do banco de dado GenBank (XM.001464106.1). *** Áreas em comum entre todas as sequencias.

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

Reverso -----
XM_001464069.1  ATGTTCCGCCGTGTAGTCGCTCCGGCGCCGGTGGCGGCCACCGCAGCCTGCGCTGGGCAG
Padrao          ---TTCCGCCGTGTAGTCGCTCCGGCGCCGGTGGCGGCCACCGCAGCCTGCGCTGGGCAG

Reverso -----
XM_001464069.1  GCTCGCAGCATCTACGAGTACAAGTTCGGTTCAGACCCCCCTCACCAACCGTTTGGCGGA
Padrao          GCTCGCAGCATCTACGAGTACAAGTTCGGTTCAGACCCCCCTCACCAACCGTTTGGCGGA

Reverso -----
XM_001464069.1  ACCTCTCGCCTGCCGCTGGCCCTCGTCGAAGCCTGCCCGGTTGCTGCCGGGAAGGTG
Padrao          ACCTCTCGCCTGCCGCTGGCCCTCGTCGAAGCCTGCCCGGTTGCTGCCGGGAAGGTG

Reverso -----
XM_001464069.1  GAGATCACGAAGCTGCACAACGGCGCGCGTTCATCACGCACAACCTCGGTGGACCGTCG
Padrao          GAGATCACGAAGCTGCACAACGGCGCGCGTTCATCACGCACAACCTCGGTGGACCGTCG

Reverso -----
XM_001464069.1  GTGTCCGTTGGTGCCTACATACTCGCCGGCCCCGCCTACGACCCACCGAGCGCGCCGGGC
Padrao          GTGTCCGTTGGTGCCTACATACTCGCCGGCCCCGCCTACGACCCACCGAGCGCGCCGGGC

Reverso -----
XM_001464069.1  ACGGGAGCCATGATGCACCTTGCCCTGACGACGAGCAACTACAATAATTCGCTGTTCCAG
Padrao          ACGGGAGCCATGATGCACCTTGCCCTGACGACGAGCAACTACAATAATTCGCTGTTCCAG

Reverso -----
XM_001464069.1  CTTGACCGCAACATTCGCAGTGTGCGGCGCCGCGCCAGTCGCAC TTCGAGAAGCACAAGCAC
Padrao          CTTGACCGCAACATTCGCAGTGTGCGGCGCCGCGCC-----

Reverso -----
XM_001464069.1  TACATCGGCATTTCGCATCGACGCCGCGCCGACAAGTGGAGAGCGCCGCGCCGACGTC
Padrao          -----

Reverso -----
XM_001464069.1  TCGCTTTCACAGCGGCGGCGAGTGCAGAACGAGAAGCAAGCGGAGCAGCAGTTCCTCGTTG
Padrao          -----

Reverso -----
XM_001464069.1  AATCTGGTGCAGGACAACATCTTTACCTGCATCGCCGCGCCCGCTTCCACGAGCCGGAT
Padrao          -----

Reverso -----
XM_001464069.1  GTGGAGCGCTTCCGTGACACCATTTGACAACCAGGTCGAGGAGCTCCGCTGGCAATGCCCA
Padrao          -----

Reverso -----
XM_001464069.1  GCCGAGTACGCGAAGCAGATGCTGGAGACGGTCGCCTTCTACCGTGAGCCGCTCGGGCAAC
Padrao          -----

Reverso -----
XM_001464069.1  CCTCGCTTCGTGCCGGCGATGAGCAACGGCATCATTTGAGCAGCGTACTGCTGGAGCAG
Padrao          -----


Reverso -----
XM_001464069.1  TACAGCCGCTACGTCGTGCCGTCGCGCGTTCGTCGTCCTCCGGCGTCAACGTCGATCAGCC
Padrao          -----

Reverso -----
XM_001464069.1  GCGCTGATTGCCGAGTACGAGAACACCCCGTTCCCACTCCGCTCGGCACCGCACAC
Padrao          -----


```

Apêndice J: Alinhamento múltiplo do clone 5 sequenciado com dados do GenBank. Alinhamento entre do clone 05 (primers LC01/02) com sequência do gene XP_001464106.1. Sequenciamento com *primer* padrão T7 (Padrão), sequenciamento com *primer* reverso SP6 (Reverso) e referência do banco de dado GenBank (XM.001464106.1).

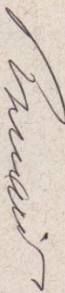
9. ANEXOS



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 12 de setembro de 2014.


DECLARAÇÃO

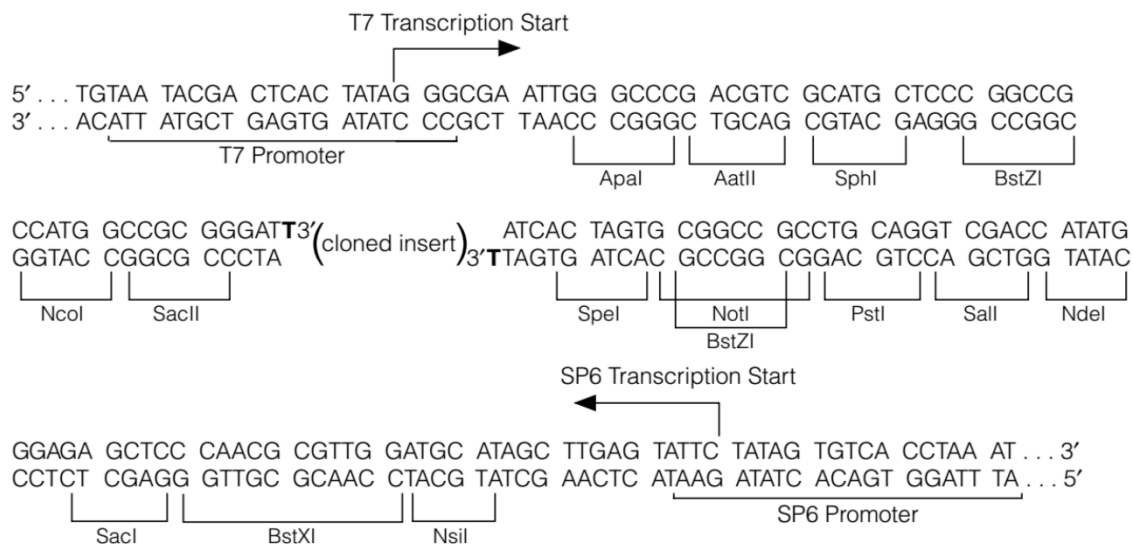
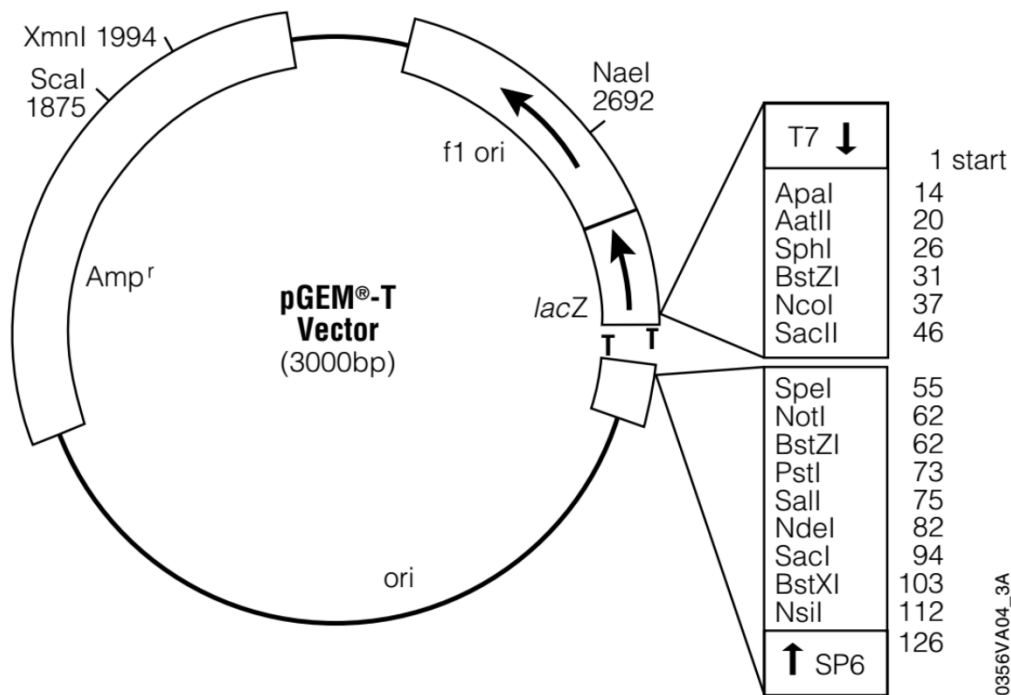
Declaramos que o projeto intitulado "**VALIDAÇÃO DE NOVOS ANTÍGENOS PARA O DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DA ESQUISTOSSOMOSE E LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA E HUMANA**", UnBDoC n.º 1066668/2014, sob responsabilidade do Professor Vicente de Paulo Martins foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.


Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior
Coordenador da CEUA

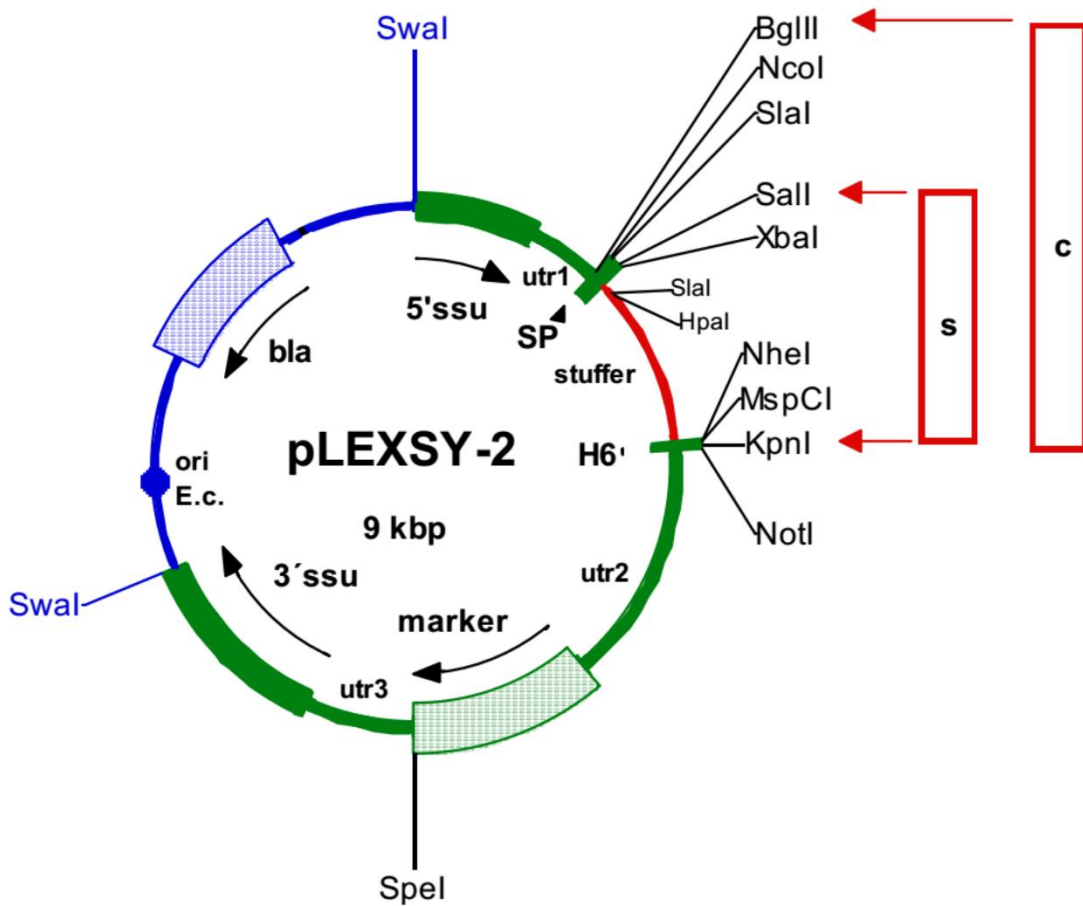


*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

Anexo A: Permissão do Comissão de Ética no Uso Animal.



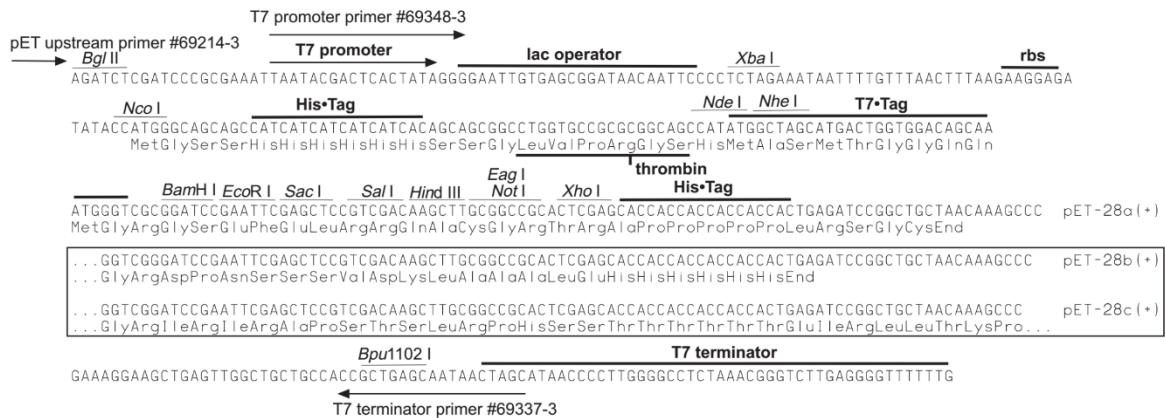
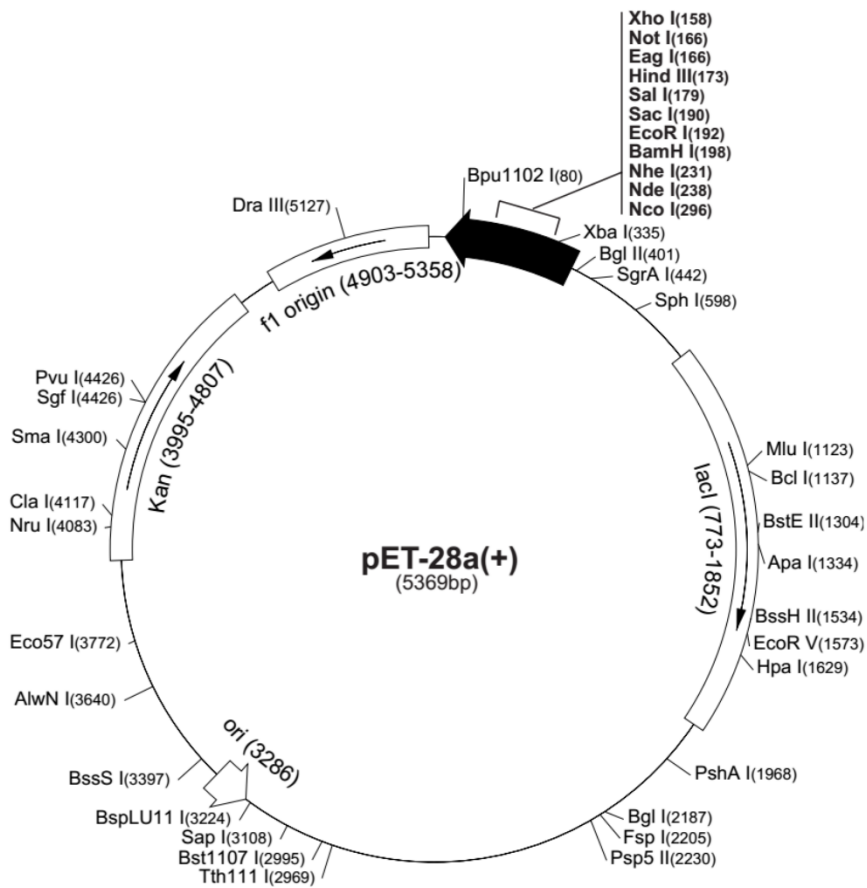
Anexo B: Mapa de restrição do sítio de clonagem do vetor pGEM-T (Promega).



BglIII **NcoI** **SmaI** **signal peptide** **SmaI** **SPCS** **XbaI**
 AGA TCT GCC ATG GCC TCG AGG CTC GTC CGT GTG CTG GCC GCC GCC ATG CTG GTT GCA GCG GCC GTG TCG **GTC GAC** GCT GGC GCC TCT CTA GAC
 TCT AGA CGG TAC CGG AGC TCC GAG CAG GCA CAC GAC CGG CGG CGG TAC BAC CAA CGT CGC CGG CAC AGC **CAG CTG** CGA CCG CGG AGA GAT CTG
 ▶ *Met Ala Ser Arg Leu Val Arg Val Leu Ala Ala Ala Met Leu Val Ala Ala Ala Val Ser Val Asp Ala Gly Ala Ser Leu Asp*

stuffer **NheI** **AflII** **KpnI** **His6 stretch** **NotI**

Anexo C: Mapa de restrição do sítio de clonagem do vetor pLEXSY-2 (Jena Bioscience).



pET-28a-c(+) cloning/expression region

Anexo D: Mapa de restrição do sítio de clonagem do vetor pET-28^a (+) (NovaGen).