

**Universidade de Brasília**  
**Faculdade de Medicina**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

**Gisele Lorranna Silva Santos**

**Identificação e Caracterização de Novos Antígenos Para o  
Diagnóstico Sorológico da Leishmaniose Visceral Canina**

**Brasília**

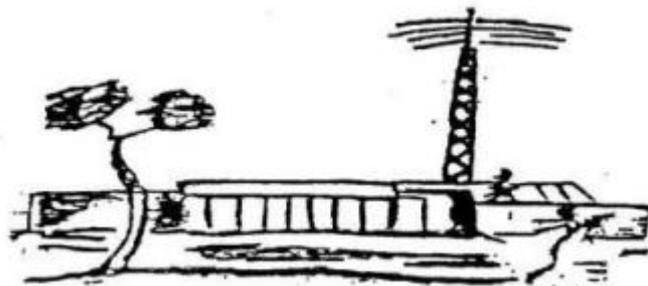
**2017**

# **Identificação e Caracterização de Novos Antígenos Para o Diagnóstico Sorológico da Leishmaniose Visceral Canina**

**Gisele Lorranna Silva Santos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília para a obtenção do título de mestre em Medicina Tropical, na área de concentração: Biologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Dr. Vicente de Paulo Martins



**Brasília**

**2017**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

SSA237i Silva Santos, Gisele Lorranna  
Identificação e Caracterização de Novos Antígenos Para o  
Diagnóstico Sorológico da Leishmaniose Visceral Canina /  
Gisele Lorranna Silva Santos; orientador Dr. Vicente de  
Paulo Martins. -- Brasília, 2017.  
122 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Medicina Tropical) --  
Universidade de Brasília, 2017.

1. Leishmaniose Visceral . 2. Diagnóstico Sorológico. 3.  
Proteínas. 4. ADF/Cofilina. 5. RAB 1 - GTPase. I. Martins,  
Dr. Vicente de Paulo , orient. II. Título.

## **Identificação e Caracterização de Novos Antígenos Para o Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Medicina Tropical, na área de concentração: Biologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias em 31 de julho de 2017 à respectiva banca examinadora:

Prof. Dr. Vicente de Paulo Martins

(Presidente – Membro titular)

Profa. Dra. Cecília Beatriz Fiuza Favali – Universidade de Brasília

(Membro titular)

Prof. Dr. Juliano Simões de Toledo – Universidade Federal de Minas Gerais

(Membro titular)

Profa. Dra. Adriana Monte Cassiano Canavaci – Universidade de Brasília

(Membro Suplente)

## DEDICATÓRIA

Há pessoas que marcam nossa vida para sempre. Um por nos ajudar a construir sonhos, outros porque nos apresentam projetos e há aqueles que nos desafiam. Dedico este trabalho aos meus filhos que são os principais arquitetos dos meus sonhos. Aos meus pais que foram os principais engenheiros dos meus projetos. E aos professores que me desafiaram.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao Altíssimo, pois o meu socorro vem do Senhor, criador do céu e da terra. Pois tem sido o meu refúgio e minha fortaleza que me cobristes com tuas penas e debaixo de tuas assas me protegestes. Por me permitir estar neste mundo, por me amar desde o ventre da minha mãe.

Aos meus pais Vivaldo de Jesus dos Santos (*in memoriam*) e Josefa Maristela que me amaram, acreditaram em mim e me encorajaram diante de todos os desafios desde os meus primeiros passos.

Aos meus tão amados filhos Carlos Gabriel Silva Santos de Oliveira e Jeferson Santos da Silva Junior que mais uma vez foram sacrificados com a minha ausência para que eu pudesse realizar mais um sonho.

Obrigada as tias Ivanilde, Irene, Iraídes, Irani, Mirian e a prima Jordana, que nos momentos dedicados ao meu estudo sempre me apoiaram e com carinho se preocuparam com meu futuro, meu sucesso e meu bem-estar.

Meus agradecimentos ao professor Dr. Vicente de Paulo Martins pela sabedoria, calma, e persistência durante a orientação deste trabalho. Exemplo de pessoa, com uma humanidade e integridade ímpar.

Nesta longa estrada houve pessoas que jamais esquecerei, que foram companheiras, amigas, e fundamentais para a execução deste trabalho. Aos meus amados amigos do LAMP: Luis, Laura, Alessandro, Rafaela, Ana Paula, Anderson e Herick. As professoras Dra. Adriana e Tatiana que foram colaboradoras nesta longa jornada.

## RESUMO

A leishmaniose visceral é uma doença negligenciada, endêmica na Ásia, África, Américas e na região do Mediterrâneo. Cerca de 1,5 a 2 milhões de novos casos ocorrem a cada ano no mundo, sendo que aproximadamente 350 milhões estão sob risco de adquirir a doença e esta é responsável por 70 mil mortes anuais. A evolução clínica depende principalmente da resposta imune do hospedeiro. O cão é considerado o principal reservatório urbano do agente *Leishmania infantum* que é transmitido pelo flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*. Várias proteínas de secreção clássica e de superfície da *Leishmania* foram testadas como potenciais antígenos. Por outro lado, algumas proteínas intracelulares são capazes de modular a resposta imune do hospedeiro por serem mais imunogênicas e terem sofrido menos pressão seletiva evolutivamente. Durante a infecção, estas moléculas são liberadas após a destruição de amastigotas intracelulares por macrófagos ativadas, mas, também podem ser excretadas por caminhos de secreção não-clássicos. Vários antígenos intracelulares, tais como proteínas de choque térmico, as proteínas ribossômicas e as histonas foram investigadas como possíveis vacinas contra diferentes espécies de *Leishmania* e como marcadores diagnósticos. As proteínas Rab1-GTPase e ADF/Cofilina foram surpreendentemente classificadas como potenciais fatores de virulência e moduladores da resposta imunológica, assim como as proteínas intracelulares mencionadas anteriormente. Desta forma, estudos adicionais que venham permitir melhorias nos métodos diagnósticos e que poderão favorecer a prevenção e o controle desta doença, representam uma perspectiva de melhoria da qualidade de vida da população, principalmente em áreas endêmicas. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial imunogênico das proteínas Rab1-GTPase e ADF/Cofilina, expressar e purificar as duas proteínas recombinantes e submetê-las a uma avaliação diagnóstica sorológica pelo método ELISA. A proteína Rab1-GTPase apresentou mais sítios possíveis para epítopos de células B em relação a ADF/Cofilina. No entanto, a ADF/Cofilina possui poucas regiões conservadas, quando

avaliadas pelo alinhamento múltiplo. O teste ELISA permitiu testá-las quanto à capacidade de serem reconhecidas por soro de cães infectados com LVC. Todavia, faz-se necessário aumentar o número de amostras e realizar novos testes que possibilitem determinar a sua sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e a acurácia como alvos diagnósticos da LVC em testes sorológicos.

## ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a neglected disease, endemic in Asia, Africa, the Americas and the Mediterranean region. Approximately 1.5 to 2 million new cases occur every year around the world, with approximately 350 million being at risk of acquiring the disease and accounting for 70,000 annual deaths. The clinical course depends mainly on the immune response of the host. The dog is considered the main urban reservoir of the agent *Leishmania infantum* which is transmitted by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. Several classical and surface secretory proteins of *Leishmania* were tested as potential antigens. On the other hand, some intracellular proteins are able to modulate the immune response of the host because they are more immunogenic and have suffered less selective pressure evolutionarily. During infection, these molecules are released after the destruction of intracellular amastigotes by activated macrophages, but they may also be excreted by non-classical secretory pathways. Several intracellular antigens, such as heat shock proteins, ribosomal proteins and histones were investigated as possible vaccines against different *Leishmania* species and as diagnostic markers. Rab1-GTPase and ADF/Cofilin proteins were surprisingly classified as potential virulence factors and modulators of the immune response, as well as the intracellular proteins mentioned above. In this way, additional studies that allow improvements in the diagnostic methods and that may favor the prevention and control of this disease represent a perspective of improving the quality of life of the population, especially in endemic areas. Thus, the objective of this study was to evaluate the immunogenic potential of the Rab1-GTPase and ADF/Cofilin proteins, to express and purify the two recombinant proteins and to submit them to a serological diagnostic evaluation by the ELISA method. The Rab1-GTPase protein showed more possible sites for B cell epitopes compared to ADF/Cofilin. However, ADF/Cofilin has few conserved regions when evaluated by multiple alignment. The ELISA test allowed them to be tested for serum recognition of LVC-infected dogs. However, it is necessary to increase the number of samples and perform new tests to

determine their sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and accuracy as LVC diagnostic targets in serological tests.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Endemicidade da leishmaniose visceral no mundo _____	19
<b>Figura 2</b> - Casos de leishmaniose visceral, de acordo com países com maior casos, Américas, 2001-2015. _____	20
<b>Figura 3</b> - Proporção de casos de leishmaniose visceral por faixa etária e País, nas Américas, em 2015 _____	21
<b>Figura 4</b> - Taxa de Leishmaniose visceral, nas Américas, em 2015 _____	22
<b>Figura 5</b> - Ciclo biológico da <i>Leishmania spp</i> _____	25
<b>Figura 6</b> - Metabolismo dos Macrófagos e crescimento intracelular de amastigotas da <i>Leishmania</i> _____	30
<b>Figura 7</b> - Formas amastigotas de <i>Leishmania</i> _____	34
<b>Figura 8</b> - Função das proteínas Rab _____	42
<b>Figura 9</b> - Delineamento experimental _____	45
<b>Figura 10</b> - Mapa do Vetor de Clonagem pGEM®-T Easy _____	54
<b>Figura 11</b> - Mapa do Vetor de Expressão pLexsy-neo2 _____	58
<b>Figura 12</b> - A Interação entre resíduos da cauda His6x e a matriz Ni-NTA _____	61
<b>Figura 13</b> - Método de purificação (IMAC) _____	61
<b>Figura 14</b> - SignalP Predição de peptídeo sinal _____	68
<b>Figura 15</b> - PrediSi Predição de peptídeo. _____	69
<b>Figura 16</b> - Predição de fosforilações sobre a proteína Rab1-GTPase _____	72
<b>Figura 17</b> - Predição de fosforilações sobre a proteína ADF/Cofilina _____	72
<b>Figura 18</b> - Predição de glicosilação sobre a proteína Rab1- GTPase _____	75
<b>Figura 19</b> - Predição de glicosilação sobre a proteína ADF/Cofilin _____	76
<b>Figura 20</b> - Predição de N-glicosilação sobre a proteína Rab 1-GTPase e ADF/Cofilin ____	77
<b>Figura 21</b> - Predição Linear de Epítopos de Células B para as proteínas Rab1 GTPase e ADF/Cofilina _____	78
<b>Figura 22</b> - Comparação dos resultados predição linear dos preditores Bepipred, BCpreds e ABC pred ADF/Cofilina _____	80
<b>Figura 23</b> - Comparação dos resultados de predição linear dos preditores Bepipred, BCpreds e ABC pred Rab1 GTPase _____	81
<b>Figura 24</b> - Predição de Epítipo Conformacional da proteína ADF/Cofilina _____	82
<b>Figura 25</b> - Predição de Epítipo Conformacional da proteína Rab1-GTPase _____	84
<b>Figura 26</b> - Alinhamento múltiplo entre a sequência da proteína ADF/Cofilina e proteínas similares dos mamíferos <i>Homo sapiens</i> e <i>Canis familiaris</i> . _____	86
<b>Figura 27</b> - Alinhamento múltiplo entre a sequência da proteína Rab1-GTPase e proteínas similares dos mamíferos <i>Homo sapiens</i> e <i>Canis familiaris</i> . _____	87
<b>Figura 28</b> - Alinhamento múltiplo entre a proteína Rab1-GTPase de <i>L. infantum</i> e outras espécies da família Trypasonomatidae. _____	88
<b>Figura 29</b> - Alinhamento múltiplo da sequência da proteína ADF/Cofilina de <i>L. infantum</i> com outras espécies da família Trypasonomatidae. _____	89
<b>Figura 30</b> - Fotografia de eletroforese em gel de agarose 0,8% com resultados da PCR _	90
<b>Figura 31</b> - Transformação bacteriana com <i>Escherichia coli</i> DH5α _____	91
<b>Figura 32</b> - Extração plasmidial _____	92
<b>Figura 33</b> - Alinhamento do sequenciamento da proteína Rab1-GTPase _____	93
<b>Figura 34</b> - Alinhamento do sequenciamento da proteína ADF/Cofilina _____	94
<b>Figura 35</b> - Digestão plasmidial com enzimas de restrição NcoI e KpnI. _____	96

<b>Figura 36</b> - Expressão Rab1-GTPase _____	97
<b>Figura 37</b> - Expressão ADF/Cofilina _____	98
<b>Figura 38</b> - Determinação da solubilidade proteica das proteínas Rab1-GTPase e ADF/Cofilina _____	99
<b>Figura 39</b> - Purificação Proteína ADF/Cofilina _____	99
<b>Figura 40</b> - Purificação Proteína Rab1-GTPase _____	100
<b>Figura 41</b> - Western Blotting das proteínas recombinantes _____	101
<b>Figura 42</b> - Avaliação da antigenicidade das proteínas heterólogas Rab1-GTPase e ADF/Cofilina _____	103

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Vetores de expressão e sítios de restrição enzimática. _____	49
<b>Tabela 2</b> - Descrição dos Oligonucleotídeos _____	49
<b>Tabela 3</b> - Programação de perfil termal para amplificação em técnica de PCR ___	50
<b>Tabela 4</b> - Protocolo de Ligação_____	52
<b>Tabela 5</b> - Predição Epítipo Linear Bepipred_____	79
<b>Tabela 6</b> - Predição conformacional ADF/Cofilina _____	83
<b>Tabela 7</b> - Predição conformacional Rab 1 GTPase _____	85

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grau célsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<b>BLASTn</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool, nucleotide query</i>
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de cálcio
<b>CEUA</b>	Comitê de Ética no Uso de Animais
<b>D.O.</b>	Densidade óptica
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic acid - Ácido EtilenoDiaminoTetraAcético
<b>ELISA</b>	Ensaio de Imunoabsorbância enzimática
<b>g</b>	Grama
<b>g</b>	Força gravitacional
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido sulfúrico
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>IPTG</b>	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
<b>LVC</b>	Leishmaniose Visceral Canina
<b>LV</b>	Leishmaniose Visceral
<b>LB</b>	Luria Broth
<b>M</b>	Molar
<b>mg</b>	Miligrama
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mm</b>	Milímetro
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Carbonato de sódio
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de sódio
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato monossódico
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Fosfato de sódio dibásico
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>OPD</b>	<i>o-Phenylenediamine</i>
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em cadeia da Polimerase
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>Rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>SDS-PAGE</b>	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
<b>SSC</b>	Tampão salino citrato de sódio

<b>TAE</b>	Tris ácido acético EDTA
<b>X-Gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i> – Organização Mundial da Saúde

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	17
1.1 Leishmanioses.....	17
1.2 Agente Etiológico.....	22
1.3 Interação Parasito Hospedeiro.....	24
1.3.1 Interação Leishmania e Vetor.....	25
1.3.2 Interação Leishmania e Vertebrados.....	27
1.4 Leishmaniose Visceral Canina, Manifestações Clínica e Tratamento .....	30
1.5 Diagnóstico.....	31
1.5.1 Métodos Diretos .....	32
1.5.1.1 Microscopia .....	32
1.5.1.2 Histopatológico e Imuno-histoquímica .....	33
1.5.1.3 Cultura.....	33
1.5.2 Métodos Indiretos.....	34
1.5.2.1 Métodos Sorológicos .....	34
1.5.2.2 Métodos Moleculares .....	36
1.6 Proteínas .....	38
1.6.1 Rab 1 – GTPase.....	39
1.6.2 ADF/Cofilina .....	40
2. JUSTIFICATIVA .....	43
3. OBJETIVO GERAL .....	44
3.1 Objetivos Específicos.....	44
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	45
4.1 Amostras Biológicas .....	45
4.2 Análises in silico .....	46
4.3 Reação em Cadeia da Polimerase.....	48
4.4 Análise Eletroforética .....	51
4.5 Preparo de Células Competentes .....	51
4.7 Transformação Bacteriana.....	53
4.8 Seleção bactérias recombinantes .....	54
4.9 Extração de DNA plasmidial .....	55
4.10 Quantificação.....	56
4.11 Sequenciamento.....	56

4.12 Digestão com enzimas de restrição .....	57
4.13 Expressão heteróloga das proteínas Rab1-GTPase e ADF/Cofilina .....	58
4.14 Cromatografia de afinidade em resina de níquel .....	60
4.15 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	62
4.16 Western Blotting .....	63
4.17 Ensaio de Imunoabsorbância Enzimática (Enzyme Linked Immunosorbent Assay - ELISA) .....	64
4.18 Análise estatística .....	65
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	66
5.1 Predições in silico das proteínas Rab1-GTPase e ADF/Cofilina .....	66
5.1.1 Peptídeo Sinal .....	67
5.1.2 Fosforilação e Glicosilação .....	71
5.1.3 Predição Epítipo Linear .....	78
5.1.4 Predição Epítipo Conformacional .....	81
5.1.5 Alinhamento Múltiplo .....	85
5.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	89
5.3 Ligaçã, transformação e extraçã em plasmídeo pGEM®-T Easy .....	91
5.4 Sequenciamento .....	92
5.5 Sub-clonagem de inserto em pLEXSY-neo 2 .....	95
5.6 Expressã heteróloga em E.coli Rosetta .....	97
5.7 Solubilidade e purificaçã das proteínas Rab1-GTPase e ADF/Cofilina .....	98
5.8 Western Blotting e ELISA .....	101
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS .....	106
7. REFERÊNCIAS .....	107
8. ANEXO .....	120

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas parasitárias como a malária, tuberculose, hanseníase e as leishmanioses apresentam forte impacto na saúde mundial. Por isso, são necessárias medidas de controle destas doenças e seus potenciais surtos. Categorizadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), as leishmanioses estão dentre as doenças negligenciadas, emergentes e descontroladas, e a sua prevenção é majoritariamente baseada em três parâmetros: controle do vetor invertebrado, controle do reservatório animal e pesquisas que possibilitem melhorias nos métodos diagnósticos e o potencial desenvolvimento de vacinas e novos fármacos (1,2).

### 1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* da família *Trypanosomatidae*, ordem *Kinetoplastida*. As características clínicas variam dependendo da espécie do parasita e dos aspectos genéticos do hospedeiro que determinam a efetividade da resposta imunológica. E de acordo com as manifestações clínicas, pode ser dividido em: (1) cutâneo (localizado e disseminado), (2) muco-cutâneo e (3) visceral ou kala-azar (3).

Na leishmaniose cutânea localizada, uma pápula eritematosa aparece no local da picada, cujo tamanho varia de 1 a 10 mm de diâmetro. Depois ela se transforma em uma vesícula, que evoluirá para uma úlcera arredondada com bordas nodulares, o fundo da úlcera apresenta um tecido com aspecto granuloso, e periferia rosa e as vezes é coberto por uma pseudo-membrana esbranquiçada.

Enquanto que na forma cutânea difusa, percebe-se uma disseminação facilitada pela linfa, sangue ou tecidos. Isto deve-se principalmente por falta de uma resposta imune celular eficiente aos antígenos do parasita. A doença chama a atenção principalmente pela sua característica clínica do tipo

maculopapulonodulares disseminada, alta parasitemia, cronicidade e refratariedade aos tratamentos.

A leishmaniose muco-cutânea é caracterizada por nódulos sintomáticos mais freqüentes em membros inferiores, com posterior ulceração. Os pacientes geralmente desenvolvem lesões secundárias no complexo naso-faríngeo, perfuração de septo e destruição da cartilagem nasal. As manifestações das doenças mucosas incluem acometimento de pilares e úvula com aumento de volume, hiperemia, rugosidades e úlceras superficiais.

E por último, leishmaniose visceral, que é clinicamente identificada com sinais e sintomas, como febre, tosse, diarréia e esplenomegalia, e pancitopenia. A maioria dos casos é de infecção assintomática ou que desenvolvem sintomas moderados ou transitórios como diarréia, tosse seca, adinamia, febrícula, sudorese e discreta hepatoesplenomegalia.

Elas podem ser desencadeadas por um grupo de protozoários classificados em mais de 20 espécies de *Leishmania*, transmitidas aos seres humanos por meio da picada de um flebotomíneo infectado, o qual possui mais de 90 espécies conhecidas pela transmissão do protozoário (4).

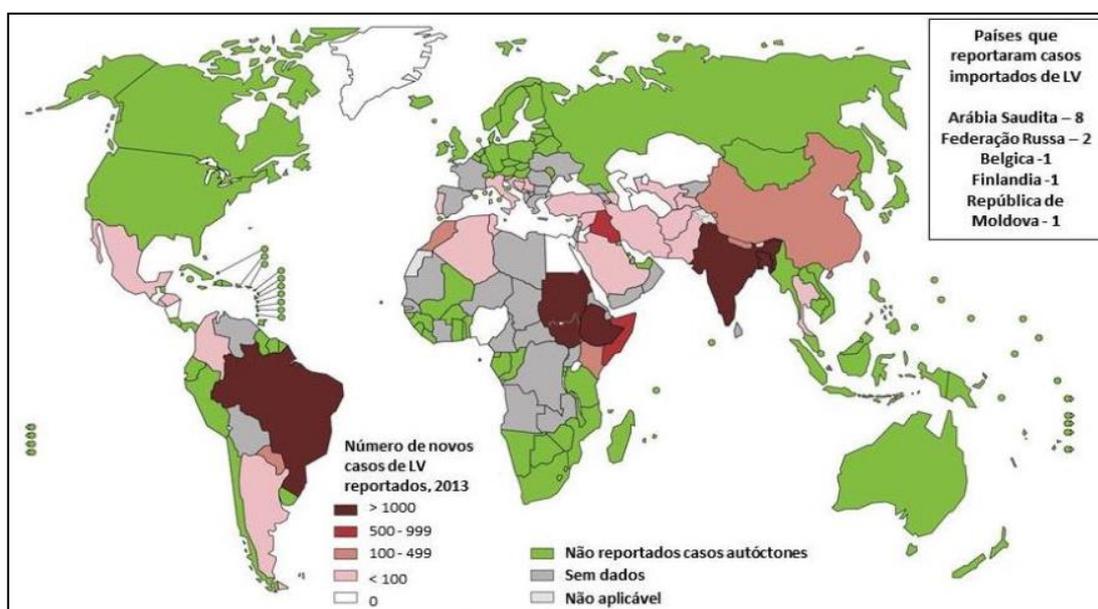
Em 2013, de acordo com os dados de endemia da leishmaniose visceral distribuídos por países e divulgados pela OMS, a LV está presente em quatro dos cinco continentes e com uma endemia observada em 73 países, o que coloca em risco cerca de 350 milhões de pessoas no mundo. A forma visceral (LV) da doença apresenta alta taxa de letalidade se não tratada e aproximadamente 97% dos casos de LV que acometem as Américas, ocorrem no Brasil, no qual foram registradas 70.000 notificações oficiais e mais de 3.800 mortes nas últimas três décadas (5–7).

Ainda sobre os dados epidemiológicos do Brasil, em 2013 registrou-se uma taxa de letalidade de 7,1%, com coeficiente de incidência de 1,6 por 100.000 habitantes e com registro de 3.253 casos confirmados, ou seja, 67% a mais dos registrados em 1990 (8).

A LV foi caracterizada primariamente como uma zoonose com limitações a ambientes rurais, conquanto, com o êxodo rural, a doença foi

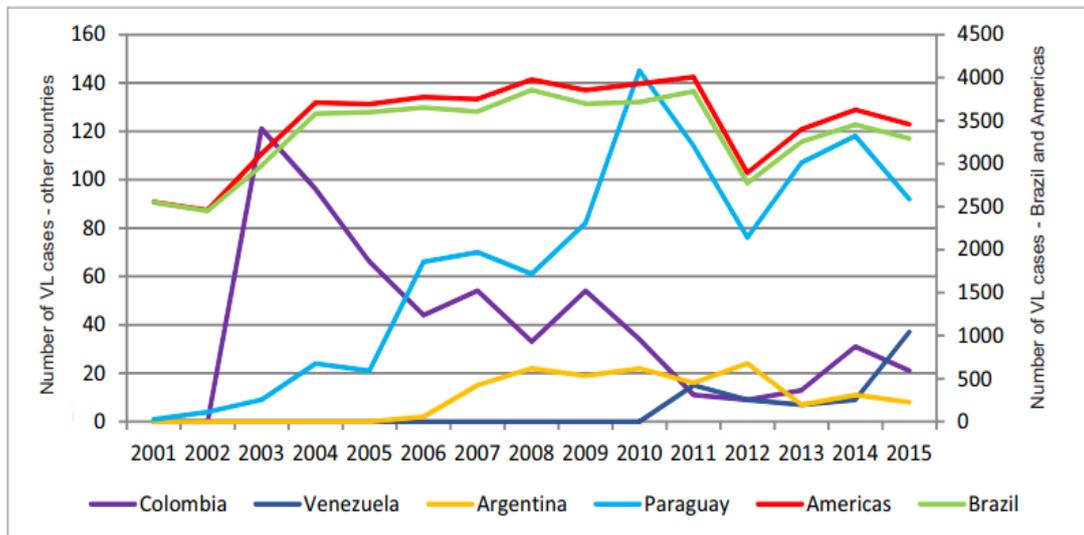
submetida a uma transição epidemiológica evidente, com um aumento significativo da incidência em áreas urbanas. Presente nas cidades de médio e grande porte e se tornou um crescente problema de saúde pública no país. O aumento dessa incidência justifica-se pelo conjunto de fatores sócio-econômicos, físicos e biológicos induzidos por atividades humanas, que culminou na adaptação de vetores e reservatórios nas áreas urbanas (9,10).

Curiosamente, a distribuição do número de casos não é uniforme, sendo que 90% desses casos concentram-se em apenas seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão Sul, Brasil e Etiópia, como mostra a Figura 1 (5).



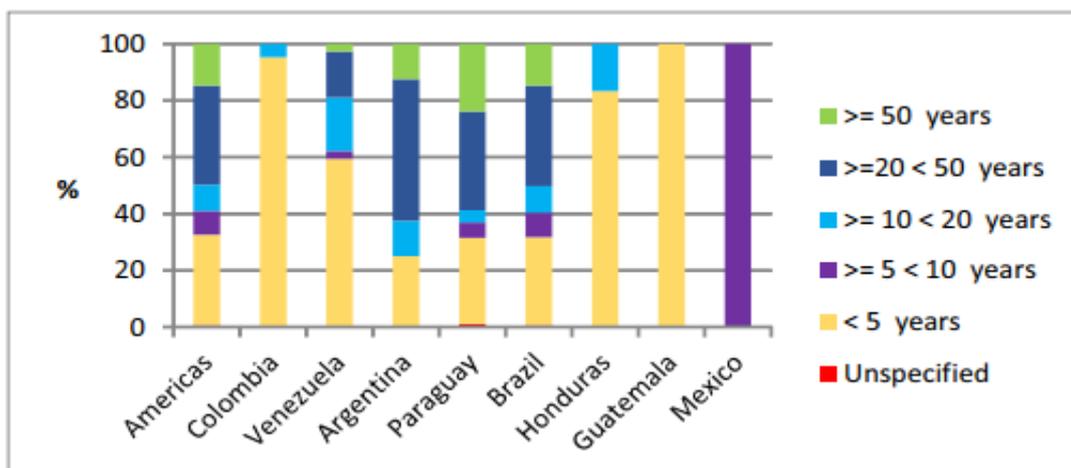
**Figura 1-** Endemicidade da leishmaniose visceral no mundo em 2013. **Fonte:** WHO, 2015 adaptado.

Segundo os dados publicados pela Organização Pan Americana de Saúde (OPAS), de 2001 a 2015, 52.176 casos humanos de LV foram relatados nas Américas. Entre 2004 e 2011 houve uma tendência constante no número de casos, com uma média anual de 3.835 registros, no entanto, em 2012 os casos reduziram para 2.892. Mas, a partir de 2013, houve um aumento anual de casos (3.492), conforme demonstrado na figura 2 (11).



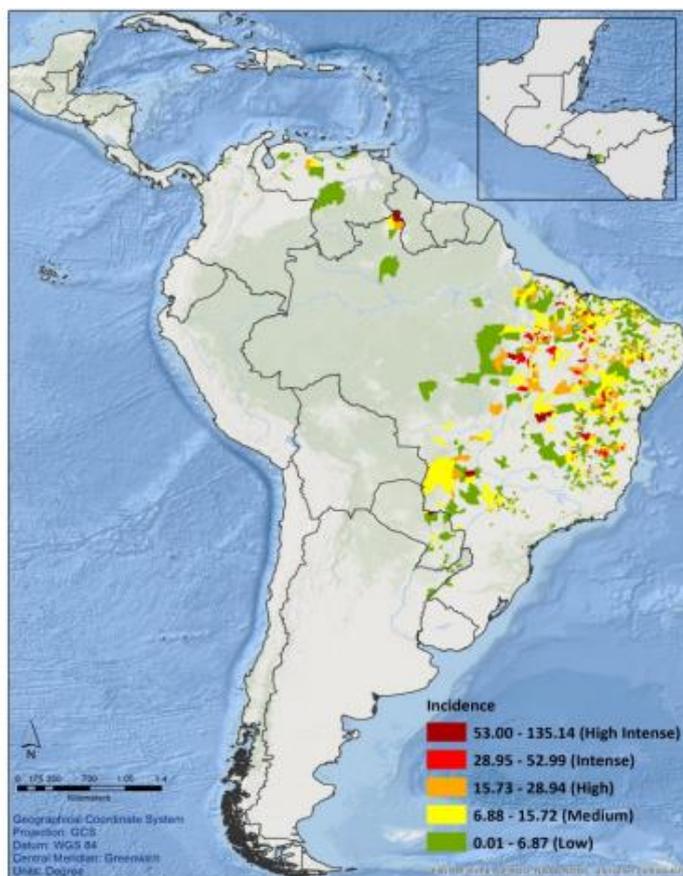
**Figura 2-** Casos de leishmaniose visceral, de acordo com países com maior casos, Américas, 2001-2015. **Fonte:** SisLeish-OPAS/OMS: Dados relatados por programas nacionais de leishmaniose/serviços de vigilância. Dados disponíveis em 20 de fevereiro de 2017.

No ano de 2015, foram relatados um total de 3.456 casos de LV e uma taxa de incidência de 2,27 casos por 100.000 habitantes, nas Américas. Os casos ocorreram em oito países, e 95,1% continuam a ocorrer no Brasil. Do total de casos relatados nas Américas, 64,64% eram do sexo masculino. Em relação à idade, 35,1% ocorreram em grupos com a faixa etária  $\geq 20$  e  $< 50$  anos, seguidos pelo grupo de crianças menores de cinco anos (31,9%), em destaque na figura 3. Diferentemente, na Colômbia, Honduras e na Venezuela, crianças com menos de cinco anos foi a faixa etária mais afetada, com 95,2%, 83,3% e 59,5% respectivamente (11).



**Figura 3** - Proporção de casos de leishmaniose visceral por faixa etária e País, nas Américas, em 2015. Fonte: SisLeish-OPS/OMS: Dados relatados pelo Programa Nacional de leishmanioses, Serviço de Vigilância 2017.

A distribuição espacial de LV na região mostra uma ampla dispersão de casos no nordeste, sudeste e Centro-Oeste do Brasil, expandindo a partir do início da década de 2000 para a região oriental do Paraguai, e subsequentemente para a região Nordeste da Argentina, atingindo principalmente as províncias de Misiones, Corrientes e Entre Rios (Figura 4) (4,12). Outro ponto relevante refere-se ao aumento da taxa de mortalidade e letalidade da LV nas Américas, em que pode-se observar em 2015 o maior número de óbitos por ano (268 casos) e com uma taxa de letalidade de 7,7%. Com estes dados alarmantes a OPAS/WHO recomenda a disponibilidade de novas tecnologias, nas redes públicas do Brasil, associadas a novas estratégias e ações para que os profissionais de saúde possam detectar os casos mais precocemente possível e realizar o diagnóstico, evitando as complicações, gravidade e morte.



**Figura 4** - Taxa de Leishmaniose visceral, nas Américas, em 2015. **Fonte:** SisLeish-OPS/OMS; dados relatados por programas nacionais de Leishmaniose: Serviços de Vigilância, 2017.

## 1.2 Agente etiológico

Há vários relatos documentados de evidências fósseis de espécies semelhantes ao gênero da *Leishmania*, conhecido como gênero fóssil *Paleoleishmania proterus*, encontrado no trato intestinal de uma espécie de flebotomíneo extinto, *Palaeomyia burmitis*, preservada em um âmbar birmanês formado no início do período cretáceo a cerca de 100 milhões de anos (13,14).

Entretanto, foi no século XIX que houve os primeiros relatos da LV, o cirurgião militar William Twining publicou um artigo em 1827 sobre pacientes em Bengala, na Índia, que se apresentavam emaciados, com anemia aguda

e febre intermitente. Posteriormente, William descreveu com mais detalhes os sintomas do calazar, incluindo a aparência seca e escamosa da pele (15,16).

O primeiro surto de calazar ocorreu na vila de Mahomomedpore na Índia que se expandiu rapidamente. A letalidade dos pacientes das áreas afetadas chegou a 30%, e a palavra calazar foi culminada somente no final do século XIX referindo-se à cor acinzentada da pele de pessoas de cor clara durante o processo de infecção (17).

Em novembro de 1900, o patologista escocês William Boog Leishman, que serviu ao Exército britânico na Índia, descobriu estruturas ovoides em esfregaços tomados *post-mortem* do baço de um soldado que morreu de emaciação e esplenomegalia, na cidade Dum Dum, perto de Calcutá. Posteriormente, ele encontrou estruturas semelhantes em um rato infectado experimentalmente. O que levou a publicação de suas descobertas em 1903, sugerindo que os corpos ovoides eram formas degeneradas de tripanossomos, portanto, propunha que a doença que ele chamava de febre “Dum-dum” era uma forma de tripanossomíase (18).

O médico irlandês Charles Donovan, algumas semanas depois da publicação de Leishman, publicou um artigo relatando ter encontrado corpos semelhantes em amostras esplênicas em autópsia de indivíduos indianos que apresentavam febre remitente e baços aumentados (18).

Enquanto isso, o médico britânico Ronald Ross, que foi ordenado pelo governo indiano em 1898 para investigar o calazar, publicou um artigo em novembro de 1903, comentando a descoberta dos corpos ovoides encontrados por Leishman e Donovan no baço de pacientes com pirexia crônica e esplenomegalia (19). Ele concluiu que os corpos ovoides não eram tripanosomas degenerados, mas um novo organismo protozoário e que o quadro clínico dos casos se assemelhava ao de kala-azar. Desta forma no final de 1904, o termo *Leishmania Donovanii* foi oficialmente adotado (17,20).

A LV só foi relacionada com o protozoário *Leishmania infantum* em 1908, quando foi descrita pela primeira vez pelo bacteriologista francês Charles Jules Henry Nicolle, em crianças na Tunísia, que sofriam de anemia, e esplenomegalia (21). No mesmo ano, juntamente com seu colega Charles

Comte, encontraram o parasita em cães em Túnis. Desde então, os cães foram implicados como importantes reservatórios de hospedagem para LV (21,22).

No Novo Mundo os primeiros relatos foram descritos pelo médico brasileiro Adolpho Carlos Lindenberg e pelo médico italiano Antonio Carini juntamente com o brasileiro Ulysses de Freitas Paranhos (23,24).

A LV foi registrada pela primeira vez na América Latina na década de 1930. Aristides Marques da Cunha e Evandro Serafim Lobo Chagas, foram incapazes de infectar animais em laboratório com os parasitas isolados em casos brasileiros e conseguia com sucesso a infecção de isolados do velho mundo. Isto os fizeram concluir na época que seria uma nova espécie responsável pela infecção no Novo Mundo, e o chamaram de *Leishmania chagasi* (25). No entanto, por estudos de técnicas moleculares, evidenciou-se que as espécies *L. chagasi* e *L. infantum* não podem ser distinguidas (26).

Assim, as duas principais espécies envolvidas com a infecção na leishmaniose visceral, dependendo da região geográfica são: *L. donovani* na Ásia e África e *L. infantum* na Ásia, Europa, África, e nas Américas incluindo o Brasil (5).

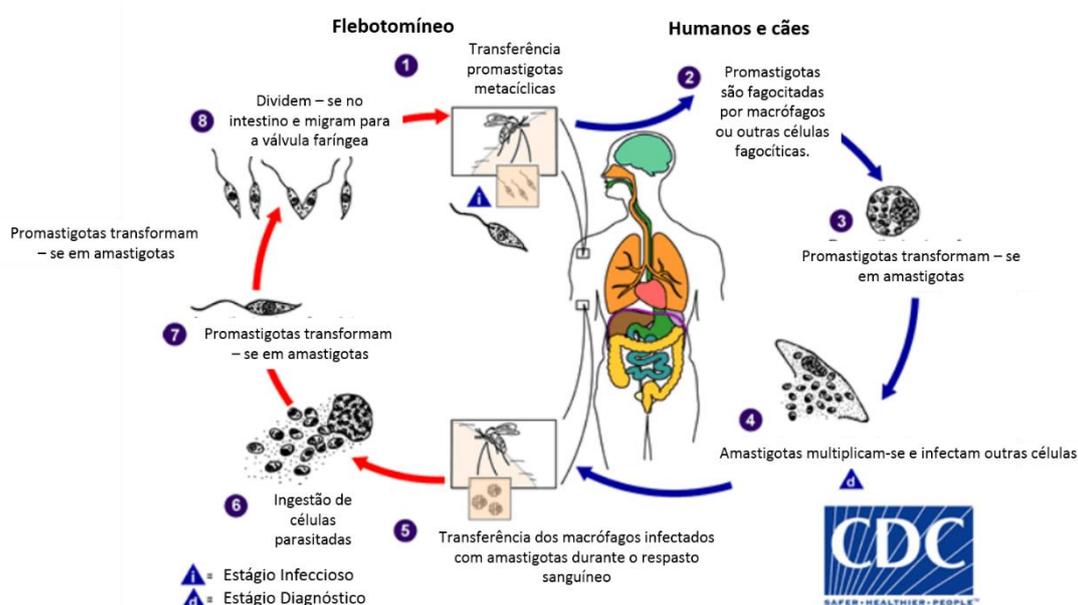
A *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) é um eucarioto do filo Euglenozoa, classe Kinetoplastida, da família Trypanosomatidae, caracterizado pela presença do cinetoplasto, estrutura incomum a outros eucariotos, que consiste em uma organela citoplasmática estrutural e funcionalmente semelhante à mitocôndria, presente em certos organismos (27).

### 1.3 Interação parasito hospedeiro

A *L. infantum* têm um ciclo de vida digenético complexo, exigindo um hospedeiro vertebrado e outro invertebrado, como ilustrado na figura 5 (28). Esta doença que apresenta uma ampla gama de manifestações pode ser assintomática, aguda, crônica ou subclínica. É transmitida pela picada dos invertebrados: *Lutzomyia longipalpis* que é o principal vetor de LV na América

Latina ou *Phlebotomus perniciosus* responsável pela propagação na Bacia do Mediterrâneo Ocidental (3,29,30).

O cão doméstico, por sua vez, é considerado o principal vertebrado como reservatório do agente, no entanto outros canídeos e mamíferos selvagens podem exercer este papel na transmissão silvestre (31). No Brasil, o mais importante reservatório são: a raposa (*Dusycion ventulus*) e o cão (*Canis familiaris*) que são os principais mantenedores do ciclo da doença. O homem também é uma importante fonte de infecção, principalmente quando o Calazar incide sob aspectos epidêmicos (4,31).



**Figura 5-** Ciclo biológico da *Leishmania infantum*. **Fonte:** Center for disease control and centers for prevention, 2013. (Adaptado)

### 1.3.1 Interação *Leishmania* e Vetor

O desenvolvimento do protozoário *Leishmania* em seu vetor é um processo complexo. Depois que o flebotomíneo alimenta-se de sangue infectado, as formas amastigotas ingeridas se diferenciam em promastigotas dividindo-se para dar seguimento ao ciclo biológico digenético. No entanto,

existem inúmeras condições adversas a serem superadas no intestino médio do hospedeiro, incluindo as atividades enzimáticas digestivas e a síntese de uma barreira física, a matriz peritrópica, que reveste todo o intestino médio (32,33).

Somadas às barreiras descritas acima, ainda há a necessidade da adesão e fixação do parasita às células do intestino, de forma que venha evitar a sua excreção (34). O lipofosfoglicano é o principal glicoconjugado de superfície do protozoário *Leishmania*, desempenha um papel protetor ao parasita quanto as atividades enzimáticas de seu hospedeiro e medeia a ligação do parasita ao intestino médio do flebótomo (34,35).

Após a digestão, as formas amastigotas ingeridas serão submetidas a uma série de transformações estruturais e morfológicas induzidas pelas mudanças dentro do vetor, como pH e temperatura (36,37). As primeiras transformações dos morfotipos de promastigotas ocorrem dentro da matriz peritrópica, e primeiro morfotipo observado é a promastigota procíclica, uma forma replicativa com pouca motilidade que está confinada à matriz peritrópica (38).

Alguns dias depois, os parasitas diminuem a sua replicação e diferenciam-se em formas alongadas com intensa motilidade, as promastigotas nectomonas. Estas formas migram, se acumulam e fixam via flagelo às microvilosidades do epitélio intestinal, esta etapa é essencial para evitar a sua eliminação por meio do conteúdo fecal (39,40). Portanto, este período caracteriza a fase de estabelecimento da infecção em um vetor, ou seja, a persistência e manutenção do parasito dentro do flebótomo (38).

Alcançando a região torácica as nectomas transformam-se em leptomonas uma forma promastigota mais curta e replicativa, que são responsáveis pela secreção de uma substância gelatinosa que envolve o parasito, essencial para a transmissão do parasito (41). Finalmente, as promastigotas leptomonas diferenciam-se em promastigotas metacíclicas. Estas podem ser identificadas próximas à válvula do estomodeu. Elas possuem um corpo celular pequeno, flagelo longo e não se dividem. São parasitos altamente móveis e livres que podem migrar ao longo do intestino anterior e

alcançar a faringe, cibário e probólide, possibilitando assim uma transmissão via picada em hospedeiro vertebrado. (34,38,42).

### 1.3.2 Interação *Leishmania* e Vertebrados

Quando a fêmea do inseto-vetor, parasitada realiza o repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero, são injetadas juntamente com a saliva do inseto as formas promastigotas metacíclicas no tecido subcutâneo do hospedeiro (43). Estas formas promastigotas serão fagocitadas e no interior do macrófago transformar-se-ão em amastigotas, que se proliferarão até serem liberadas por meio da lise celular do macrófago, e estas estarão aptas a serem fagocitadas e a infectar novas células (44). Para melhor compreensão desta interação faz-se necessário entender algumas imunomodulações no próximo tópico a seguir.

#### 1.3.2.1 Leishmaniose e resposta imune

Os linfócitos T desempenham um papel central na imunorregulação e imunoestimulação. As células T-helper podem ser classificadas em células Th1 que produzem interleucina IL-2 e interferon e estão envolvidas na imunidade celular e as células Th2 que produzem IL-4, IL-5 e IL-13 associadas a imunidade humoral. E atualmente essa classificação foi expandida para Th17 e Treg. Na resposta Th17 ocorre a produção de citocinas pró-inflamatórias e IL-17 que desempenham papéis importantes para a indução da inflamação e em contraste as células Treg desempenham papéis centrais para imunorregulação, pois inibem a proliferação e produção de citocinas tanto nas células T CD4+ quanto CD8+, na produção de imunoglobulinas por células B, atividade citotóxica de células Naturais Killers (NK) e maturação de células dendríticas (DCs) (45).

Estes mecanismos de imunomodulação, no hospedeiro vertebrado está diretamente associada à produção de citocinas com a capacidade de ativar os macrófagos, em especial o IFN- $\gamma$  que tem a sua produção assegurada pelo desenvolvimento de uma resposta específica Th1.

Em um primeiro contato as formas promastigotas metacíclicas da *Leishmania* interagem com receptores presente em células da resposta imune inata, como as células dendríticas e macrófagos, que liberam interleucina 12 (IL-12), e estas estimulam as células NK a secretarem IFN- $\gamma$ . Que são importantes para a diferenciação e proliferação dos linfócitos CD4+ que por sua vez produzem mais IFN- $\gamma$ . Esta citocina é considerada como a principal responsável pela indução da atividade leishmanicida por macrófagos, pois induz a expressão de iNOS e produção de NO, que atua na eliminação dos parasitas e na resolução da infecção (46–48).

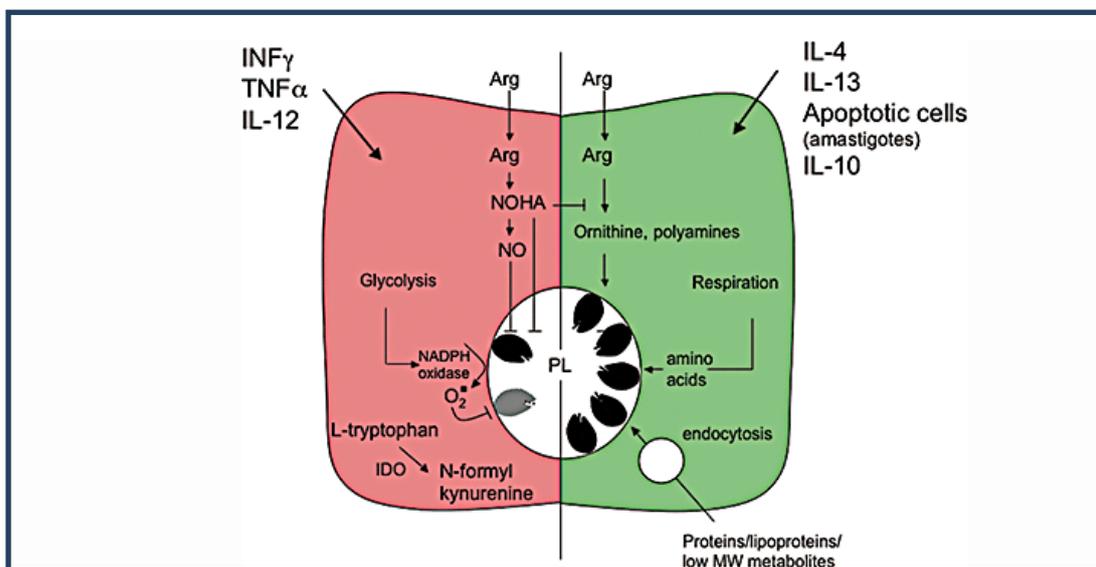
A indução de células Th2 e Treg é regulada pela liberação de IL-4 e de IL-10, pois são subpopulação de células T CD4+ que expressam o fator de transcrição Foxp3 e CD25, e induzem a produção de IL-10 e TGF-  $\beta$ , e o próprio macrófago infectado é outra importante fonte de IL-10. Além das subpopulações Th1, Th2 e Treg, as células Th17 vêm ganhando destaque na resposta contra a *Leishmania*, apresentando, no entanto, resultados contraditórios. Alguns estudos demonstraram que a resposta mediada por Th17 apresentavam um efeito protetor em pacientes com leishmaniose visceral em que a produção de IL-17 e IL-12 foram associadas com resistência a doença. No entanto o mesmo não foi observado para infectado com *L. major* responsável pela leishmaniose cutânea, em que verificou-se em camundongos com alta produção de IL-17 era acompanhada por gravidade da doença, destruição tecidual e grande carga parasitária (49).

Ao passo destas descrições imunológicas, pode-se compreender melhor a interação parasito e hospedeiro vertebrado. Por exemplo temos evidências crescentes de que o estado metabólico dos macrófagos tem um efeito profundo no crescimento intracelular das amastigotas. Estudos demonstraram que a infecção por *Leishmania* em camundongos e o processo

de cicatrização e cura estão diretamente associados à uma resposta transitória ou prolongada de TH2 e respectivamente à ativação alternativa de macrófagos, em verde na figura 6. Este estado de ativação é induzido por citocinas IL-4, IL-13 e IL-10 que predominam em camundongos que não apresentavam cicatrização. A ativação alternativa dos macrófagos resulta na elevação da atividade endocítica, respiração mitocondrial e arginase-1, que aumentam os níveis de aminoácidos e poliaminas, que são essenciais para o crescimento das amastigotas (50–52).

Contrariamente, o crescimento intracelular do parasita pode ser controlado por uma resposta TH1 conduzida por IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , e outras moléculas co-estimuladoras em vermelho na figura 6. A ativação clássica resulta na regulação positiva da glicólise, síntese de NO e baixa regulação da atividade da arginase-1. As enzimas envolvidas no esgotamento de outros aminoácidos também podem ser reguladas positivamente, restringindo o crescimento de amastigotas e aumentando sua sensibilidade ao estresse oxidativo (50,51,53).

Por fim, as amastigotas de *Leishmania* e a resposta imune do hospedeiro tem um efeito fundamental que determinará o resultado da infecção, em que os processos metabólicos dos macrófagos designam de forma dinâmica esta interação parasito hospedeiro (50–52).



**Figura 6** - Metabolismo dos Macrófagos e crescimento intracelular de amastigotas da Leishmania. **Fonte:** NADERER e McCONVILLE, 2008.

#### 1.4 Leishmaniose Visceral Canina, Manifestações Clínicas e Tratamento

As manifestações clínicas no cão possuem um espectro variado entre infecção assintomática e estado grave, resultando, geralmente na morte do animal. Os cães que se apresentam assintomáticos, não exibem nenhum sinal clínico aparente, podendo permanecer nesta fase da parasitose por um período variável, chegando a meses. Ao passo, que os cães oligossintomáticos apresentam alopecia localizada, perda de peso e úlceras cutâneas que são frequentemente observadas nas pontas das orelhas e na área periorbital (54).

Os sinais viscerais mais comuns observados são: linfadenopatia, emaciação, sinais possíveis de insuficiência renal (poliúria, polidipsia, vômito), neuralgia, poliartrite, poliomiosite, e outros sinais clínicos; sendo que aproximadamente um terço apresentam febre e esplenomegalia. Dentre os sinais cutâneos podemos citar hiperqueratose, pelagem seca e quebradiça, perda de pelos, e unhas anormalmente longas ou quebradiças (54,55). Em

um recente estudo foi confirmada a presença de complicações neurológicas associadas à infecção por *Leishmania* (56).

Regiões endêmicas apresentam 5-10% dos cães clinicamente doentes e 95-90% estão clinicamente saudáveis. A evolução da doença está diretamente relacionada com a resposta imune e/ou doenças concomitantes (57).

A quimioterapia empregada atualmente contra a leishmaniose foi desenvolvida há muitos anos. A desvantagem está na presença de compostos antimoniais, com fortes efeitos tóxicos e o desenvolvimento de recidivas é extremamente frequente, chegando a 74 % no primeiro ano (58). E ainda, observou-se que os parasitas isolados destas recidivas eram cinco vezes menos sensíveis às drogas, do que os parasitas de cães não tratados (59). Isto pode contribuir para uma disseminação descontrolada tanto em cães como em humanos. O cão deve ser monitorado e mantido sob observação para verificar a carga parasitária e valores hematológicos e bioquímicos, pois, o tratamento adequado dos cães doentes é um forte redutor na prevalência e na incidência da doença (58).

Dentre a lista dos medicamentos essenciais contra leishmaniose tem-se: antimoniais pentavalentes (SbV), miltefosina, desoxicolato de anfotericina B ou formulado em formulações lipossomais e a paromomicina. No entanto, algumas outras drogas também são eficazes, como o alopurinol, Pentamidina, enrofloxacina, marbofloxacina, metronidazol, Espiramicina e cetoconazol (58).

### 1.5 Diagnóstico

Como descrito no item 1.4 a LV é caracterizada por diversos sintomas que levam progressivamente à anemia e à morte por hemorragia ou infecção viral ou bacteriana sobreposta. A preocupante disseminação e a gravidade da doença exige uma detecção precoce seguidos de um monitoramento adequado, para o eficaz controle desta doença (11,43,58,60).

O diagnóstico da LV é bastante complexo mesmo em cães sintomáticos pois os sinais clínicos são variáveis e podem ser facilmente confundidos com os de outras doenças que acometem estes animais. Não se pode desconsiderar também o importante fato dos cães assintomáticos serem capazes de transmitir o parasito ao vetor (60,61).

Nos últimos anos foram desenvolvidas várias técnicas de diagnóstico específicas para facilitar o diagnóstico desta doença, porém eles possuem diferentes valores de sensibilidade e especificidade, custo e facilidade de execução (57,60,61).

Pode-se utilizar diferentes métodos para o diagnóstico laboratorial da LVC (Leishmaniose Visceral Canina) como: diagnósticos diretos na pesquisa do parasita ou de seu DNA e diagnósticos indiretos por meio de testes imunológicos. A aplicação do método diagnóstico varia de acordo com o objetivo que o determine tais como: estudos epidemiológicos, a confirmação ou controle terapêutico da leishmaniose. Pois, os métodos apresentam diferentes vantagens e desvantagens, relacionadas aos níveis de sensibilidade, especificidade, custo e facilidade de manuseio (57,61,62). Estes métodos diretos e indiretos são classificáveis em parasitológico, sorológico e molecular (61,62).

### 1.5.1 Métodos Diretos

#### 1.5.1.1 Microscopia

O diagnóstico por microscopia pode ser conclusivo pela observação de formas amastigotas de *Leishmania* em esfregaços corados de tecidos infectados (medula óssea, linfonodo, pele, baço ou sangue periférico). Entretanto, a maioria das amostragens são obtidas usando procedimentos invasivos, e geralmente não são sensíveis para a detecção em cães assintomáticos (63).

Do material coletado é feito um esfregaço, que é corado por Giemsa, Wright ou kit Panótico, com análise em microscópio óptico, observando-se amastigotas livres ou no interior de monócitos, macrófagos ou neutrófilos. Estas formas se apresentam como corpos ovais ou arredondados medindo de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de diâmetro, com citoplasma pálido, núcleo relativamente grande e denso, e o cinetoplasto que consiste em um corpo em formato de bastonete, paralelo ao núcleo (Figura 7) (61).

Esse método de diagnóstico possui especificidade que chega a 100%, porém a sensibilidade é variável, pois a distribuição do parasito nos tecidos não é homogênea, o que torna frequente a ocorrência de falsos-negativos (61,64).

#### 1.5.1.2 Histopatológico e Imuno-histoquímica

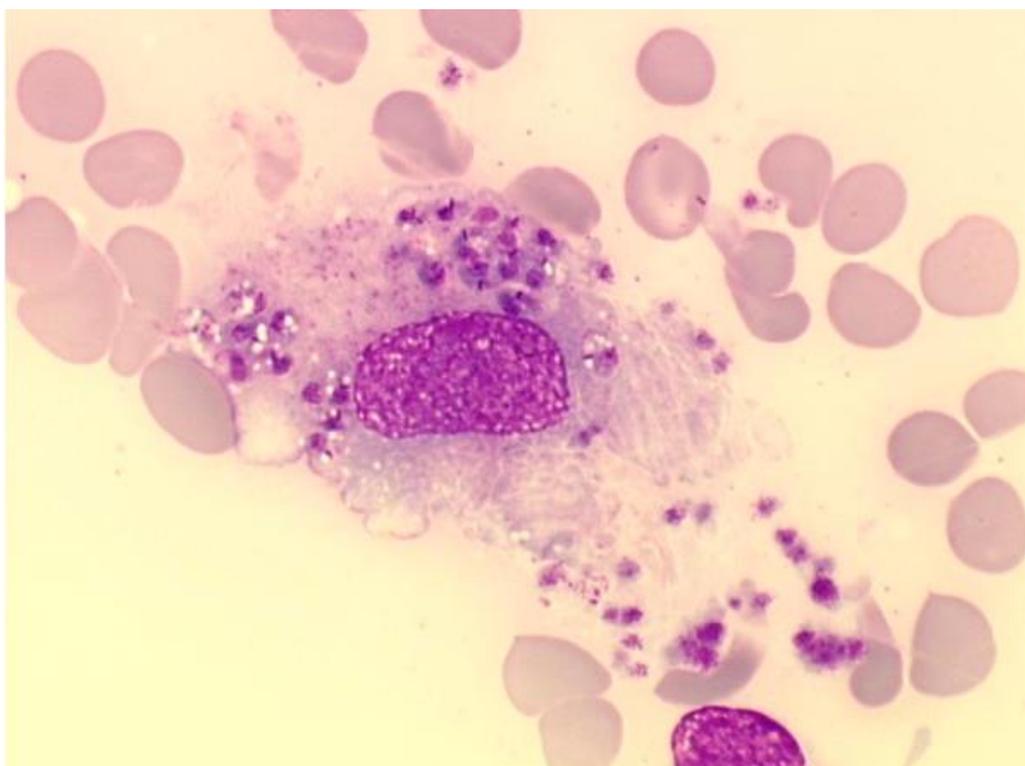
Achados semelhantes ocorrem em análise de cortes histopatológicos de tecidos corados com hematoxilina e eosina. Este método demonstrou ter uma sensibilidade de aproximadamente 32,35%. A abordagem imuno-histoquímica (IHC), como Imunoperoxidase ou imunoflorescência direta de tecidos podem ser usados como uma ferramenta suplementar para confirmar, particularmente em órgãos que não têm alta carga de parasitas que leva a uma sensibilidade de 62% (65).

#### 1.5.1.3 Cultura

A cultura *in vitro* de diferentes tecidos pode melhorar a sensibilidade da detecção de parasitas. Porém, nem todas as cepas de *Leishmania* crescem ao mesmo ritmo e nem todos os tecidos e os órgãos do mesmo cão possuem uma carga parasitária similar (61).

A inoculação replicada de vários tubos aumentará a sensibilidade diagnóstica. Neste caso a sensibilidade pode ser ainda mais baixa, sendo que

a utilização de técnicas de imuno-histoquímica pode elevar a sensibilidade do método, contudo a complexidade, o custo e o tempo de execução da técnica são aumentados. A cultura *in vitro* de diferentes tecidos também é usada para aumentar a sensibilidade do exame parasitológico, porém possuem as mesmas desvantagens dos exames histopatológicos e o resultado final pode demorar até quatro semanas, tornando o método inviável (66).



**Figura 7** - Formas amastigotas de *Leishmania* intra-histiocíticas em esfregaço de medula óssea corado por Giemsa e visualizado em aumento 1.000 x. **Fonte:** LIAUTAUD, B. et al, 2015 (67).

## 1.5.2 Métodos Indiretos

### 1.5.2.1 Métodos Sorológicos

São considerados métodos indiretos de diagnóstico, os métodos sorológicos, pois estes se baseiam em detectar anticorpos ou antígenos específicos de *Leishmania* sp. Atualmente as técnicas mais usadas no Brasil

são: a Reação de Imuno-Fluorescência Indireta (RIFI), o Ensaio ImunoEnzimático (EIE) ou ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e Imunocromatográfico (64). O primeiro utiliza o parasito íntegro como antígeno e sua realização requer alto nível de habilidade, experiência e utilização de equipamentos de alto custo e sua sensibilidade pode variar de 21-100%.

O ELISA tem uma vantagem de poder se analisar um grande número de amostras em curto período de tempo e pode ser adaptado para o uso de diferentes antígenos concomitantes, como antígenos citoplasmáticos, antígenos purificados, peptídeos sintéticos e proteínas recombinantes, sendo que a sensibilidade e especificidade estão condicionadas de acordo com o antígeno e o estado clínico do animal testado (61,68,69).

O teste imunocromatográfico DPP (Dual Path Platform) tem sido muito explorado atualmente, pois é um teste rápido, prático e a técnica não requer grande experiência do analista, características boas para se aplicar em campo, e tem apresentado uma boa sensibilidade e especificidade (66,70). O Ministério da Saúde brasileiro recomendava a utilização dos testes RIFI e ELISA para a avaliação da soroprevalência em inquéritos caninos amostrais e censitários no Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (9). Com o intuito de melhorar a detecção de animais infectados atualmente o teste RIFI não está mais sendo utilizado e o teste imunocromatográfico DPP vem sendo utilizado como teste de triagem e o ELISA como confirmatório conforme preconizado na Nota Técnica Conjunta 01/2011- CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS.

Romero e Boelaert (2010) fizeram uma revisão sistemática sobre o controle da leishmaniose na América Latina e parte dos estudos realizaram levantamento dos meios diagnósticos e dentre os testes sorológicos foram citados: IFAT (Indirect fluorescent antibody test), ELISA, DAT (Testes de Aglutinação Direta) e rK39-ICT. Segundo os autores, o IFAT foi o teste adotado pelo Ministério da Saúde do Brasil para suas campanhas de triagem e remoção de cães e que estimativas observadas em publicações consideravam uma sensibilidade entre 72-100% com uma especificidade de 52-100%, contudo sensibilidade e especificidade moderada deste teste, o

longo tempo de turno entre a tomada de amostras e o abate e a complexidade de sua execução foram invocados como uma das razões para a baixa efetividade da campanha. Posteriormente, vários ensaios com teste ELISA foram avaliados baseados em antígenos homólogos que apresentaram uma melhor sensibilidade o que sugeriu uma revisão política da triagem de detecção (43).

Atualmente, métodos diagnósticos de mais fácil manipulação como o DAT (sensibilidade 85-100%, especificidade 89-100%) e o rK39-ICT (sensibilidade 72-96% e especificidade 62-100) têm oferecido como vantagem principal a redução no atraso diagnóstico e tratamento, porém com uma sensibilidade ainda questionável por alguns estudos (43,71,72).

#### 1.5.2.2 Métodos Moleculares

As técnicas moleculares exigem um conhecimento prévio da estrutura do DNA dos protozoários Cinetoplastídeos, que apresentam algumas peculiaridades quando comparadas com a de outros membros dos eucariontes. A *L. infantum* possui 36 pares de cromossomos, com tamanho variado, entre 200 e 4.000 kb, com o genoma completo totalizando 32 Mb. Os cromossomos são lineares e não condensados durante todas as fases do ciclo celular.. A ordem dos genes é altamente conservada quando comparada com de outras espécies de *Leishmania*, mas a distância entre os locus pode variar (73,74).

Como alternativa aos métodos parasitológicos e sorológicos, os métodos moleculares estão cada vez mais utilizados visto que os métodos tradicionais possuem várias limitações. Testes, como reação em cadeia da polimerase (PCR), têm evidenciado uma maior sensibilidade e especificidade, além do que, somado-se a isso a maioria das técnicas permitem a diferenciação das espécies de *Leishmania* de forma eficiente e relativamente rápida, visto que as técnicas classicamente utilizadas necessitam de

isolamento e cultivo em massa do parasito a ser identificado, o que torna o trabalho um procedimento trabalhoso e demorado .

A PCR clássica pode diferenciar espécies ao utilizar regiões específicas na amplificação de certos genes, que resultem fragmentos de tamanhos diferentes como ocorre na *L. tropical* e *L. donovani* (75,76).

Vários protocolos de PCR convencionais para LV apresentaram variação na sensibilidade de 53,7 a 97,78% para humanos e de 72,2 a 98,7% para cães e a especificidade variou de 61,82 a 100% para humanos e de 83,3 a 96,4% para cães, isto reforça que características como região alvo de DNA e o par de primer a ser utilizado são determinantes para aplicação do teste (43).

Outra técnica molecular aplicável é a de polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP) baseia-se na utilização de enzimas de restrição que cortam o DNA em pontos específicos, gerando fragmentos de tamanhos diferentes que são separados e avaliados conforme o tamanho das bandas (77).

Dentre os genes codificadores alvos, que possibilitam a detecção do DNA de *Leishmania* em amostras biológicas dos hospedeiros, destacam-se os genes codificadores de RNA ribossômico (rRNA) que possuem unidades de repetição compostas por unidades de transcrição intercaladas por regiões intergênicas. Estes genes de rRNA por serem relativamente pequenos e serem flanqueados por segmentos altamente conservados são muito úteis na detecção de *Leishmania* e na identificação da espécie pela técnica de RFLP (78).

Apesar destas vantagens, tem-se a desvantagem da presença de vários inibidores de *Taq* DNA polimerase encontrados tanto nas espécies como nos materiais utilizados para coleta das amostras e de extração de DNA, como proteinase K, fenol e concentrações de sais elevadas (43).

Uma abordagem molecular mais recente como o Ensaio Baseado em Sequência de Ácido Nucléico (NASBA) e a Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP) tem sido cada vez mais aplicada para a detecção de DNA

ou RNA de *Leishmania*. O NASBA tem suas variações, o quantitativo (QT-NASBA) demonstrou ser eficaz para avaliar o tratamento de LV com um fármaco estimando a quantificação de parasitas *L. infatum* no sangue, enquanto que o NASBA-OC foi capaz de detectar o RNA em 5-10 minutos, mas sem a quantificação (43).

A técnica LAMP, uma ferramenta de diagnóstico promissora, foi adotada como técnica alternativa para PCR, uma vez que é uma tecnologia mais rápida, sensível e menos dispendiosa, que usa a turbidez da amostra como critério de positividade e não há a necessidade de um termociclador, apenas um bloco de calor ou um banho-maria, uma vez que a reação é isotérmica, muito útil para aplicação em campo. Verma *et al.* 2016, desenvolveu um ensaio baseado em LAMP para detecção de *L. donovani* em humanos com LV em que as taxas de sensibilidade e especificidade variou de 96,4-98,5% (79).

## 1.6 Proteínas

O desenvolvimento de vacinas e ferramentas diagnósticas em doenças parasitárias tem sido difícil devido à complexidade, por exemplo da própria interação do patógeno com os vertebrados. Nos últimos anos, clonagem e expressão de proteínas de *Leishmania* por DNA recombinante tem sido realizado. E várias moléculas potencialmente interessantes para o diagnóstico, como a proteína recombinante K39(rK39) de *Leishmania* é exemplo de proteína recombinante de *Leishmania* que tem sido utilizado com sucesso como ferramenta diagnóstica principalmente para uso em campo (66,71,80).

Outra proteína recombinante que vem sendo testada é a rKLO8, que contém domínios conservados com similaridade significativa da proteína imunodominante kinesina de *Leishmania*. Os testes iniciais demonstraram que a rKLO8 em 106 soros com LV confirmados parasitologicamente, 104 (98,1%) foram testados positivos por rKLO8 para o ELISA com especificidade

de 96,1 e sensibilidade de 94,8, para o DAT mostrou 100% de especificidade e 94,3% de sensibilidade (81,82).

Várias moléculas foram testadas para uso clínico no sorodiagnóstico, e pacientes com LV e LC apresentaram títulos substanciais de anticorpos contra proteína induzível LmSTI1, proteína antioxidante TSA, proteína A2 específica para a forma amastigota e proteína de membrana cinetoplastida (KMP11), por exemplo. Outras proteínas nucleares e citoplasmáticas também têm sido investigadas quanto ao seu potencial imunogênico. A proteína papLe 22 uma proteína nuclear revelou-se altamente imunogênica. Outros exemplos são as proteínas de *Heat-shock* recombinantes como a Hsp70 e a histona recombinante H1 da *Leishmania brasiliensis*, mas que apresentaram reação cruzada para o soro de pacientes com a doença de Chagas, o que diminui a sua especificidade diagnóstica (83).

No entanto, é de se notar outros estudos investigativos quanto as histonas H2A, H3, H2B e H4, as quais evidenciaram títulos significativos de anticorpos detectáveis na LVC, alcançando desde cães sintomáticos aos assintomáticos. Desta forma e muito importante conhecimento e a caracterização da funcionalidade dessas proteínas permitem uma abordagem relevante quanto a melhora no potencial diagnóstico, acompanhamento e monitoramento dos pacientes, estudos sobre a correlação de títulos de anticorpos que podem fornecer informações úteis sobre a doença (80,83).

#### 1.6.1 Rab 1 – GTPase

O citoplasma de uma célula eucariótica é tipicamente povoado com uma variedade de organelas membranosas e uma vasta gama de fatores de tráfego entre estas. Este fluxo contínuo ocorre por meio de um transporte vesicular que, apesar da complexidade das vias interconectadas e diversidades de componentes transportados, garante rigorosamente a entrega adequada e precisa(84).

Várias pesquisas procuram compreender os mecanismos moleculares pelos quais este tráfego é regulado, de tal forma que assegura a fidelidade e a eficiência deste transporte. As contribuições de uma grande quantidade de laboratórios descreveram mecanismos de seleção de carga, brotação e cisão de vesículas de suas membranas doadoras, a variedade de revestimentos que se associam a essas vesículas, o mecanismo pelo qual elas são transportadas ao longo de componentes do citoesqueleto, a associação das vesículas com a membrana alvo correta através de complexos ancoramentos e, finalmente, o mecanismo de fusão vesicular com a membrana alvo através da ação de receptores solúveis de proteína de fixação NSF (SNAREs) e suas máquinas reguladoras associadas (84,85).

Este tráfego intracelular tem as Rab GTPases como reguladoras mestras. Elas desempenham a interação com diversas proteínas efetoras, são responsáveis por seleção de carga, promoção das vesículas e por averiguar o local correto da fusão (86).

As proteínas Rab constituem a maior família de pequenas GTPases monoméricas Ras com mais de 70 identificações em eucariotos, que podem ser classificados em vários grupos filogenéticos e funcionais (87). Dentro da superfamília Ras as Rab protegem a carga vesicular e comporta-se como interruptores moleculares associados à membrana ver figura 8 (88).

Estudos sugerem que as proteínas Rab facilitam e regulam a ancoragem vesicular associados a interação das SNARES. Elas circulam entre membrana e citosol. Quando ligadas à GDP ficam em estado inativo e permanecem no citosol e quando ligadas ao GTP encontram-se no seu estado ativo e associado à membrana de uma organela ou uma vesícula de transporte (84,85,89,90).

### 1.6.2 ADF/Cofilina

A actina é uma proteína citoesquelética ubíqua altamente conservada que é essencialmente necessária em vários processos celulares importantes, como a divisão celular, a mobilidade celular, o tráfego intracelular e a

endocitose (91,92). Ela existe em duas formas principais: a forma globular monomérica (G-actina) e a forma filamentosa funcional a (F-actina). A dinâmica da montagem e desmontagem dos filamentos de actina é regulada por um grupo específico de proteínas de ligação de actina, das quais o fator de despolimerização de actina (ADF/Cofilina) é um componente importante (93).

A proteína ADF/cofilina está presente em todos os eucariotos e tem sido implicado em várias atividades celulares baseadas em actina, como motilidade celular e citocinese (94). A principal função fisiológica destas proteínas é a despolimerização de filamentos de actina a partir de suas extremidades coesivas e, assim, promover a dinâmica do filamento (95).

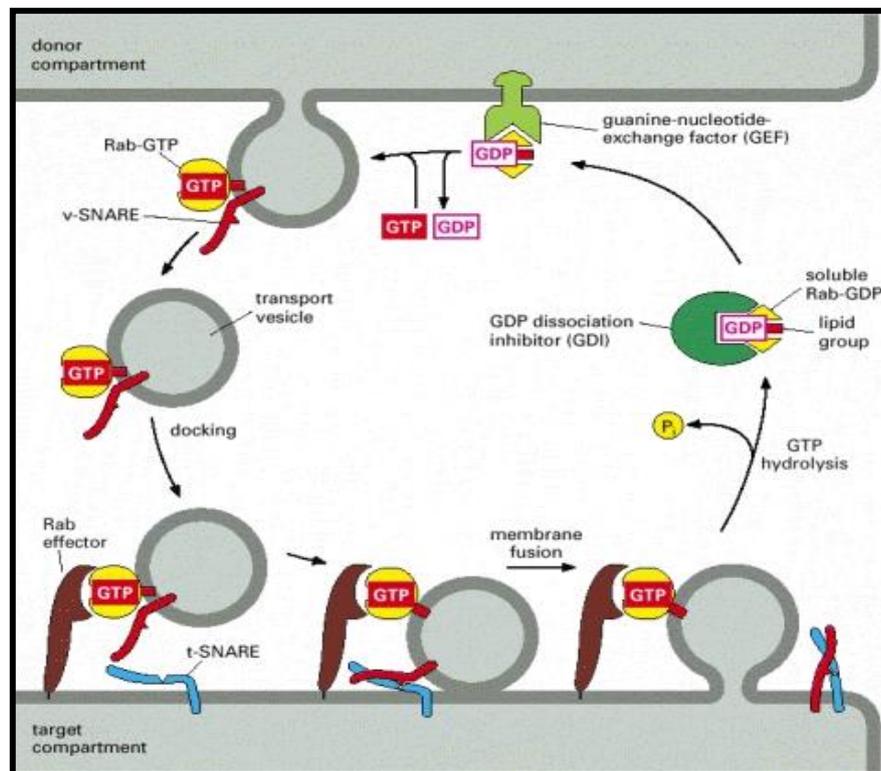
Eucariotos superiores expressam várias isoformas de ADF/Cofilina de forma específica de tecido, que muitas vezes possuem diferentes funções celulares (93). Estas proteínas também foram identificadas em vários organismos eucariotas inferiores, tais como *Acanthamoeba*, *Dictyostelium*, *Toxoplasma*, *Leishmania* e outros (96).

Os parasitas de *Leishmania* expressam apenas uma isoforma de ADF/Cofilina, que é essencial na montagem e motilidade flagelar (96). A caracterização detalhada de *Leishmania* ADF/Cofilina revelou que ela se liga facilmente às formas monoméricas e filamentosas da actina de *Leishmania* e também despolimeriza a actina filamentosa em monómeros. À medida que a ADF/Cofilina e actina em células de *Leishmania* são amplamente polarizadas elas se direcionam e concentram-se na região do bolso flagelar, onde o corpo basal está localizado, e onde é onde a divisão celular é iniciada. Em tripanosomatídeos a duplicação do corpo basal é seguida da formação do flagelo e da divisão do bolso flagelar. Assim, a dinâmica entre ADF/Cofilina e actina é essencial na divisão celular de *Leishmania* (96,97).

Em um estudo recente observou-se que a deleção do gene ADF/Cofilina em promastigotas de *Leishmania* resulta em células completamente imóveis, com flagelos curtos e contorcidos com atividade prejudicada. Além do mais, observou-se diminuição do crescimento das células mutantes comparadas com as do tipo selvagem e separação tardia do

corpo basal e do cinetoplasto, comprometendo a divisão celular, por atraso na divisão do bolso flagelar que está diretamente relacionado à redução do tráfego vesicular e a deterioração da dinâmica de actina. Isto demonstra que a dinâmica actina – ADF/Cofilina é necessária para vários eventos iniciais à divisão celular em *Leishmania*.

Vários estudos mostraram que a membrana do bolso flagelar é bioquimicamente distinta do flagelo ou membrana pelicular e central para o tráfego de várias proteínas ancoradas por GPI (98). Estes eventos de tráfego envolvem a reciclagem de várias proteínas importantes como clatrina e a Rab GTPase que mantêm o bolso flagelar em um estado altamente ativo e dinâmico (99).



**Figura 8** - Função das proteínas Rab na ancoragem de vesículas de transporte. Um fator de troca guanina nucleotídeo (GEF) da membrana doadora reconhece a proteína Rab específica e a induz a troca de GDP por GTP, que altera a conformação da Rab e auxilia no ancoramento. Após a liberação da vesícula a Rab será reconhecida pela proteína efetora do compartimento alvo, assim as proteínas transmembrânicas v-SNARE (Vesícula) e a t-SNARE da membrana alvo se ligam e formam o complexo trans SNARES que prendem as duas membranas juntas e favorece a fusão. Após a fusão a proteína Rab hidrolisa gtp liberando rab-gdp no citosol que ficara ligada a um inibidor de dissociação à GDP até ela poder ser reconhecida por proteínas apropriadas da membrana doadora e enfim ser reutilizada. **Fonte:** Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. 2002.

## 2. JUSTIFICATIVA

Várias proteínas de secreção clássica e de superfície da *Leishmania* foram testadas como potenciais antígenos, visando fatores de virulência, mecanismos de invasão e imunogenicidade (80,100). Mas, estudos recentes têm demonstrado que proteínas intracelulares, responsáveis pela manutenção do parasito, são capazes de modular a resposta imune do hospedeiro e apresentaram-se imunogênicas, principalmente por sofrerem menos pressão seletiva. Durante a infecção, estas proteínas são liberadas após a destruição de amastigotas intracelulares por macrófagos ativados, mas, também podem ser secretadas por caminhos de secreção não-clássicos (101,102). Vários antígenos intracelulares, tais como proteínas de choque térmico, as proteínas ribossômicas e as histonas foram investigadas como possíveis vacinas contra diferentes espécies de *Leishmania* e marcadores diagnósticos. Um outro antígeno imunodominante, a proteína ribossomal ácida (Lip0), componente estrutural da subunidade maior do ribossomo foi reconhecida por soros de humanos e cães infectados por *leishmania* (80,103,104).

Um recente estudo proteômico revelou que mais de 50% das proteínas de *Leishmania* fazem parte das vias de secreção não-clássicas também conhecido por exossomos (102,105). E neste mesmo estudo as proteínas Rab1-GPTase e ADF/Cofilina foram surpreendentemente classificadas como de secreção de vias não clássica e como potenciais imunomoduladores (102,105–110). Estudos adicionais que permitam a caracterização detalhada destas proteínas, podendo identificá-las como novos antígenos de *Leishmania*, irá favorecer o aprimoramento do teste diagnóstico diferencial da doença por testes sorológicos.

### 3. OBJETIVO GERAL

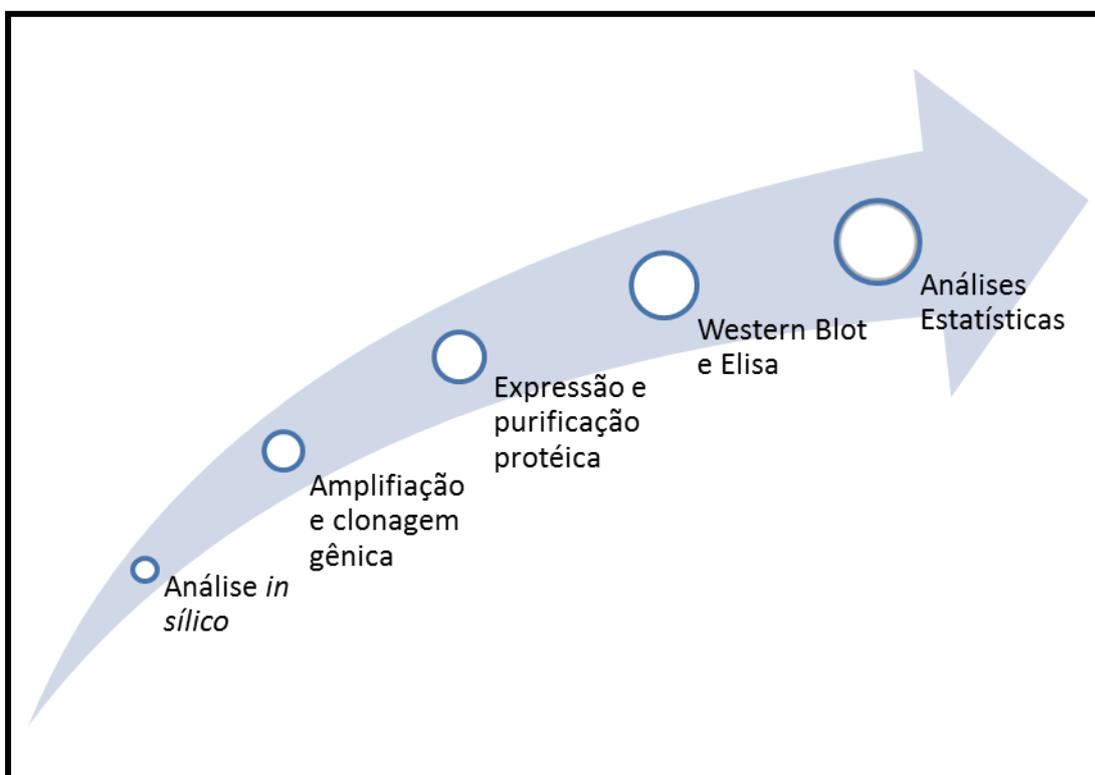
Avaliar o potencial das proteínas Rab-1 GTPase e ADF/Cofilina do organismo *Leishmania infantum*, identificadas respectivamente como LINJ\_27\_0620 e LINJ\_29\_0520 no banco de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI) (74), como potenciais alvos no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina.

#### 3.1 Objetivos Específicos

- Selecionar proteínas alvo a partir da literatura e dados prévios gerados por estudos proteômicos;
- Identificar e avaliar, *in silico*, regiões relevantes conservadas e homologia nas sequências gênicas e peptídicas das moléculas selecionadas;
- Clonar e expressar os genes das proteínas selecionadas em sistema procariótico (*Escherichia coli*);
- Purificar proteínas recombinantes;
- Avaliar o desempenho destas proteínas recombinantes isoladas quanto à capacidade de serem reconhecidos por soros de sangue periférico de cães com leishmaniose visceral, por meio do teste do tipo enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), que permite a detecção de anticorpos específicos.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento experimental deste trabalho pode ser resumido conforme a Figura 9. Em que se evidencia uma progressão, cujas etapas seguem uma tendência ascendente em cada processo segmentando o fluxo do trabalho.



**Figura 9** - Delineamento experimental. **Fonte:** Santos, 2017.

1

##### 4.1 Amostras Biológicas

Todos os procedimentos envolvendo o uso de amostras biológicas de animais obedeceram às normas dos Comitês de ética em pesquisa. O projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília sob o registro UnBDoc nº 106668/2014 em anexo ao final desta dissertação.

Os soros de cães infectados por *L. infantum*, e não infectados foram cedidos gentilmente pela professora Dr.<sup>a</sup> Cecília Beatriz Fiuza Favali do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília – UnB. As amostras foram armazenadas a -20°C. Posteriormente, estas foram analisadas quanto a reatividade de anticorpos específicos contra as proteínas expressas e purificadas: Rab-1 GTPase e ADF/Cofilina.

#### 4.2 Análises *in silico*

As análises *in silico*, foram submetidas por meio da utilização das sequências proteicas e gênicas das proteínas candidatas Rab-1 GTPase e ADF/Cofilina, em formato FASTA, obtido nos bancos de dados NCBI (74) ou Tritypdb (111).

Prontamente, as sequências foram submetidas a preditores disponíveis online. O *SignalP Server v. 4.1* (112) e o *PrediSi* (113) avaliaram a predição de peptídeos sinais das proteínas candidatas e ferramentas disponíveis nas *web pages*: (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e (<http://www.predisi.de/>). O *SignalP 4.1* baseia-se em dois tipos de redes neurais: *SignalP-TM*, que avalia sequências transmembranares no conjunto de dados, e o *SignalP- no TM* sem estas sequências. O D-cutoff, muda de acordo com o grupo de organismo e método, neste estudo o limiar como caracteriza proteínas de organismo eucarioto e que não são transmembranares o limiar foi de 0.450. O *PrediSi* prevê sequências peptídicas e suas posições de clivagem em proteínas, o método fundamenta-se em uma abordagem de matriz de peso de posição que é melhorada por uma correção de frequência que leva em consideração a tendência de aminoácidos presentes na proteína. O software foi programado usando sequências extraídas da versão mais recente do banco de dados SwissProt. Ele processa os dados em uma escala numérica de 0 a 1, e possui um limiar fixo de escore em 0,5. Os escores que atingirem acima deste limiar são afirmativos para o teste.

Para previsão de fosforilações empregou-se o NetPhos 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>). Este servidor prevê fosforilação de serina, treonina ou tirosina em proteínas eucarióticas usando um conjunto de redes neurais e são feitas para as seguintes quinases: ATM, CKI, CKII, CaM-II, DNAPK, EGFR, GSK3, INSR, PKA, PKB, PKC, PKG, RSK, SRC, cdc2, cdk5 e p38MAPK. Ele ainda, possui um limiar fixo de escore em 0,5. (114) Quanto a glicosilação o YinOYang 1.2 que prevê O- $\beta$ -GlcNac em sequências de proteínas eucarióticas (115). Os seus dados também são gerados em uma escala de 0 a 1 (entretanto, seu limiar de escore é variável). E o GlycoEP (<http://www.imtech.res.in/raghava/glycoep/>) cuja a escala varia de -2 a 2, e limiar fixo em 0,0 (116).

Por fim, para complementar a análise *in silico* realizou-se predição linear e conformacional para células B, das referidas proteínas, pois a identificação e caracterização de epítomos em células B desempenham um papel importante no projeto de testes imunodiagnósticos, produção de vacinas e produção de anticorpos monoclonais.

Para um resultado mais confiável realizou-se análise linear em três softwares distintos e análise conformacional em um, por meio de comparação das previsões em múltiplos métodos. A análise linear foi realizada pelos softwares IEDB disponível em <http://tools.iedb.org/bcell/>. Este método é baseado na combinação do modelo oculto de Markov e duas escalas de aminoácidos: Hidrofilicidade e estrutura secundária de Levitt (117). O ABCpred prevê epítomo de células B em uma sequência de antígeno usando uma rede neural artificial, o mesmo está disponível na home page: ([http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/ABC\\_submission.html](http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/ABC_submission.html)) (118). E o BCPREDS (<http://ailab.ist.psu.edu/bcpred/predict.>) que permite ao usuário a seleção entre três métodos de previsão: método AAP de Chen et al 2007 (119); o BCPred de EL-Manzalawy et al 2008 (120) ou o FBCPred também de EL-Manzalawy et al 2008 (121).

### 4.3 Reação em Cadeia da Polimerase

A Reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction-PCR*) é um método de amplificação de DNA (ácido desoxirribonucleico). Para isto utilizou-se oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que reconhecessem e se anelassem às sequências específicas do DNA genômico correspondentes às proteínas Rab-1 GTPase e ADF/Cofilina.

Os *primers* foram desenhados conforme as sequências nucleotídicas dos RNAm, XM\_003392601.1 e XM\_001466535.1 disponibilizada nos respectivos bancos de dados NCBI e TritypDB da cepa JPCM5 *Leishmania infantum* (74) (111). Os sítios de restrições de atuações enzimáticas é um outro fator preponderante para a finalização dos *primers*, estes sítios foram associados aos vetores de expressão utilizados e a exclusão da possibilidade de cortes inespecíficos nos genes das proteínas estudadas. Para isto, consultou-se o NEBcutter v. 2.0 disponível na home page: ([http://nc2.neb.com/NEBcutter2/.](http://nc2.neb.com/NEBcutter2/)) É uma ferramenta que aceita sequências de DNA, para avaliação e produção de um relatório abrangente de enzimas de restrição e seus respectivos pontos de cortes (122).

Na Tabela 1 segue a relação das enzimas de restrições associadas aos seus respectivos plasmídeos, que foram pesquisadas e relacionadas com as possíveis limitações às sequências nucleotídicas das proteínas estudadas. E na Tabela 2 estão descritos os iniciadores que foram adquiridos e sintetizados pela empresa de biotecnologia Integrated Dna Technologies (IDT). Os primers obtidos na forma de liofilizados foram reconstituídos conforme orientações do fabricante com água ultrapura para concentração final de 100  $\mu$ M, e armazenados a -20°C. Desta reconstituição realizou-se alíquota com uma nova diluição para uma concentração final de 10  $\mu$ M, este foi utilizado para realização da PCR.

**Tabela 1** - Vetores de expressão e sítios de restrição enzimática.

VETORES DE EXPRESSÃO		
	pET 28a (+)	pLESXY neo2
ENZIMAS DE RESTRIÇÃO	<i>Xho</i> I	<i>Nhe</i> I
	<i>Hind</i> III	<i>Msp</i> C I
	<i>Sal</i> I	<i>Sal</i> I
	<i>Eco</i> R I	<i>Kpn</i> I
	<i>Bam</i> H I	<i>Not</i> I
	<i>Nco</i> I	<i>Nco</i> I
	<i>Bgl</i> II	<i>Bgl</i> II
	<i>Nde</i> I	(-)
	<i>Xba</i> I	(-)

Fonte: SANTOS, GLS 2017.

**Tabela 2** - Descrição dos Oligonucleotídeos

PRIMERS	SEQUÊNCIAS	ENZ	<i>T<sub>m</sub></i> °C	PB	GC %
Rab-1	TTT <b>G'GTAC'</b> C GCA GCA GCT GTC TTC	<i>Kpn</i> I	64,7	30	50
Reverse	CTT CTT				
Rab-1	TTT <b>C'CATG'</b> GCC GCT GAG TAC GAC	<i>Nco</i> I	63,2	32	53,1
Forward	TAC CTC TTC				
Cofilin -	TTT <b>G'GTAC'</b> C CAC GCT ACG ATG GAG	<i>Kpn</i> I	64,4	30	53,3
Reverse	CCT TAC				
Cofilin	TTT <b>C'CATG'</b> GCG ATA TCT GGT GTT	<i>Nco</i> I	63,2	30	50
Forward	ACG CTC G				

Fonte: SANTOS, GLS 2017.

As concentrações dos reagentes para a reação em cadeia polimerase estão descritas a seguir: 0,5 ng/μL de DNA genômico, ofertado pela professora Dr<sup>a</sup>. Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo da Universidade de Brasília

– UnB, tampão 10x (100 mM Tris-HCl pH 8.5, 500 mM KCl); 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 μM de cada primer; 0,2 mM dNTPs e 0,5 U/μL Taq DNA polimerase (Ludwig Biotec) incluídos para um volume final de 25 μL.

As reações foram realizadas no termociclador LifeTouch Bioer, de acordo com as seguintes etapas: a fase de desnaturação em que faz a separação da cadeia de DNA através da quebra das pontes de hidrogênio, dando origem a duas fitas simples de DNA foi de 94 °C; a fase de hibridização ou anelamento, em que a temperatura é reduzida para o pareamento dos iniciadores nas respectivas regiões específicas na fita molde de DNA, foi de 55,6 °C e a fase de extensão em que a temperatura é elevada à 72 °C em que a enzima Taq polimerase exibe ótima atividade de síntese da nova molécula. Abaixo o programa configurado e ajustado no termociclador.

**Tabela 3** - Programação para amplificação em técnica PCR

PROGRAMA		
	Temperatura °C	Tempo
	94	4 min
Ciclo 30 x	94	30 seg
	55,6	30 seg
	72	1 min
	72	5 min
	4	∞

Fonte: SANTOS, GLS 2017.

#### 4.4 Análise Eletroforética

Os produtos de PCR, de extração de DNA plasmidial, de digestão enzimática, de purificação após digestão foram visualizados e analisados em fotodocumentador após eletroforese em gel de agarose a 0,8% com brometo de etídio com concentração de 0,3 mg/mL e tampão borato de sódio 20x (0,11 M de H<sub>2</sub>BO<sub>3</sub>, 0,20 M de NaOH, pH 8,0), subsequentemente diluído para 1x.

#### 4.5 Preparo de Células Competentes

Células competentes são aquelas que se encontram em um estado fisiológico que a torna capaz de receber um DNA exógeno. O tratamento com soluções com íons: cloreto de cálcio atuam neutralizando as cargas negativas da membrana e do DNA, alterando a permeabilidade da parede celular permitindo a passagem do DNA exógeno pela membrana mediante calor.

Desta forma as bactérias selecionadas para realização deste trabalho foram: *Escherichia coli* das linhagens, DH5- $\alpha$ , TOP 10 (Thermo Fisher Scientific) e Rosetta BL21(DE3) pLYss™, as duas primeiras para clonagem do gene amplificado das proteínas Rab1-GTPase e ADF/Cofilina, pois possuem múltiplas mutações que permitem transformação de alta eficiência, como a mutação endA1 na DH5- $\alpha$  que permite a degradação da endonuclease inferior, o que garante maiores taxas de transferência de plasmídeos.

E a Rosetta BL21(DE3) pLYss™ para expressão proteica, esta cepa é adequada para a produção de proteínas a partir de genes alvos clonados em vetores pET por indução com IPTG, elas ainda expressam a lisozima T7 que suprime mais a expressão basal da RNA polimerase T7 antes da indução, estabilizando os recombinantes de pETs que codificam proteínas alvo que afetam o crescimento e a viabilidade. Todas estas linhagens foram submetidas ao protocolo de preparo de células competentes de acordo com

Current Protocols in Molecular Biology com adaptações (123). As bactérias estavam estocadas à  $-80^{\circ}\text{C}$  em glicerol a 25%.

Assim, realizou-se um pré-inóculo destas, sendo  $5\mu\text{L}$  para 5 mL de meio Luria Bertani (LB). Depois incubou-se sob agitação 180 rpm à  $37^{\circ}\text{C}$  *overnight*. No dia seguinte acrescentou-se 1 mL deste pré-inóculo a 100 mL de LB. Incubou-se sob as mesmas condições do pré-inóculo até que se atingisse a densidade ótica de 0,3 a  $600\text{nm}$ .

A cultura foi então dividida em dois tubos polipropileno de 50 mL estéreis [previamente resfriados em gelo]. Os tubos com as culturas foram deixados em repouso por 10 minutos a  $4-8^{\circ}\text{C}$ . Logo após, as culturas foram centrifugadas a  $5.000 \times g$  por 3 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Descartado o sobrenadante o pellet das bactérias foram ressuspensas gentilmente com 10 mL de solução gelada  $\text{CaCl}_2$  (Hepes 10 mM,  $\text{CaCl}_2$  60 mM e glicerol a 15% (v/v), Ph 7,0). A ressuspensão foi deixada em repouso por 30 minutos em gelo e centrifugada a  $1.100 \times g$  por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  e novamente o sobrenadante foi desprezado e então repetiu-se os dois últimos passos. Finalmente o pellet foi ressuspendido com 2 mL da mesma solução de  $\text{CaCl}_2$ , que foram alíquotadas tubos de 0,5 mL, e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.6 Clonagem dos Produtos de PCR em Plasmídeo pGEM®-T Easy

Ulteriormente, à amplificação dos genes Rab1-GTPase e ADF/Cofilina, com amplicons de 603pb e 420pb respectivamente, confirmados em eletroforese de gel de agarose. Estes amplicons foram ligados ao plasmídeo de clonagem pGEM®-T Easy (Promega), por meio da T4 DNA ligase, à  $4^{\circ}\text{C}$  e repouso por 12 horas. A descrição da ligação segue conforme Tabela 4.

**Tabela 4** - Protocolo de Ligação

<u>REAGENTES [ ]</u>	<u>Volumes</u>
Tampão 2x, T4 DNA Ligase	5 µL
Vector pGEM®-T Easy (50 ng)	1 µL
Amplicon (Rab1-GTPase ou ADF/ Cofilina)	3 µL
Enzima T4 DNA ligase 3 unidades/µL	1 µL
Vol. Final	10 µL

**Fonte:** Promega, 2015.

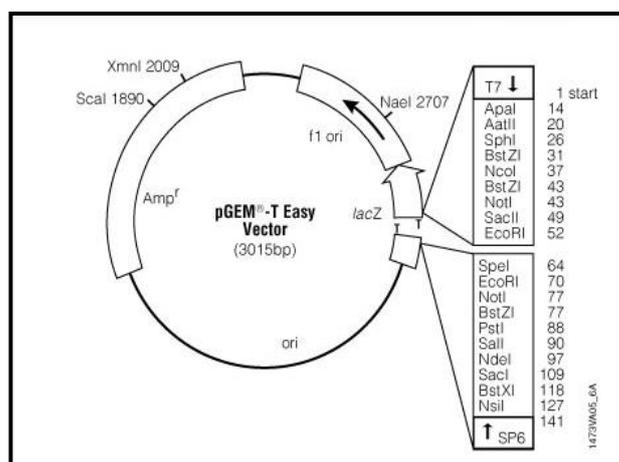
#### 4.7 Transformação Bacteriana

A transformação bacteriana foi realizada em três momentos distintos: um para clonagem gênica com pGEM®-T Easy e as outras duas para estoque e extração do DNA plasmidial dos vetores de expressão pLESXY- neo2 e pET-28a (+) com genes das proteínas Rab1- GTPase e ADF/Cofilina.

As etapas das transformações foram baseadas no *Protocols and Applications Guide, Third Edition*, que sugeriu as seguintes etapas: para 50 µL de cultura de *E. coli* DH-5α ou Rosetta BL21(DE3)-pLYss™, acrescentou-se 3-5 µL do produto da ligação dos devidos vetores (pGEM®-T Easy, pLEXSYneo-2 ou pET-28a(+)), incubou-se a mistura por 30 minutos em gelo. Em seguida, foram levados ao banho maria a 42°C por 90 segundos e incubados imediatamente em gelo por 5 minutos. Adicionou-se 250 uL de meio SOC (0,5% de extrato de levedura, 2% de triptona, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de MgSO<sub>4</sub> e 20 mM de glicose). Deixou-se incubadas a 37°C por 1 h e 30 min sob agitação de 180 rpm.

Após o crescimento das bactérias transformadas com os respectivos genes pipetou-se e plaqueou-se 100 µL da cultura em meio LB sólido com

alguns diferenciais seletivos para cada vetor. No caso do pGEM®-T Easy a placas continham ampicilina a 50 µg/mL, e foram aplicados sobre à sua superfície 40µL de 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo conhecido com Xgal [20 mg/µL] e 40µl de 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo, IPTG [100 mM]. Para o vetor pLESXY-neo2, utilizou-se somente a ampicilina nas mesmas concentrações. No entanto, para o vetor pET-28a(+) transformado na cepa Rosetta BL21(DE3) pLYss™ utilizou-se canamicina 35 µg/mL e cloranfenicol 33 µg/mL. Cada vetor possui um marcador de seletividade que permite a identificação da bactéria que recebeu o plasmídeo, que são genes que codificam proteínas que degradam o antibiótico, conferindo resistência às bactérias transformadas (124).



**Figura 10** - Mapa do Vetor de Clonagem pGEM®-T Easy sítios de restrições utilizados *NcoI* e *KpnI*. **Fonte:** Promega, 2015. São vetores convenientes para a clonagem de produtos de PCR. A adição de uma timidina na região 3'T melhora a eficiência da ligação. A presença dos promotores de T7 RNA polimerase e SP6 flaqueiam uma região de clonagem. E a inativação pela presença do inserto inativa a enzima região codificadora da enzima β-galactosidase. Permitindo a seleção de colônias por triagem branco/azul.

#### 4.8 Seleção bactérias recombinantes

As bactérias transformadas com plasmídeo pGEM®-T Easy foram selecionadas por distinção de cor das colônias. Pois, as colônias azuis o gene *lacZ'* permanece intacto e a betagalactosidase ativa cliva o X-gal, enquanto

que as brancas confirmam a presença do inserto, do gene da proteína, e o gene lacZ' fica segmentado desta forma betagalactosidade inativa não realiza clivagem do X-gal e as colônias ficam brancas.

No entanto a conduta de seleção adotada para as transformações realizadas com pLEXY neo-2 ou pET-28a(+) foi por intermédio de pcr para confirmação do inserto, pois estes não possuem o gene lacZ'.

As colônias foram então cultivadas em meio LB líquido com os respectivos antibióticos de seleção nas mesmas concentrações descritas no item 4.7 *transformação bacteriana*, sob agitação a 37 °C *overnight*.

#### 4.9 Extração de DNA plasmidial

A obtenção dos plasmídeos pGEM®-T Easy + inserto Rab1-GTPase, pGEM®-T Easy + inserto ADF/Cofilina, pLEXY-neo2 + inserto Rab1-GTPase, pLEXY-neo2 + inserto ADF/Cofilina, pET-28a(+) + inserto Rab1-GTPase e pET-28a(+) + inserto ADF/Cofilina foi previamente baseado no Current Protocols in Molecular Biology com adaptações (123). Retratado a seguir: as culturas foram centrifugadas para a obtenção do pellet a 14.000 x g por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado. O pellet bacteriano foi ressuspendido com 100 µL tampão de ressuspensão (EDTA 10 mM, glicose 50 mM e tris 25 m, pH 8,0), logo em seguida, acrescentou-se 200 µL de tampão de lise (NaOH 0,2 M, e lauril sulfato de sódio 0,1% g/L), aguardou a reação por 5 minutos, e e adicionou-se 150 µL de tampão de neutralização (acetato de sódio 3 M pH 5,4). As amostras foram levadas ao vortex por 2 segundos. Estas, repousaram em gelo por 5 minutos e centrifugou-se a 14.000 x g por 10 minutos, coletou-se o sobrenadante. A este foram adicionados 400 µL de clorofórmio gelado, subsequente foram agitadas no vortex por 3 segundos e repousaram em gelo novamente por 5 minutos. Centrifugou-se a 11.000 x g por 5 minutos à temperatura de 4 °C, pipetou-se a fração solúvel e a este foi adicionado 800 µL de etanol 95%. Repousou-se por 2 minutos em temperatura ambiente e centrifugou-se a solução em 14.000

x g por 20 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e acrescentou-se 200 µL de etanol 70% gelado, centrifugou-se por 2 minutos a 14.000 x g. Deixou-se os pellets seca a temperatura ambiente por aproximadamente 6 horas. Depois foram ressuspensos com água ultrapura e adicionou-se RNase 1% e deixou-se em repouso por 24 horas a 4 °C, e submeteu-se as amostras à eletroforese em gel de agarose 0,8% a 90 volts por 40 minutos.

#### 4.10 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 2 µL de amostra.

#### 4.11 Sequenciamento

As amostras das extrações dos plasmídeos pGEM®-T Easy + inserto Rab1-GTPase, pGEM®-T Easy + inserto ADF/Cofilina foram enviadas para sequenciamento no Laboratório de Biotecnologia da Pós-graduação em Ciências Genômica e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, a mesma utilizou o sequenciador ABI3130XI da Applied Biosystems. Após quantificação da extração plasmidial preparou-se as amostras com uma concentração final de 300 ng para um volume final de 5 µL e utilizou-se o oligonucleotídeo universal T7 promoter.

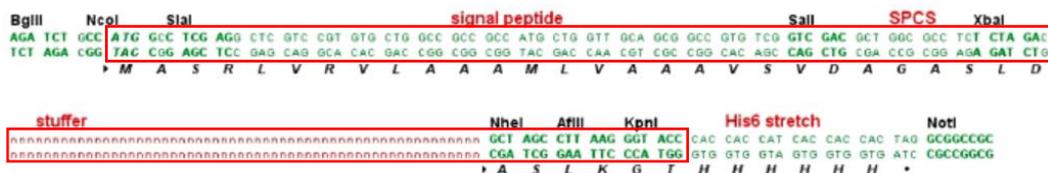
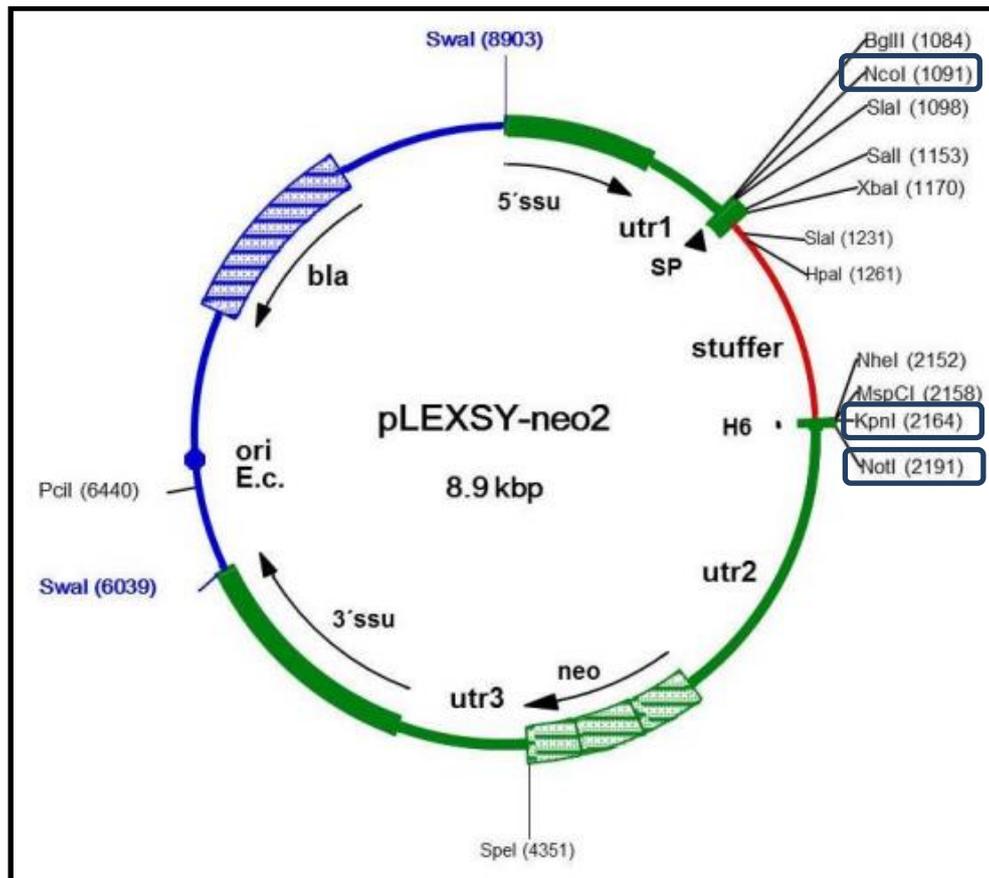
As análises dos dados do sequenciamento foram realizadas pelo programa Chromas v2.6 (Technelysium). Após visualização do cromatograma as sequências foram alinhadas com os dados do servidor *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) através do algoritmo *BLASTn* usando os parâmetros: em *Database* colocada opção *Others* (nr etc.) – *nucleotide collection* (nr/nt), *Organism* colocado para *Leishmania infantum JPCM5 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/>).

#### 4.12 Digestão com enzimas de restrição

Após clonagem e confirmação do sequenciamento dos insertos alvo, em pGEM®-T Easy, realizou-se a retirada destes insertos do plasmídeo com as enzimas de restrição *NcoI* e *KpnI* com tampão B5 (Jena Bioscience). Para subclonagem no plasmídeo pLESXY-neo2, este por sua vez foi digerido com as enzimas de restrição *NcoI* e *KpnI* para remoção do stuffer, e para gerar extremidades coesivas compatíveis aos dos insertos removidos, permitindo a ligação do inserto ao respectivo vetor. A ligação foi realizada conforme a descrição na Tabela 3. Após a confirmação do inserto no plasmídeo, por PCR, realizou-se uma nova digestão. Desta vez, com as enzimas *NcoI* e *NotI*, que como resultado carrega a sequência de nucleotídeos que codifica a cauda de 6 histidinas que servirá como marcador para purificação das proteínas em coluna de afinidade conforme o mapa na Figura 11.

Os amplicons de cada proteína, agora, associados à cauda de histidinas, foram inseridos ao vetor de expressão pET-28a(+), que foi previamente digerido com as enzimas *NcoI* e *NotI* para ser compatível a inserção dos amplicons, os quais foram confirmados por PCR. Todas as etapas de transformação para descrição acima foram realizadas com *E. coli* DH-5 $\alpha$ . Conquanto, após a confirmação dos insertos no pET-28a(+), realizou-se extração plasmidial e uma nova transformação com Rosetta BL21(DE3)pLYsS™ e seguiu-se para expressão protéica.



**Figura 11** - Mapa do Vetor de Expressão pLexsy-neo2 com gene neo marcador. Codifica aminoglicosídeo fosfotransferase 3', que permite a seleção de cepas recombinantes com antibiótico. Em destaque (circulados em azul) os sítios de restrições utilizados. Os sítios *NcoI* e *KpnI* para inserção gênica. Os sítios *NcoI* e *NotI* para remoção do gene+6xhistidinas, utilizados para subclonagem.

#### 4.13 Expressão heteróloga das proteínas Rab1-GTPase e ADF/Cofilina

Após a transformação da *E.coli* Rosetta com pET-28a(+) + inserto Rab1-GTPase e pET-28a(+) + inserto ADF/Cofilina, as colônias crescidas em meio LB sólido foram selecionadas e cultivadas em meio LB líquido contendo 35 µg/mL de canamicina e 33 µg/mL de cloranfenicol, mantidas a 180 rpm e

a 37 °C. Deste meio retirou-se alíquotas de 500 µL para estoque em glicerol a 25% à -80 °C, para cultivos futuros. Retirou-se ainda 1 mL para cultivo em 15 mL em meio LB líquido com as mesmas concentrações de antibióticos, cerca de duas horas depois, quando a densidade atingiu o valor de 0,5 a expressão foi induzida por meio da adição de 0,5 mM de IPTG. E como controle negativo utilizou-se *E.coli* Rosetta com pET-28a(+) sem presença de inserto.

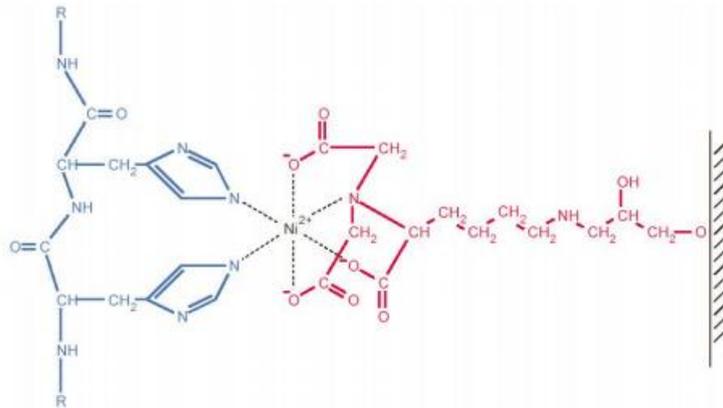
Para análise da expressão foram coletadas alíquotas de 1 mL das culturas nos correspondentes intervalos de tempo: 0 h (antes da indução com IPTG), 1h, 2h, 3h e 4h após a indução. Que foram centrifugadas a 9.000 x g por 2 minutos, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet com 100 µL do tampão de corrida 2x SDS-PAGE (1 M Tris-HCl pH 6,8; 1 mL 10% SDS; 4 mL Glicerol; 2 mL β-mercaptoetanol; 2,5 mL 1% azul de bromofenol; 500 µL dH<sub>2</sub>O para volume final de 10 mL), que foram armazenadas a -20 °C até a verificação por SDS-PAGE.

Com a determinação do melhor tempo de indução, analisou-se a solubilidade da proteína em meio hidrofílico. Adicionou-se 1 mL em 15 mL de meio LB líquido da bactéria transformada *E.coli* Rosetta com pET-28a(+) com os insertos, conforme descrito acima, durante período de 3h, posteriormente a cultura foi centrifugada a 5.000 x g por 15 minutos. O precipitado foi ressuspensão com 10 mL de tampão de lise e mantidas em gelo (12,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 0,5 M NaCl, pH 8,0). As suspensões celulares mantidas em gelo foram submetidas à lise celular utilizando o sonicador aparelho sonicador (BioLab) aplicando amplitude de 90% (com valor mínimo de 40%). O processo de sonicação foi realizado empregando-se 10 ciclos de 30 segundos. Os extratos protéicos brutos provenientes das células lisadas foram clarificados por centrifugação a 12.000 x g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e separado como extrato de proteínas solúveis em meio aquoso. Posteriormente, o pellet foi ressuspendido com a mesma solução de lise, no entanto, acrescidos 6 M de ureia, e repetiu-se a etapa da sonicação e centrifugação, em que o sobrenadante foi coletado e separado

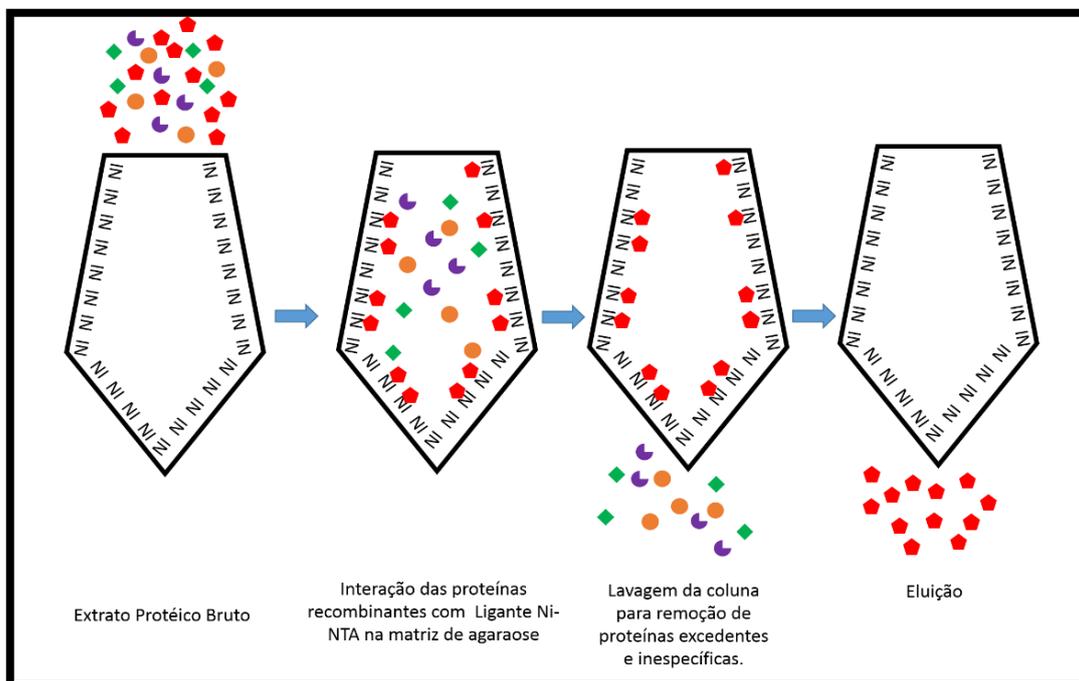
com extrato de proteínas insolúveis em meio aquoso. Este e aquele, foram armazenados a -20 °C até serem analisados em SDS-PAGE.

#### 4.14 Cromatografia de afinidade em resina de níquel

Para a purificação das proteínas recombinantes, utilizou-se da estratégia que emprega a cauda de Hexahistidinas como vantagem da cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (*Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography- IMAC*). A coluna de afinidade baseia-se na disposição de íons metálicos coordenados e imobilizados por um agente quelante, neste caso o ácido nitriloacético, que se liga em quatro pontos do níquel deixando livre dois pontos de ligação que vão interagir com o anel imidazólico que compõe a cauda de histidina. Este anel tem alta afinidade por íons metálicos, neste caso a interação será com a resina de Níquel (125). Desta forma, as proteínas ricas em histidinas (o que justifica a utilização do pLEXS<sub>Y</sub>-neo2, na subclonagem dos genes e inserção a estes a cauda de histidina) são seletivamente eluídas da resina carregada com íons metálicos e conseqüentemente isoladas por este método. A eluição das proteínas recombinantes é realizada por uma solução contendo o composto imidazol, que também possui o anel imidazólico, mas que tem maior afinidade que a da histidina. Pode-se entender melhor este mecanismo na Figura 12 e 13 em que há a representação da interação dos resíduos de histidina com a matriz Ni-NTA (Quiagen).



**Figura 12** – A Interação entre resíduos da cauda His6x e a matriz Ni-NTA. O ácido nitrilotriacético (vermelho), coordena-se com quatro dos seis sítios ligantes do Ni (II). Os dois sítios livres da esfera de coordenação interagem com os anéis imidazol da cauda de 6x histidinas das proteínas recombinantes em azul.



**Figura 13** - Método de purificação (IMAC). **Fonte:** Método Qiagen, imagem ilustrativa, SANTOS, GLS 2017.

Os sobrenadantes provenientes da lise celular com o extrato protéico bruto foram inseridos em uma coluna de 3 mL contendo 1 mL de resina de níquel *Ni-NTA superflow* (Qiagen) pré-equilibrada com tampão de lise (12,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl e 10 mM imidazol pH 8,0). A gravidade permite passagem do meio aquoso pela coluna. Depois a coluna foi lavada por 3x com 1 mL da solução de lavagem (12,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl e 40 mM imidazol pH 8,0). E depois aplicou-se 2x 1 mL de solução de eluição (12,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl e 250 mM imidazol pH 8,0). Durante as etapas descritas acima foram coletadas amostras do filtrado e eluição para avaliação em SDS-PAGE.

#### 4.15 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As análises de expressão, solubilidade e purificação das proteínas foram feitas por SDS-PAGE desnaturante unidimensional. As amostras das referidas etapas foram coletadas homogeneizadas em tampão 2x como descrito no item 4.13, antes da aplicação em gel as mesmas ficaram 5 minutos em temperatura submergidas em água em temperatura de ebulição, segundo o método de Laemmli (126).

Os géis possuíam 1 mm de espessura e a fase de separação foi de 12% de bis-acrilamida. A aplicação de 90 volts na fase concentradora e de 150 na fase separadora. Com o término da eletroforese os géis foram corados com Coomassie Blue R-250 (2,5 g de Coomassie Blue, 450 mL metanol, 100 mL ácido acético e volume final completado com adição de H<sub>2</sub>O para 1 L) e posteriormente descorados com Solução contendo Ácido Acético ,450 mL Metanol, ácido acético 100 mL, volume final de 1 L completado com H<sub>2</sub>O).

#### 4.16 Western Blotting

Amostras obtidas na etapa de purificação foram submetidas a SDS-PAGE, no entanto, com o término da separação eletroforética, realizou-se a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose de 0,45 µm, seguindo a metodologia de Towbin e cols (1979) (127). 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 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, 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-HisTag 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.

#### 4.17 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 100  $\mu\text{L}$ /poço, contendo 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  das proteínas purificadas dos itens, em tampão de revestimento (carbonato-bicarbonato) pH 9,6 (0,03 M  $\text{NaHCO}_3$  ; 0,015 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 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 100  $\mu\text{L}$ /poço de PBS pH 7,4 acrescidos de 10% de SFB (soro fetal bovino) da Gibco, seguido por incubação de 1h a temperatura ambiente. Ao final, repetiu-se o procedimento de lavagem. Os soros dos cães foram diluídos a 1:125, 1:250, 1:500 e 1:1000 em PBS/SFB 10% e adicionados 100  $\mu\text{L}$ /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  $\mu\text{L}$ /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  $\mu\text{L}$ /poço de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (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 15 minutos, essa foi interrompida pelo acréscimo de 50  $\mu\text{L}$ /poço de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . A leitura foi feita em espectrofotômetro (*BioTeK- Synergy HT*) a 490 nm. Para análise utilizou-se soro de 5 cães negativos e 5 cães positivos.

#### 4.18 Análise estatística

Os resultados obtidos pelo ELISA, item 4.13, foram analisados pelo programa Graphic Pad Prism 6 (GraphPad Software). O teste empregado foi o Two-way ANOVA por meio do método de comparação múltipla proposto por Fisher e o pós teste de Bonferroni. O valor alpha determinado foi de 0,05 e realizou-se o grubber test.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise proteômica tornou-se uma importante ferramenta complementar aos estudos da expressão gênica em diferentes estados fisiológicos de um organismo. Outra abordagem do proteoma é estudar as propriedades das proteínas, seus níveis de expressão, suas funções, interações, modificações pós-traducionais, tais como fosforilação, metilação, acetilação, clivagem proteolítica, entre outras (128,129).

No presente estudo várias destas modificações foram avaliadas *in silico*. Entretanto, não é possível afirmar que estas ocorram na proteína nativa. A exemplo, temos a análise de peptídeo sinal como referência às proteínas de secreção. No entanto, vários estudos têm reportado sobre mecanismos e componentes moleculares em uma via de secreção não-clássica (130).

Na via clássica de secreção a participação do retículo endoplasmático tem um papel fundamental no processamento e na liberação proteica (131). Por outro lado, na via não convencional estão envolvidos os exossomas que podem ser excretados como corpos multivesiculares ou lisossomos secretores (132). Dentro desse tipo de secreção estão incluídas as citocinas, fatores de crescimento e moléculas que participam na sinalização em processos fisiológicos como diferenciação e proliferação celular (133).

### 5.1 Predições *in silico* das proteínas Rab1-GTPase e ADF/Cofilina

Para a proteína Rab1-GTPase observamos as seguintes referências: locus gênico no cromossomo 27, RNAm identificada como XM\_003392601.1, com 603 pares de bases, 200 aminoácidos, massa molecular 22.123 kDa, proteína identificada como XP\_003392649.1 disponível por meio do acesso digital ao link: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10966266>). E para a ADF/Cofilina encontramos localização gênica no cromossomo 29, RNAm identificada como XM\_001466535.1, com 420 pares de bases, 139 aminoácidos, massa molecular 15.670 kDa, proteína identificada como

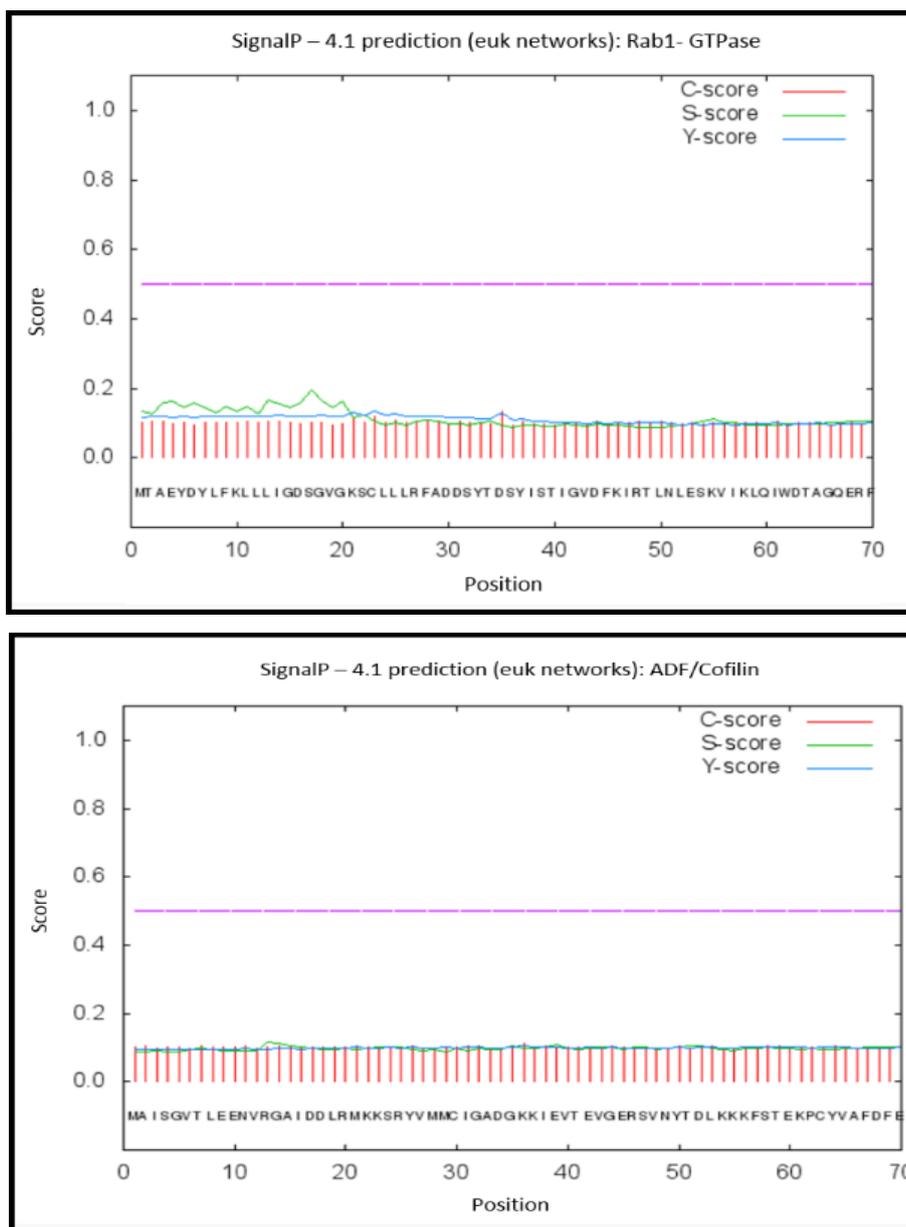
XP\_001466572.1 disponível por meio do acesso digital: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5070604>), dados importados para análise *in silico*.

### 5.1.1 Peptídeo Sinal

As proteínas têm um sinal intrínseco que regem o seu transporte e sua localização na célula. A localização subcelular de uma proteína é importante compreender a sua função e caracterização. Assim, a previsão destes sítios é muito importante (134).

O peptídeo sinal secretor é o sinal intrínseco mais conhecido em uma proteína, pois é essencial para translocação desta, através da membrana plasmática e da membrana do retículo endoplasmático, em eucariotos. É caracterizado tipicamente por uma sequência de 15-30 aminoácidos, geralmente, localizada na região N-terminal, que são cortados durante a translocação da proteína através da membrana (134).

Desta forma, as sequências proteicas obtidas nos bancos de dados NCBI (74) ou no Tritypdb (111) foram submetidas à análise *in silico* para predição de peptídeos sinais no SignalP server4.0 (112) e no PrediSi (113) e ambos possuem um limiar fixo de 0,5. A avaliação das duas proteínas nos respectivos softwares ficaram abaixo do score. Isto indica que não há presença de peptídeo sinal, designando-as como não secretáveis, por via-clássica conforme as figuras 14 e 15. Este resultado era esperado devido a própria descrição das funções das proteínas Rab1-GTPase e ADF/Cofilina em estudos anteriores. A primeira responsável pelo tráfego citoplasmático, e a segunda apresentando um importante papel na regulação da polimerização e despolimerização dos filamentos de actina.



**Figura 14** - Predição de peptídeo sinal da Rab1-GTPase e ADF/Cofilina. C-score (vermelho) score bruto oferece os escores que são treinados para distinguir locais de clivagem do peptídeo sinal nas proteínas. S-score (verde) oferece dados processados para distinguir as posições dentro do peptídeo sinal a partir da posição inicial. O Y-score (azul) pontuação combinada de clivagem, ou seja uma combinação entre a média geométrica do C-score e da inclinação do S-score. A linha em rosa é o limiar fixo de 0,5, scores alcançados acima deste limiar são afirmativas para peptídeos sinais. E pode-se observa que para as proteínas Rab1-GTPase (C-score= 0,133, Y-score= 0,133 e S-score=0,148) e ADF/Cofilina (C-score= 0,111, Y-score= 0,104 e S-score= 0,096) elas ficaram abaixo do limiar, sendo negativa para avaliação. **Fonte:** Software SignalP Petersen TN, et al. 2011 e Santos, GLS 2017.



**Figura 15** - Predição de peptídeo sinal da Rab1-GTPase e ADF/Cofilina. A linha central em azul é o limiar fixo de score 0,5, o PrediSi processa dados em uma escala numérica de 0 a 1. A linha em vermelho indica os scores alcançados pelas respectivas proteínas. Se esta ultrapassasse o limiar fixo de 0,5 seriam consideradas positivas para a avaliação quanto ao peptídeo sinal. O que não se evidenciou-se para as proteínas Rab1-GTPase (score: 0,1715) e nem para ADF/Cofilina (score: 0,000). Portanto, consideradas negativas para a avaliação. **Fonte:** Software PrediSi Hiller, K, e GLS, Santos, 2017.

Mas uma análise proteômica comparativa identificou 329 proteínas em exossomos de *Leishmania donovani*, representando mais de 52% da secreção global de proteínas deste organismo (102). Somados a este resultado temos um recente estudo do secretoma de *L. donovani* que surpreendentemente demonstrou que apenas 14% das proteínas continham peptídeo sinal para a via de secreção clássica N-Terminal (105).

Assim, a liberação de exossomo é o principal mecanismo para a secreção de proteínas utilizado pelo protozoário *Leishmania* como meio de exportar proteínas. E foram identificadas mais de 400 proteínas em exossomos, dentre as quais foram evidenciadas a Rab1 e a Cofilina (102,105).

Os exossomas parecem funcionar na comunicação de longo alcance e na modulação imunológica, visto que foram detectados em compartimentos citosólicos de macrófagos infectados. Estes secretavam seletivamente IL-8, e não TNF- $\alpha$ , favorecendo o crescimento do parasita. Pois, como vimos no item 1.3.2 Interação *Leishmania* e Vertebrados, o TNF- $\alpha$  controlaria o crescimento do parasita, por ativação da resposta do tipo Th1 (102,105).

As proteínas GP63 e EF-1 $\alpha$  são proteínas encontradas em vesículas segregadas e são provavelmente as responsáveis por esta imunomodulação na célula hospedeira. Ao acessarem o citosol, estas ativam as fosfatases de tirosina que regulariam negativamente a sinalização do IFN- $\gamma$  diminuindo o arsenal microbicida do macrófago como TNF- $\alpha$  e óxido nítrico (106).

A comparação com as proteínas exossomais de mamíferos demonstrou que os exossomas de *Leishmania* continham ortólogos como a Rab1 e Rab 11. As proteínas  $\alpha$ -tubulina e  $\beta$ -tubulina e proteínas de choque térmico HSP90 e HSP70 também foram evidenciadas em exossomos (105).

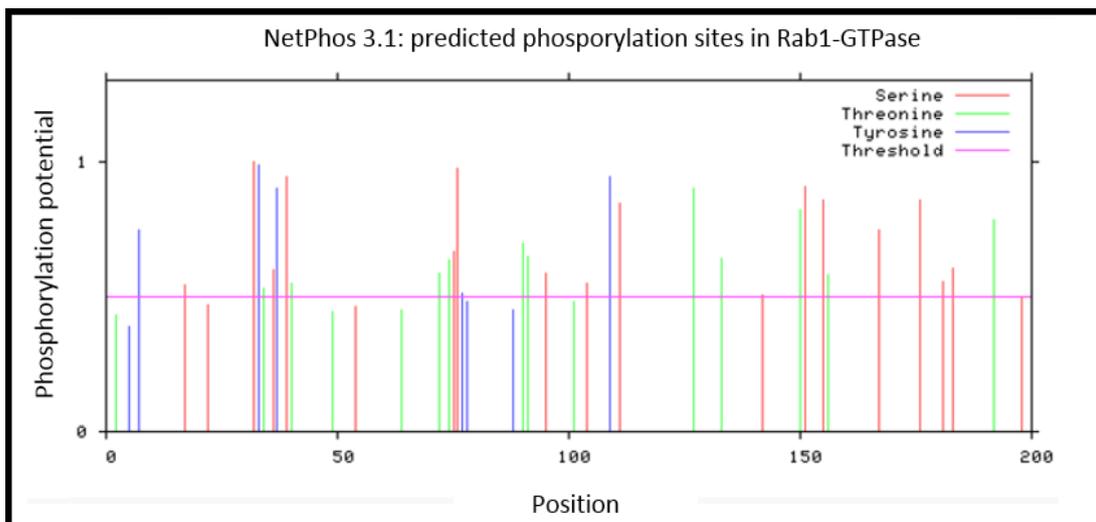
A presença da Rab1 em exossomos pode ser vinculada à sua função de direcionamento e controle do tráfego vesicular intracelular, quanto a cofilina a única relação encontrada foi que estava presente em microvesículas de células dendríticas, não ficando claro o seu papel. Assim, apesar de não serem evidenciadas a presença de peptídeo sinal, as proteínas estudadas parecem exercer um importante papel em vias de secreção não-clássicas.

### 5.1.2 Fosforilação e Glicosilação

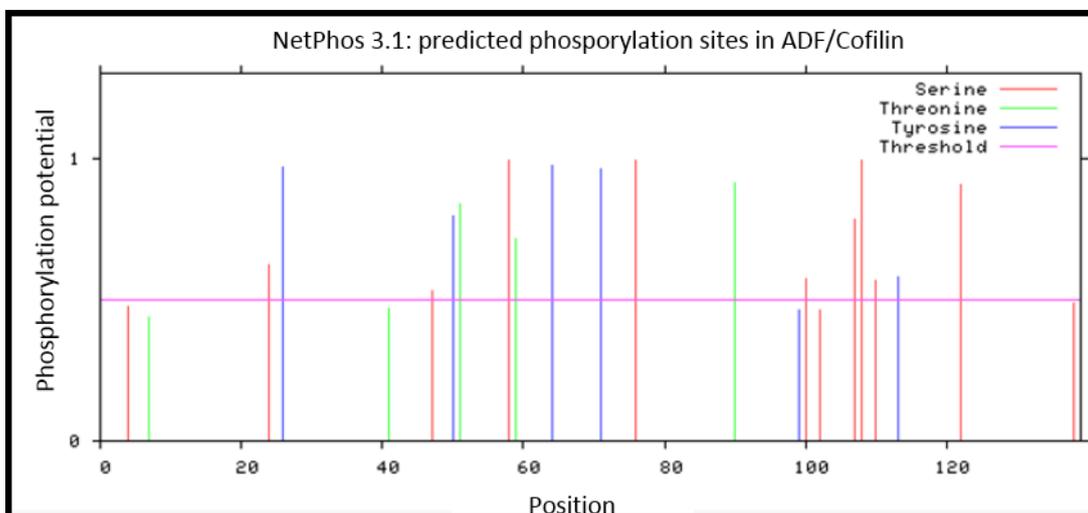
Realizou-se predições de dois tipos de modificações pós-traducionais, a fosforilação e a glicosilação. A fosforilação é catalisada por proteínas quinases por meio de transferência de um grupamento fosfato, para os resíduos de tirosina (Tyr), treonina (Thr) e serina (Ser), que são componentes fundamentais na cascata de sinalização, no controle intracelular e na regulação e transdução de sinais. O mecanismo regulador inclui vários fenômenos que vão desde alterações químicas e estruturais das proteínas até ao controle transcricional. Desta forma, um entendimento minucioso das proteínas sobre este aspecto é essencial para a sua caracterização, pois a fosforilação funciona como um interruptor para atividades enzimáticas (40,114,135).

As duas proteínas revelaram-se com vários sítios de fosforilação a Rab1-GTPase com quase o dobro do observado na ADF/Cofilin. Sendo 32 sítios de fosforilação evidenciados na proteína Rab1-GTPase destes 16 sítios de Serina (S), 5 de Tirosina (Y) e 11 de Treonina (T). Enquanto, que para a ADF/Cofilina obteve-se 17 sítios dos quais 9 Serina (S), 5 de Tirosina (Y) e 3 Treonina (T) evidenciados nas figuras 17 e 18. A detecção de fosforilações, além dos itens citados no parágrafo anterior, faz-se importante também devido as cargas negativas provenientes do fosfato que podem provocar mudanças abruptas na estrutura proteica (136).

A fosforilação proteica reversível é amplamente utilizada pelas células eucariotas como um mecanismo de sinalização e a família Rab de GTPases faz parte de um circuito complexo de transdução de sinais, mas pouco se sabe sobre os mecanismos subjacentes à sua participação nestas redes. Vários fosfo-Rab foram identificados, porém sem muita descrição funcional (137). Em um estudo verificou-se que a fosforilação, por exemplo, da Rab4 pela quinase cdc2 inibi a associação da proteína com as membranas endossômicas, por diminuir a interação desta com GDI (138).



**Figura 16** - Predição de fosforilações sobre a proteína Rab1-GTPase. Proteína com vários pontos de fosforilações. Sendo 16 sítios de Serina (S) em vermelho nas posições (17, 32, 36, 39, 75, 76, 95, 104, 111, 142, 151, 155, 167, 176, 181 e 183), 5 de Tirosina (Y) em azul nas posições (7, 33, 37, 77 e 109) e 11 de Treonina em verde nas posições (34, 40, 72, 74, 90, 91, 127, 133, 150, 156 e 192). A linha rosa é o limiar fixo de 0,5 scores acima disto são positivos para fosforilações. **Fonte:** Blom, N et al. 2004 e Santos, GLS, 2017.



**Figura 17** - Predição de fosforilações sobre a proteína ADF/Cofilina. Proteína com vários pontos de fosforilações. Sendo 9 sítios de Serina (S) em vermelho nas posições (24, 47, 58, 76, 100, 107, 107, 110 e 122), 5 de Tirosina (Y) em azul nas posições (26, 50, 64, 71 e 113) e 3 de Treonina em verde nas posições (51, 59 e 90). A linha rosa é o limiar fixo de 0,5 scores acima disto são positivos para fosforilações. **Fonte:** Blom, N et al. 2004 e Santos, GLS, 2017

A atividade da ADF/Cofilina é dependente de fosforilação de serina pela LIM quinase (LIMK), que é regulada pela via de sinalização Rho, assim como a Rab uma pequena GTPase ou pela quinase TESK. E ela está fortemente associada a várias funções biológicas celulares importantes, incluindo o ciclo celular, manutenção morfologia e locomoção. A fosforilação da proteína por uma destas quinases inativam a proteína, assim pode existir pelo menos duas vias paralelas para a regulação da atividade desta (109,139).

Assim a fosforilação parece exercer um papel chave na regulação da atividade das proteínas estudadas.

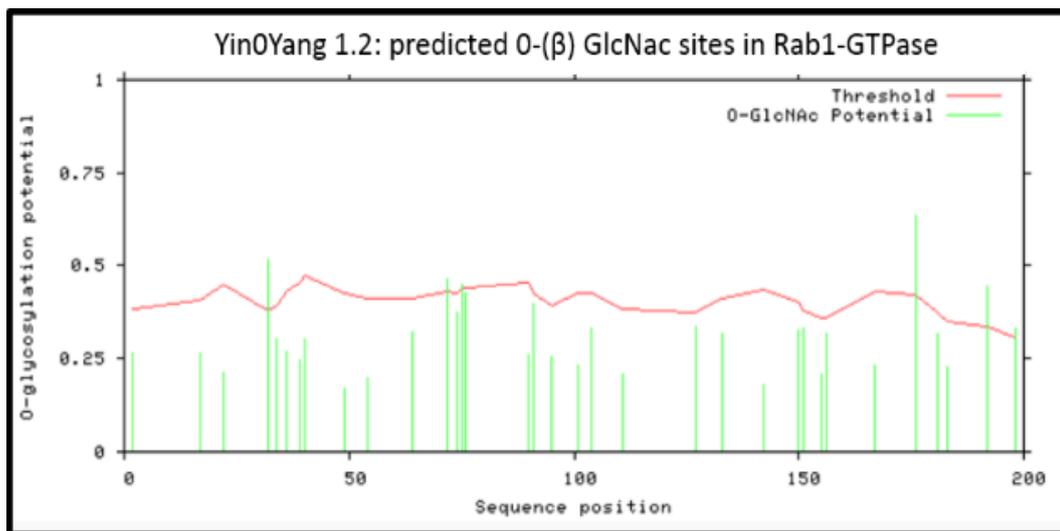
Outro fator importante é a glicosilação, muitas proteínas em células eucarióticas são glicoproteínas, visto que contêm cadeias de oligossacarídeos ligados covalentemente a certos aminoácidos. Sabe-se que a glicosilação afeta a dobragem, a localização, a solubilidade, a antigenicidade, o tráfego da proteína, a atividade biológica bem como as interações célula-célula (116).

A glicosilação de proteínas pode ser dividida em quatro categorias principais, dependendo da ligação entre o aminoácido e o açúcar. A categoria N-glicosilação é caracterizada pela adição de um açúcar ao grupo amino (NH<sub>2</sub>) de uma asparagina. A O-glicosilação um açúcar é ligado no grupo hidroxilo (OH) de um resíduo de serina ou treonina a ser modificado. E ainda se tem a C-manosilação e glicosilfosfatidilinositolação (GPI) (140).

Nas figuras 18 e 19 tem-se o resultado da predição de possíveis resíduos O-glicosilados, para a proteína Rab1 GTPase, apresentou-se 6 sítios, sendo 4 em resíduos de serina e 2 em treonina, com o score maior na região 176, que confirma a predição anterior de fosforilação de serina para esta mesma posição. Na proteína ADF/Cofilina identificou-se somente três potenciais sítios e os três em resíduos de serina com o score maior para a posição 138, entretanto avaliando com a análise de predição de fosforilação não foi evidenciado este sitio de serina, no gráfico identificamos um potencial alvo próximo desta posição 138, mas que não atingiu o score preconizado.

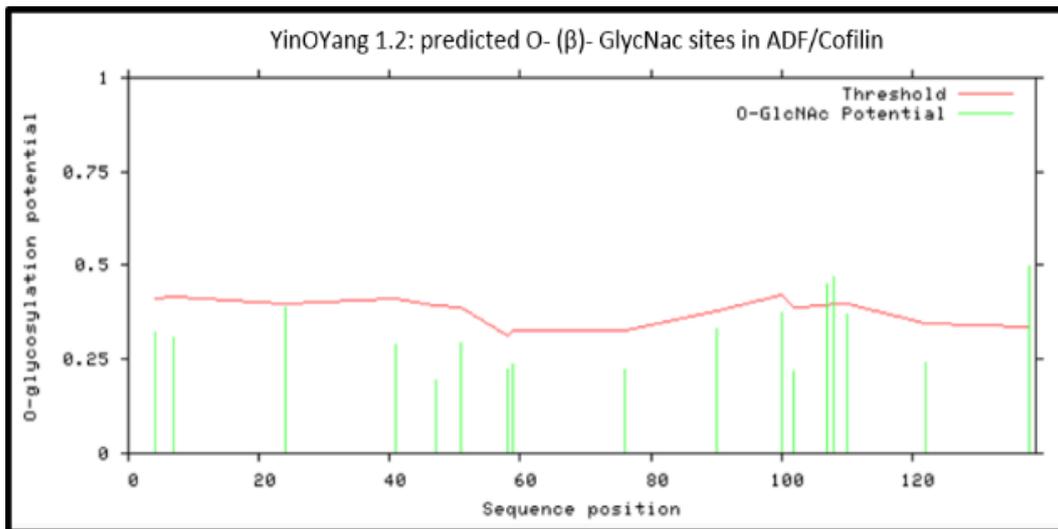
Outra predição foi a N-glicosilação (ver figura 20) ao realizar a submissão das sequências de aminoácidos, o preditor NetNglyc 1.0 sugere

uma determinada região para cada proteína. Para a Rab 1-GTPase tem-se a posição 154 com score de 0,5559 (em verde) e para ADF/Cofilina a posição 49 score 0,6722 (em verde) a linha em vermelho é o limiar com score de 0,5, mas o software faz um alerta, que mesmo que haja potenciais alvos de glicosilação, o fato das proteínas não conterem a presença de sítio de peptídeo sinal, impossibilita a glicosilação *in vivo* destas, pois o peptídeo sinal serve de chave para entrada no Retículo Endoplasmático, onde ocorrerá a glicosilação. Desta forma o preditor de glicosilação está em consenso com a análise *in silico* dos preditores de peptídeo sinal.



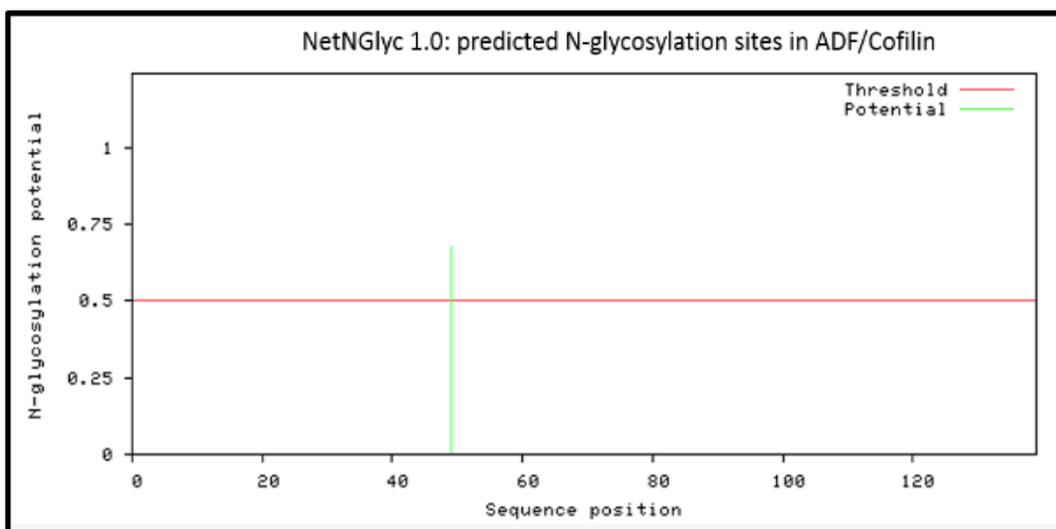
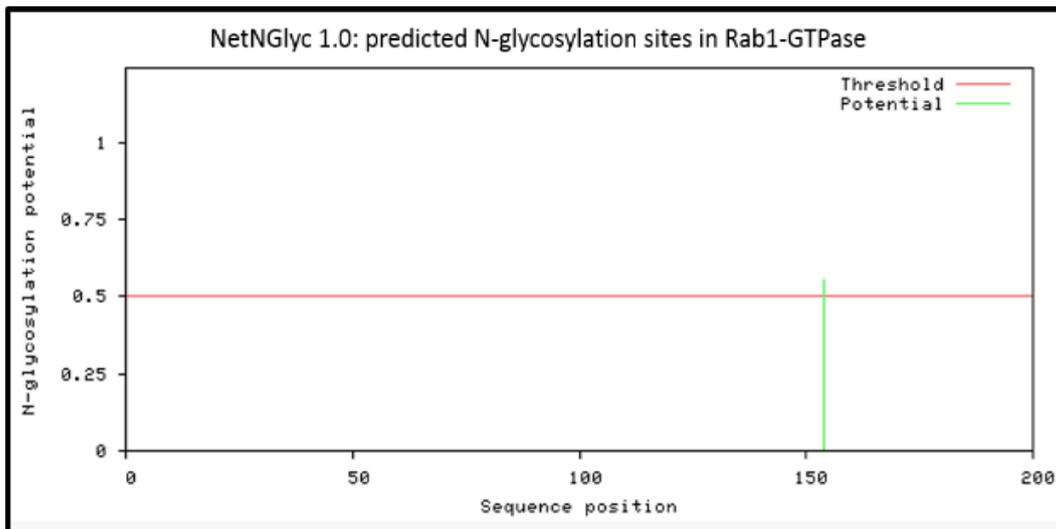
Residue	O-GlcNAc result	Potential	Thresh. (1)	Thresh. (2)
32	S	++	0.3804	0.4631
72	T	+	0.4307	0.5310
75	S	+	0.4414	0.5454
176	S	+++	0.4233	0.5210
192	T	++	0.3379	0.4058
198	S	+	0.3083	0.3659

**Figura 18** - Predição de glicosilação sobre a proteína Rab1- GTPase. O preditor YinOYang 1.2 revelou possíveis O- $\beta$ -glicosilações em 6 resíduos sendo 4 de Serina nas posições 32, 75, 176, e 198 e 2 de Treonina nas posições 72 e 192. Este software gera dados numa escala de 0 a 1, contudo o seu limiar score é variável conforme a tabela ao lado. Assim o limiar apresenta variações no gráfico representado pela linha vermelha. Em verde segue os possíveis sítios de glicosilação que ao ultrapassar o limiar são considerados positivos. Pode-se observar para a proteína Rab1-GTPase a posição 176 resíduos (S) com o score maior.



Residue	O-GlcNAc result	Potential	Thresh. (1)	Thresh. (2)
107	S +	0.4483	0.3940	0.4815
108	S +	0.4678	0.3978	0.4866
138	S ++	0.4956	0.3347	0.4015

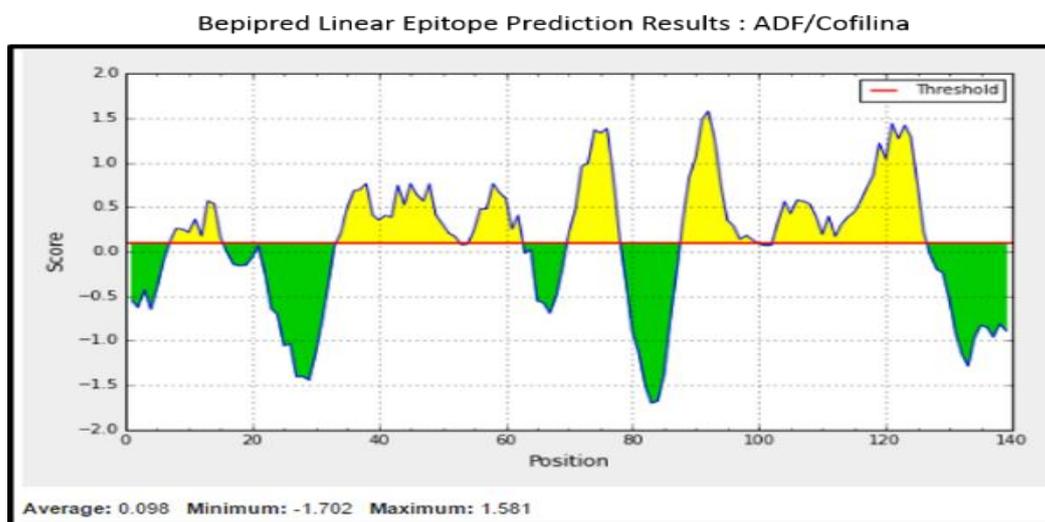
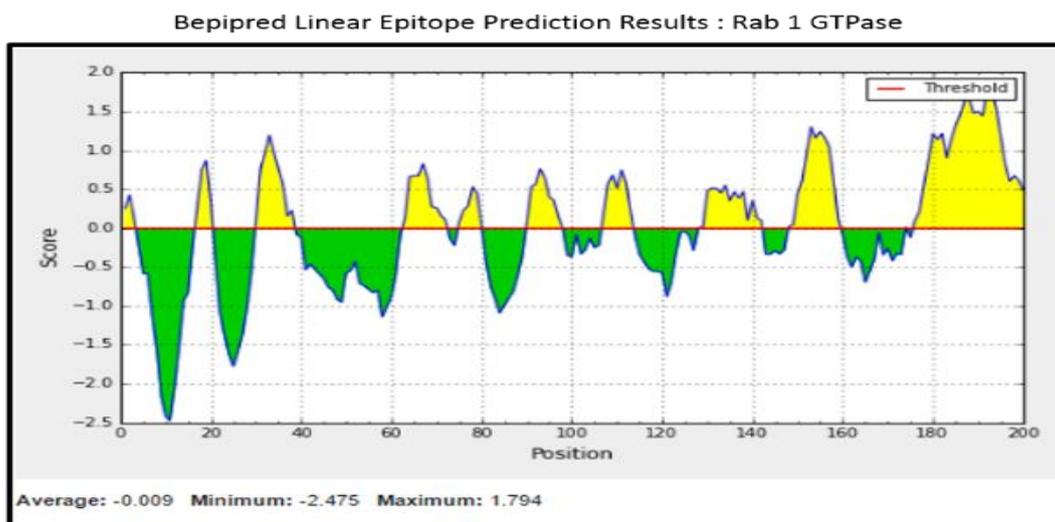
**Figura 19** - Predição de glicosilação sobre a proteína ADF/Cofilin. Predição de glicosilação sobre a proteína ADF/Cofilin. O preditor YinOYang 1.2 revelou possíveis O-β-glicosilações em 3 resíduos de Serina nas posições 107, 108 e 138. Este software gera dados numa escala de 0 a 1, contudo o seu limiar score é variável conforme a tabela ao lado. Assim o limiar apresenta variações no gráfico representado pela linha vermelha. Em verde segue os possíveis sítios de glicosilação que ao ultrapassar o limiar são considerados positivos. Pode-se observar para a proteína Rab1-GTPase a posição 176 resíduos (S) com o score maior.



**Figura 20** – Predição de N-glicosilação sobre a proteína Rab 1-GTPase e ADF/Cofilin. O preditor NetNGlyc 1.0. Alerta que para as respectivas sequências de proteínas não há presença de um peptídeo sinal e que desta forma seja improvável que estas sejam expostas a maquinaria de N-glicosilação não podendo ser glicosilada *In vivo*, mesmo que contenham motivos potenciais. Como resultado de potencial N-glicosilação para a Rab 1-GTPase tem-se a posição 154 com score de 0,5559 (em verde) e para ADF/Cofilina a posição 49 score 0,6722 (em verde) a linha em vermelho é o limiar com score de 0,5.

### 5.1.3 Predição Epítipo Linear

A predição de epítipo linear realizada no Bepipred mostra em espaço amostral do gráfico, em amarelo, potenciais regiões antigênicas. Com área predominante para a Rab1 GTPase no intervalo entre os resíduos de aminoácidos (a.a.) 180-200, e para a ADF/Cofilina a região entre 90-120 a.a. com maiores scores. O preditor *YingOYang* 1.2 revelou duas possíveis O- $\beta$ -glicosilações para Rab1 das 6 predições, que se encontram nas posições 192 e 198 que compreendem o intervalo da área de predição de epítipo linear e para a proteína ADF/Cofilina este preditor revelou 3 sítios possíveis nas regiões 107, 108 e 138, todos encontram-se dentro da área prevista como epítipo linear, conforme a figura 21 abaixo.



**Figura 21** – Predição Linear de Epítomos de Células B para as proteínas Rab1 GTPase e ADF/Cofilina. O eixo Y a pontuação para cada resíduo, o eixo X representa as posições dos resíduos na sequência. As pontuações maiores são interpretadas como a região e resíduo com maior probabilidade de fazer parte do epítopo (representados em amarelo nos gráficos.)

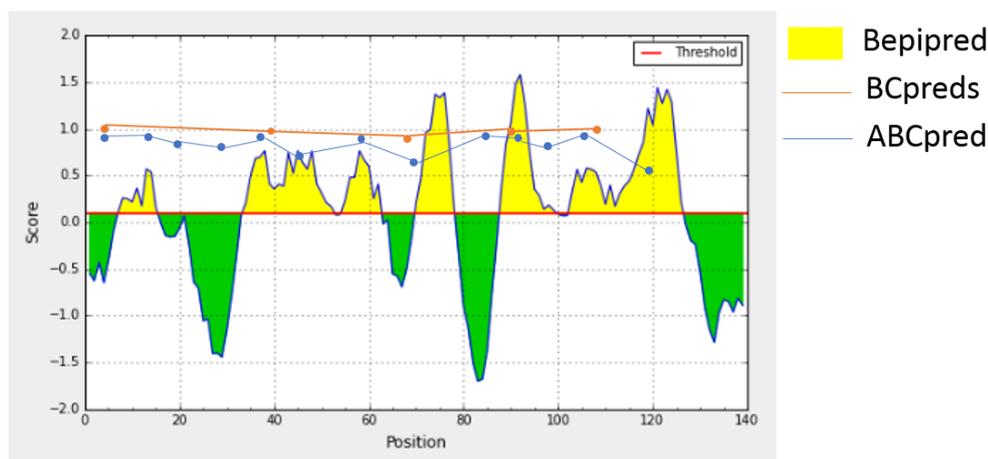
**Tabela 5** – Predição de Epítopo Linear (Bepipred), Descrição da posição, resíduo e escores avaliados nas proteínas Rab1-GTPase e ADF/Cofilina. Selecionou-se para esta tabela escores maiores do que 0,7.

<b>Predicted residue scores: (Bepipred Linear Epitope Prediction Results &gt; 0,7)</b>					
<b>RAB1 GTPase</b>			<b>ADF/COFILINA</b>		
<b>Position</b>	<b>Residue</b>	<b>Score</b>	<b>Position</b>	<b>Residue</b>	<b>Score</b>
193	<b>V</b>	1.794	92	<b>R</b>	1.581
192	<b>T</b>	1.793	91	<b>A</b>	1.484
188	<b>Q</b>	1.670	121	<b>E</b>	1.444
187	<b>L</b>	1.635	123	<b>G</b>	1.424
194	<b>K</b>	1.537	76	<b>S</b>	1.385
190	<b>P</b>	1.500	74	<b>A</b>	1.370
189	<b>N</b>	1.479	75	<b>G</b>	1.334
186	<b>N</b>	1.456	124	<b>L</b>	1.290
191	<b>P</b>	1.442	122	<b>S</b>	1.275
185	<b>P</b>	1.313	93	<b>P</b>	1.255
153	<b>K</b>	1.302	119	<b>N</b>	1.221
155	<b>S</b>	1.239	90	<b>T</b>	1.066
180	<b>K</b>	1.217	120	<b>D</b>	1.041
182	<b>A</b>	1.217	73	<b>D</b>	0.993
33	<b>Y</b>	1.195	72	<b>N</b>	0.962
195	<b>K</b>	1.173	118	<b>A</b>	0.857
156	<b>T</b>	1.161	89	<b>D</b>	0.840
154	<b>N</b>	1.158	77	<b>K</b>	0.838
181	<b>S</b>	1.137	45	<b>E</b>	0.767
184	<b>R</b>	1.132	58	<b>S</b>	0.766
157	<b>N</b>	1.046	38	<b>I</b>	0.765

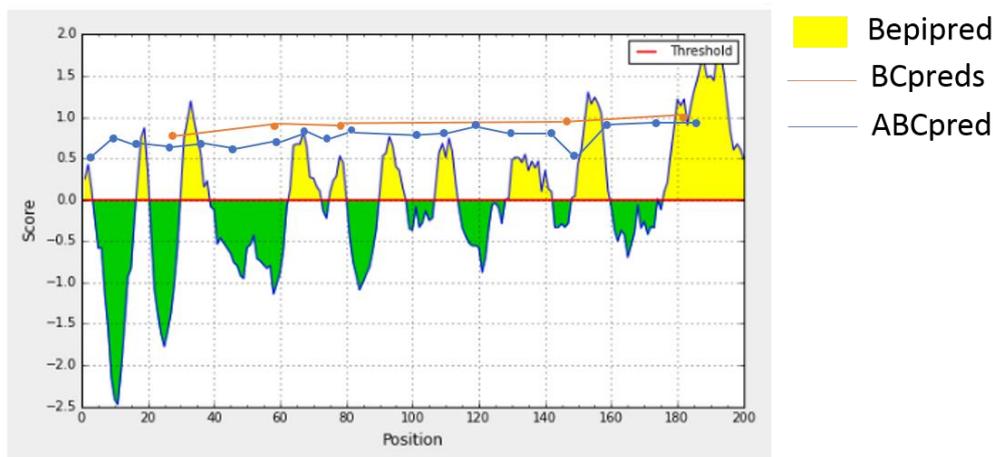
Os epítomos são os locais das moléculas que são reconhecidos por anticorpos do sistema imunológico. O conhecimento dos epítomos pode ser usado no projeto de vacinas e testes de diagnóstico, o criador do bepiped diz

que o método tem uma sensibilidade bastante baixa e que uma maneira de aumentar a sensibilidade seria ajustando o limiar aplicado, mas isto, em contrapartida, diminuiria a especificidade. Pellequer e cols. (1991) fizeram um estudo aplicando métodos de escala de propensão ao conjunto de dados usando um limiar fixo de  $0,7s$ , onde  $s$  é o desvio-padrão dos valores de predição (117,141)

O preditor ABCpred determinou 13 sítios de epítomos lineares para ADF/Cofilina e 19 para Rab 1- GTPase enquanto que o BCpreds apresentou 5 sítios para as duas proteínas. Podemos observar sítios de epítomos para célula B próximos, ao realizarmos a sobreposição dos dados fornecidos pelos 3 softwares. Conforme gráfico da Figura 22 e 23 abaixo.



**Figura 22** – Comparação dos resultados predição linear dos preditores Bepipred, BCpreds e ABC pred ADF/Cofilina. Em amarelo o espaço amostral da distribuição dos epítomos lineares preditos por Bepipred e seu respectivo escore. Os pontos em laranja são os epítomos previstos pelo BCpreds (posição:38 score 1; 4 score 1; 92 score 0,998; 66 score 0,967 e 115 score 0,887) e em azul os epítomos previstos pelo ABCpred (posição: 93 score 0,91; 113 score 0,86; 37 score 0,84; 68 score 0,83; 13 score 0,81; 4 score 0,80; 19 score 0,79; 99 score 0,77; 26 score 0,70; 58 score 0,68; 85 score 0,62 e 119 score 0,55). E em verde, espaço amostral de regiões negativas para epítomos lineares em células B.



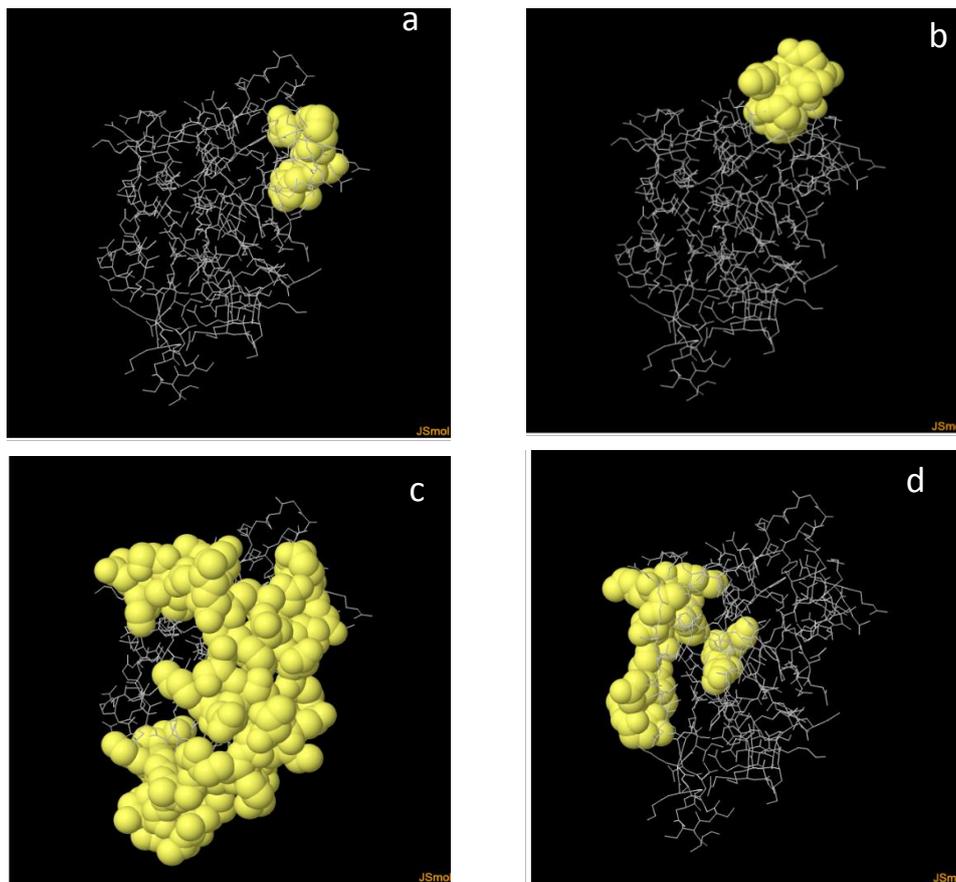
**Figura 23** – Comparação dos resultados de predição linear dos preditores Bepipred, BCpreds e ABC pred Rab1 GTPase Em amarelo o espaço amostral da distribuição dos epítomos lineares previstos por Bepipred e seu respectivo score. Os pontos em laranja são os epítomos previstos pelo BCpreds (posição:146 score 1; 183 score 0,994; 78 score 0,955; 57 score 0,907 e 27 score 0,827) e em azul os epítomos previstos ABCpred (posição: 2 score 0,56; 11 score 0,77; 17 score 0,72; 26 score 0,83; 35 score 0,78; 4 score 0,80; 44 score 0,71; 59 score 0,88; 66 score 0,81; 74 score 0,78; 83 score 0,91 e 101 score 0,84; 110 score 0,75;119 score 0,72; 131 score 0,80;141 score 0,75; 148 score 0,57; 160 score 0,80; 176 score 0,89; 184 score 0,79). E em verde, espaço amostral de regiões negativas para epítomos lineares em células B.

#### 5.1.4 Predição Epítomo Conformacional

O método baseia-se em estatísticas de resíduos de aminoácidos, informação espacial e acessibilidade de superfície em um conjunto de dados compilados de epítomos descontínuos determinados por difração de raios-X de complexos de proteína e anticorpo/antígeno (142).

A análise só é possível se houver estruturas tridimensionais conhecidas de proteínas homologas e compatíveis com as sequências de aminoácidos que se deseja analisar. A avaliação da ADF/Cofilina de *L. infantum* foi equiparada com a do ADF/Cofilina *Leishmania donovani* que apresentou uma identidade de 99% da cadeia A, dados fornecidos pelo banco de dados Protein Data Bank (PDB) .

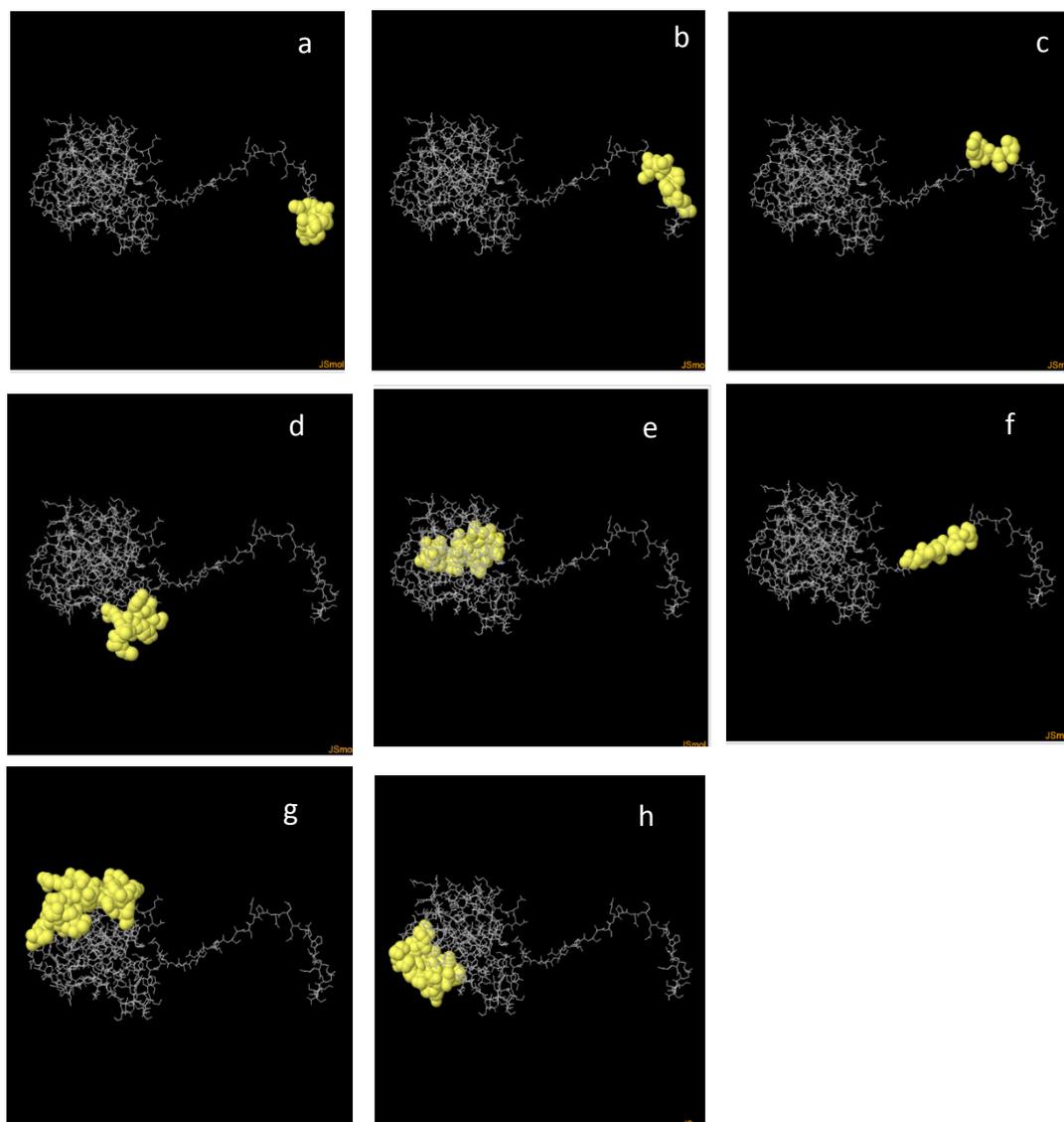
A Rab1–GTPase foi equiparada com uma estrutura cristal da Rab-1 ligada a proteína LidA de *Legionella pneumophila*, pois um estudo fez uma comparação estrutural revelando que Rab-1-GDP ligada pela LidA exibe uma conformação ativa quase idêntica com a Rab1-GTP e torná-a persistentemente ativa (143) e apresentou uma identidade de 76% em relação à cadeia A.



**Figura 24** – Predição de Epítipo Conformacional da proteína ADF/Cofilina. O preditor Ellipro fez alinhamento dos aminoácidos da ADF/Cofilina *L. infantum* com a do banco de dados ADF/Cofilina *L. donovani* para realizar esta predição. E como detalhe do alinhamento obteve uma identidade de 99%. E evidenciou 4 sítios em formato 3D da proteína com o escore variando entre 0,8 a 0,6 score. **Conforme a tabela 6** E a figura 23. Podemos evidenciar a Identificação, os resíduos, o número de resíduos e o escore.

**Tabela 6** - Predição conformacional ADF/Cofilina

ID	Resíduos	Número de resíduos	Score
A	_:R134, _:H136, _:R137, _:S138, _:V139	5	0.842
B	_:Y71, _:N72, _:D73, _:A74, _:G75, _:S76, _:K77, _:R78	8	0.835
C	_:M1, _:A2, _:I3, _:S4, _:G5, _:V6, _:T7, _:L8, _:R25, _:G32, _:A33, _:D34, _:G35, _:K36, _:K37, _:G44, _:E45, _:R46, _:S47, _:V48, _:N49, _:T51, _:D52, _:K54, _:K55, _:F57, _:S58, _:T59, _:E60, _:K61, _:I87, _:P88, _:D89, _:T90, _:A91, _:R92, _:P93, _:R94, _:K96, _:M97, _:N119, _:D120, _:E121, _:S122, _:G123, _:L124, _:D125, _:E127, _:E128, _:I130	50	0.629
D	_:E9, _:E10, _:N11, _:R13, _:G14, _:D17, _:D18, _:R20, _:M21, _:K22, _:K23, _:S24, _:S110, _:E111, _:G112	15	0.614



**Figura 25** - Predição de Epítipo Conformacional da proteína Rab1-GTPase. O preditor Ellipro fez alinhamento dos aminoácidos com uma estrutura Rab1-GDP ligada à proteína LidA e como detalhe do alinhamento obteve-se uma identidade de 76%. E evidenciou 8 sítios em formato 3D da proteína com o escore variando entre 0,9 a 0,5. **Conforme a tabela 7** E a figura 24 podemos evidenciar a Identificação, os resíduos, o número de resíduos e o escore.

**Tabela 7-** Predição Conformacional Rab-1-GTPase.

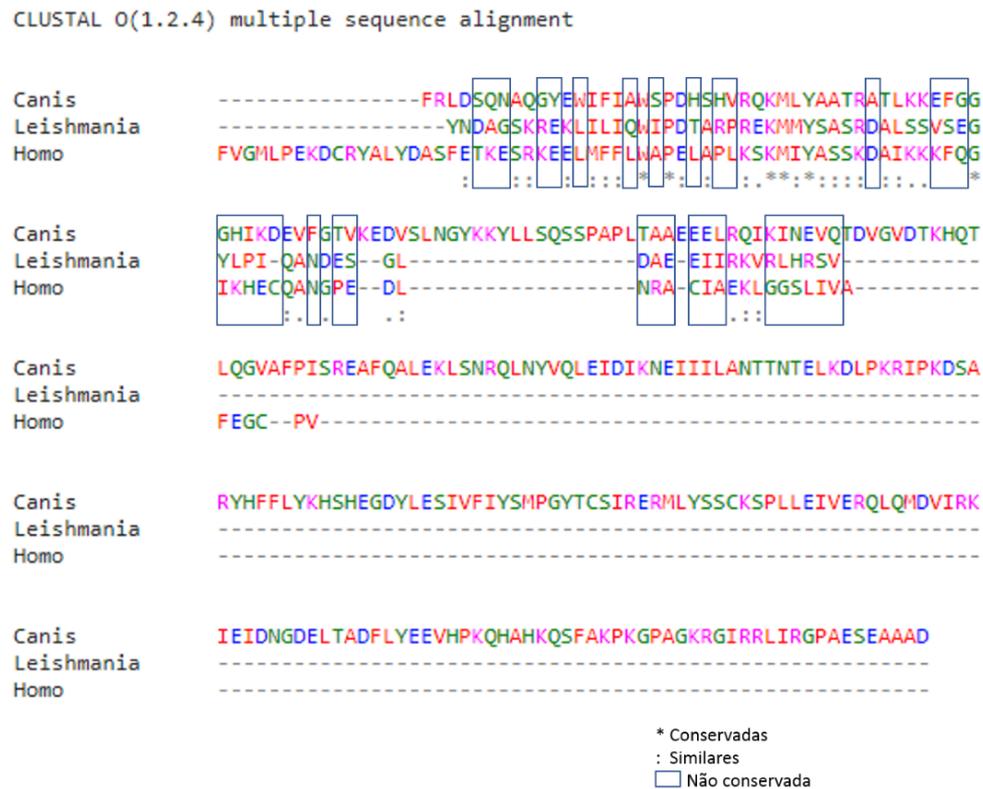
ID	Resíduos	Número de resíduos	Score
A	_:K195, _:E196, _:D197, _:S198, _:C199, _:C200	6	0.975
B	_:Q188, _:N189, _:P190, _:P191, _:T192, _:V193, _:K194	7	0.953
C	_:R184, _:P185, _:N186, _:L187	4	0.92
D	_:M1, _:T2, _:A3, _:E4, _:Y5, _:D6, _:T49, _:N51, _:E53, _:S54, _:K55, _:V56	12	0.722
E	_:T90, _:K129, _:A130, _:V131, _:D132, _:T133, _:Q134, _:M135, _:A136, _:K137, _:D138, _:F139, _:D141, _:S142, _:L143, _:G144	16	0.695
F	_:Y37, _:I38, _:S39, _:T40, _:I41, _:G42, _:V43, _:A65, _:G66, _:Q67, _:E68, _:R69, _:F70, _:R71, _:T72, _:I73, _:T74, _:S75, _:S76, _:R79, _:D92, _:M93, _:E94, _:N97, _:N98, _:K100, _:T101, _:S104, _:E107, _:K108, _:Y109	31	0.661
G	_:R27, _:A29, _:D30, _:D31, _:S32, _:Y33, _:T34, _:D35, _:S36, _:T91, _:K122, _:C123, _:D124, _:L125, _:V126, _:T127, _:K128, _:T150, _:S151, _:A152, _:K153, _:N154, _:S155, _:T156, _:N157	25	0.586

Sobrepondo os resultados dos preditores lineares com o conformacional identificamos para a proteína Rab1–GTPase a região com maior pontuação e prevalência com potencial imungênico o intervalo 182-189 a.a. e esta demonstrou mais sítios imunogênicos quando comparada à proteína ADF/Cofilina. Esta por sua vez apresentou a posição 4, 58, 85 e 93 comum às análises.

### 5.1.5 Alinhamento Múltiplo

Realizou-se dois alinhamentos múltiplos para cada proteína: um para avaliar a conservação de regiões entre as proteínas estudadas e proteínas similares em mamíferos (*Homo sapiens* e *Canis familiaris*) que em geral são os principais hospedeiros de *L. infantum*, o que nos permite inferir a especificidade das proteínas. O outro, para ver a conservação entre a família trypanosomatidae sendo três são do gênero *Leishmania* e uma do gênero *Trypanosoma* para uma análise de possível reação diagnóstica cruzada.

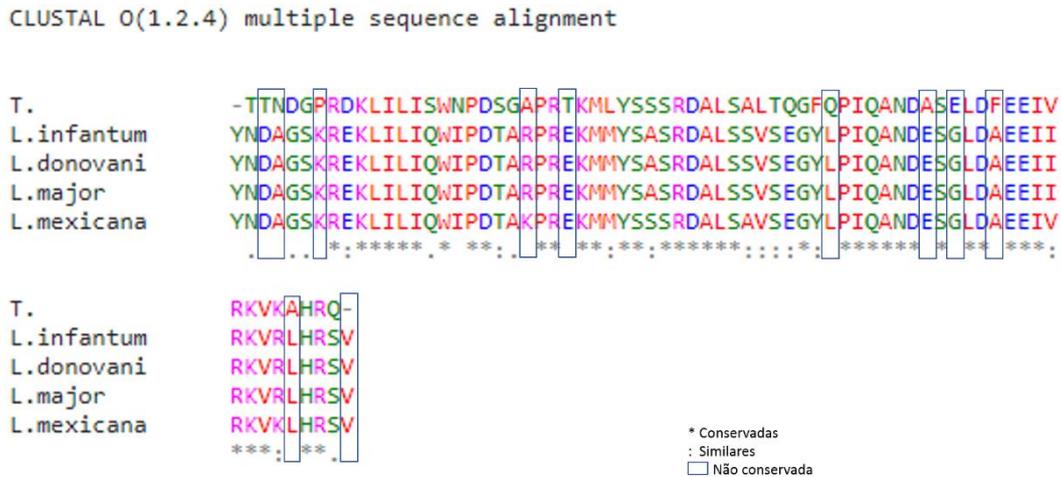
Inicialmente fez-se um alinhamento no pBlast onde localizou-se a sequência FASTA das principais proteínas homólogas avaliadas pelo percentual de identidade entre as espécies. Que então, foram submetidas ao alinhamento múltiplo no Clustal Omega. Logo abaixo nas figuras 26 e 27 pode-se visualizar os resultados.



**Figura 26** - Alinhamento múltiplo entre a sequência da proteína ADF/Cofilina e proteínas similares dos mamíferos *Homo sapiens* e *Canis familiaris*.







**Figura 29** - Alinhamento múltiplo da sequência da proteína ADF/Cofilina de *L. infantum* com outras espécies da família Trypanosomatidae.

Encontram-se sequências hipervariáveis na porção C-terminal de ambas as proteínas mas o espaço amostral da região difere de apenas um aminoácido. O que pode gerar ligação inespecíficas de anticorpos, podendo ocorrer reação cruzada entre as espécies. No entanto, esta análise serve como avaliação linear das proteínas e sabe-se que epitopos distintos podem ser posicionados com o dobramento das proteínas em sua conformação funcional.

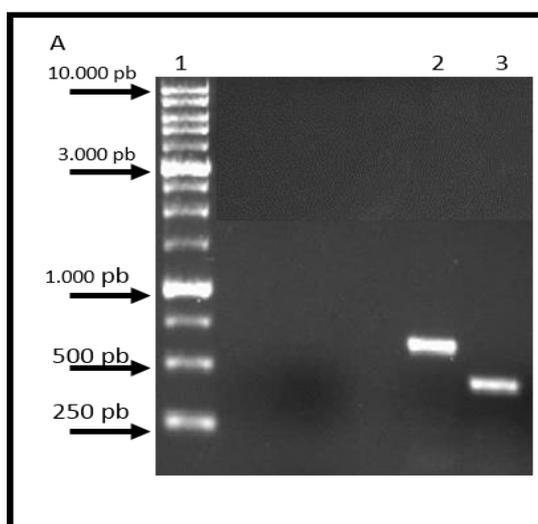
Um alinhamento de sequência das proteínas da família ADF/cofilin foi realizado utilizando *T. brucei* e verificou-se que compartilham 26%-53% de identidade de sequência com outros homólogos de ADF/cofilin. Além disso, o alinhamento indicou alguns resíduos conservados desta família de proteínas (110).

## 5.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação em cadeia de polimerase para a amplificação dos genes foi realizada com amostras de DNA genômico conforme descrito no item 4.4

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A amplificação foi obtida com sucesso com o tamanho esperado para cada gene como mostra a figura 30.

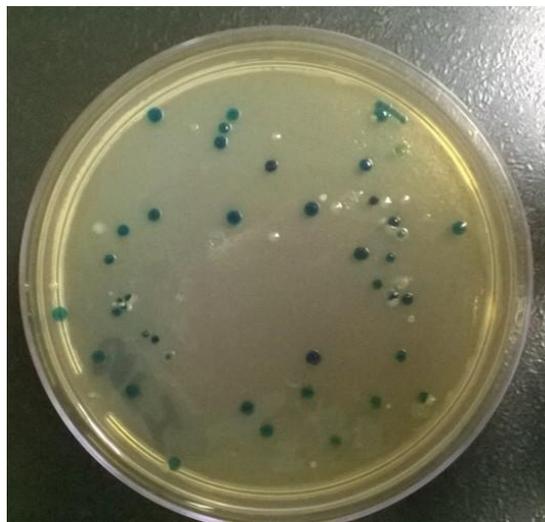
Para a amplificação e clonagens bem-sucedidas foi essencial o desenho dos primers. E isto exigiu uma análise conjunta com os sítios de restrição para os vetores escolhidos, associados com a sequência gênica das proteínas, para se evitar cortes inespecíficos e inesperados. Assim, verificou-se no NEBCUTTER para o vetor pET 28a (+) que as enzimas ***XhoI***, ***HindIII***, ***SalI***, ***EcoRI***, ***BamHI***, ***NdeI***, ***NcoI***, ***XbaI***, ***BglII*** não possuem sítios no gene ADF/Cofilina e para o vetor pLEXYneo-2: ***BglII***, ***NcoI***, ***SlaI***, ***SalI***, ***XbaI***, ***NheI***, ***MspCI***, ***KpnI*** e ***NotI***. Já o gene da proteína Rab1-GTPase o resultado obtido para a pesquisa de enzimas de restrição e utilização do vetor pET28a(+)TEV: ***XhoI***, ***HindIII***, ***SalI***, ***EcoRI***, ***BamHI***, ***NdeI***, ***NcoI***, ***XbaI***, ***BglII*** e para o vetor pLEXYneo-2: ***BglII***, ***NcoI***, ***SlaI***, ***NheI***, ***MspCI***, ***KpnI*** e ***NotI***. Esta avaliação, somada ao interesse de subclonagem no pLEXYneo-2 levou a escolha para o desenho dos primers com os sítios de restrições enzimáticas para *NcoI* e *KpnI*.



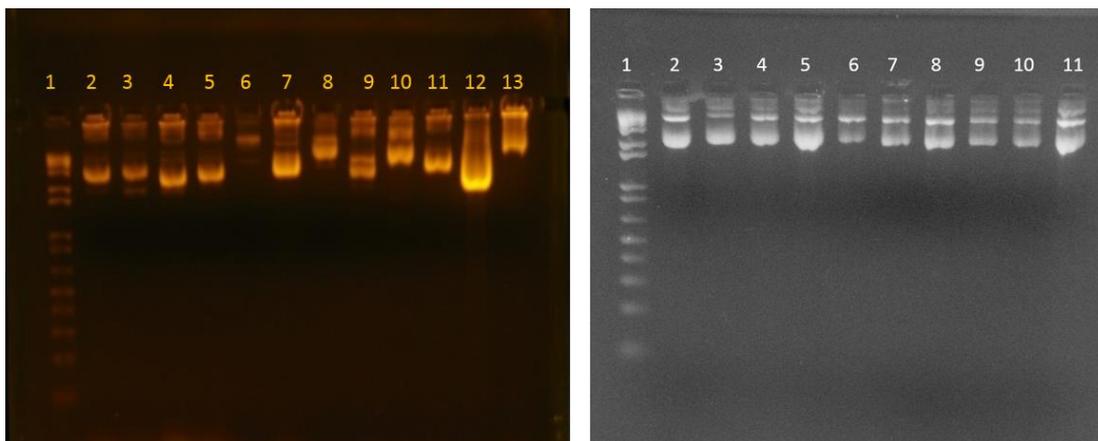
**Figura 30** – Fotografia de eletroforese em gel de agarose 0,8% com resultados da PCR. A) Primeira amplificação do DNA genômico, posição 1) Ladder 1kb RTU marcador molecular; 2) Amplificação do gene Rab1 (603 pb) e na posição 3) Amplificação do gene Cofilin-like (423 pb), posições.

### 5.3 Ligação, transformação e extração em plasmídeo pGEM®-T Easy

Os amplicons obtidos na PCR foram então ligados no vetor de clonagem pGEM®-T Easy conforme descrito no item 4.6, posteriormente foram transformados em *E. coli* DH-5 $\alpha$  termocompetentes. Após o crescimento bacteriano selecionou-se a colônias brancas opalescentes, pois a presença do inserto inativa a  $\beta$ -galactosidase. As colônias brancas selecionadas foram cultivadas em meio LB liquido com 5 $\mu$ L de ampicilina [50mg/mL], overnight. As culturas que apresentaram turvação foram selecionadas para confirmação do inserto por meio de PCR. E posteriormente realizou extração plasmidial, quantificação do DNA plasmidial e enviou para o sequenciamento.



**Figura 31-** Transformação bacteriana com *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Colônias Azuis indicam presença do plasmídeo pGEM®-T Easy conferindo resistência ao antibiótico de seleção, no entanto sem a presença do inserto. E as colônias em branco opalescente também resistentes ao antibiótico mas com a presença do inserto gênico.



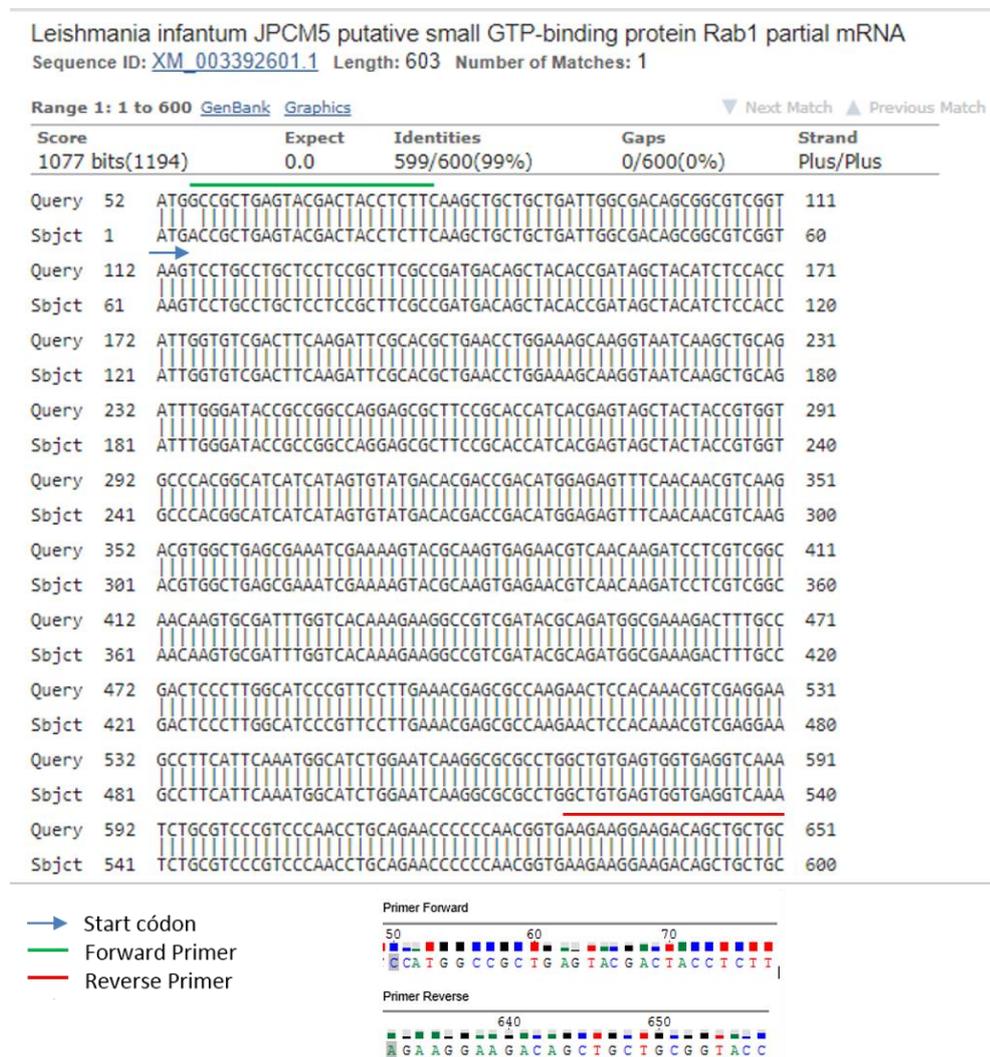
**Figura 32** - Extração plasmidial. Foto em amarelo demonstrando em gel de agarose 0,8% o DNA plasmidial pGEM®-T Easy + inserto do gene da proteína Rab1-GTPase extraídos do cultivo de bactérias transformadas. Segue posição no gel, identificação da amostra RP(Rab+Plasmídeo) CP (ADF/Cofilina + Plasmídeo). 1) Marcador Molecular 100pb-3000bp Kasvi ; 2) RP 01; 3) RP 02 ; 4) RP 03 ; 5) RP 04 ; 6) RP 05 ; 7) RP 06 ; 8) RP 07 ; 9) RP 08; 10) RP 09; 11) RP 10; 12) RP 11 e 13 RP 12). Em preto e DNA plasmidial pGEM®-T Easy + inserto do gene da proteína ADF/Cofilina extraídos do cultivo de bactérias transformadas, segue posição no gel, identificação da amostra e concentração DNA plasmidial respectivamente . 1) Marcador Molecular 1Kb Kasvi; 2) CP 01; 3) CP 02; 4) CP 03; 5) CP 04; 6) CP 05; 7) CP 06; 8) CP 07; 9) CP 08; 10) CP 09 e 11) CP 10 .

#### 5.4 Sequenciamento

Após a quantificação da extração plasmidial, as amostras foram diluídas para uma concentração final de 300 ng para um volume de 5µL e para o sequenciamento utilizou-se o oligonucleotídeo universal T7promoter. O resultado do sequenciamento foi visualizado no programa Chromas 2.6.4. e a sequência foram exportadas em formato FASTA para alinhamento da sequência via nBlast. Observado nas figuras 33 e 34.

Foram enviadas 10 amostras de extração plasmidial de cada gene para o sequenciamento totalizando 20 amostras. Para as amostras do gene Rab1-GTPase somente duas apresentaram cromatogramas positivos e as duas tiveram 99% de identidade quando submetida a análise no nBlast. Enquanto que para a ADF/Cofilina as 10 amostras apresentaram desempenhos positivos para o sequenciamento e desta 7 obtiveram 100% de identidade quando submetidas ao alinhamento

Para a proteína Rab 1-GTPase observou-se a troca de uma A (Adenina) por uma G (Guanina) logo após o sitio de iniciação ATG, esta modificação gera uma mutação de ponto, e conseqüentemente a troca do aminoácido de treonina para alanina. Este códon foi inserido com o desenho do primer forward para que a enzima de restrição escolhida na posição 5' a NcoI tivesse o desempenho na posição desejada.



**Figura 33** - Alinhamento do sequenciamento da proteína Rab1-GTPase com a sequência gênica do RNAm da *Leishmania infantum* JPMC5 do banco de dados NCBI (Nucleotide Blast) A seta em azul indica o Start códon , trinca de nucleotídeo que sinaliza o lugar onde se inicia

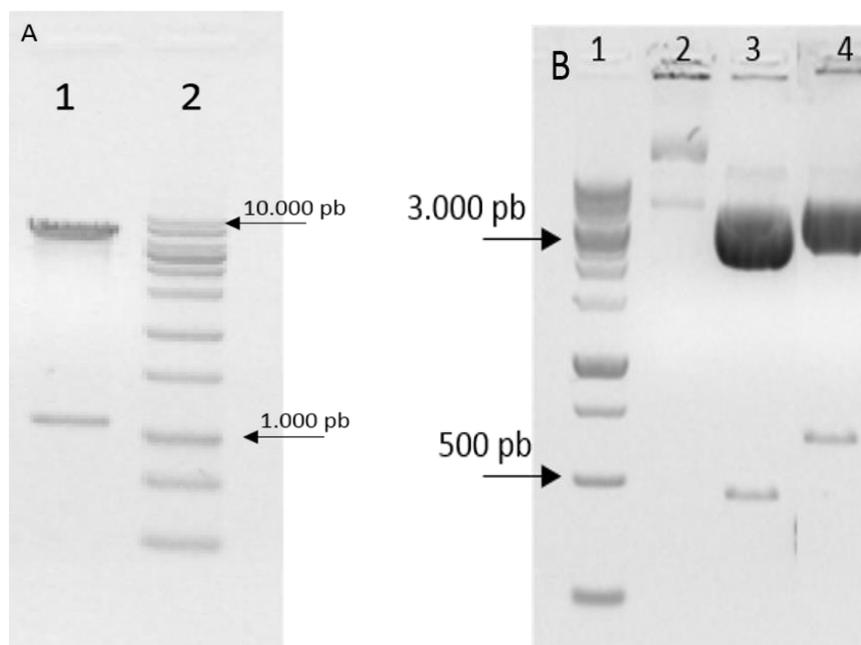


### 5.5 Sub-clonagem de inserto em pLEXSY-neo 2

Com o sequenciamento, os plasmídeos com os insertos gênicos que apresentaram a melhor identidade foram selecionados e digeridos com as enzimas de restrição *NcoI* e *KpnI*, e após corrida em gel de agarose 1%, estes foram purificados com o kit da MACHEREY-NAGEL conforme orientação do fabricante. Na figura 35 podemos observar na altura de 3.000 pb o plasmídeo digerido (3.015 pb) e na altura de 500 pb os insertos digeridos (423 pb para ADF/Cofilina) e (603 pb para Rab1-GTPase) e os insertos purificados foram quantificados: ADF/Cofilina (18,6 ng/ $\mu$ L) e RabGTPase (13,1 ng/ $\mu$ L).

O plasmídeo alvo para subclonagem, pLEXSY-neo2, também foi digerido para apresentar extremidades coesiva compatíveis, para a ligação dos respectivos insertos, ocasionando conseqüentemente na liberação de um stuffer de aproximadamente 1Kb conforme a figura 34, O plasmídeo aberto com o tamanho aproximado de 8 Kpb foi purificado do gel de agarose e quantificado apresentando uma concentração de 32 ng/ $\mu$ L.

A quantificação é importante passo para relação da ligação sendo uma razão de 1:3 entre vetor e inserto. A ligação foi realizada de acordo com a tabela 4, no entanto, substituiu-se o tampão 2x por 10x devido a quantidade de DNA plasmidial inferior a 50 ng.



**Figura 35** - Digestão plasmidial com enzimas de restrição *NcoI* e *KpnI*. A) digestão do plasmídeo pLesxy – neo 2 para ligação com os insertos clonados. 1) Digestão plasmidial pLESXY – neo 2 e 2) Marcador Molecular 1k Ludwig. B) Digestão plasmidial para retirada do inserto do vetor pGEM 1) Marcador molecular 1Kb DNA ladder RTU Kasvi; 2) Controle Negativo; 3) Digestão Plasmidial pGem+Rab1 GPTase; 4) Digestão plasmidial pGem+ADF/Cofilina.

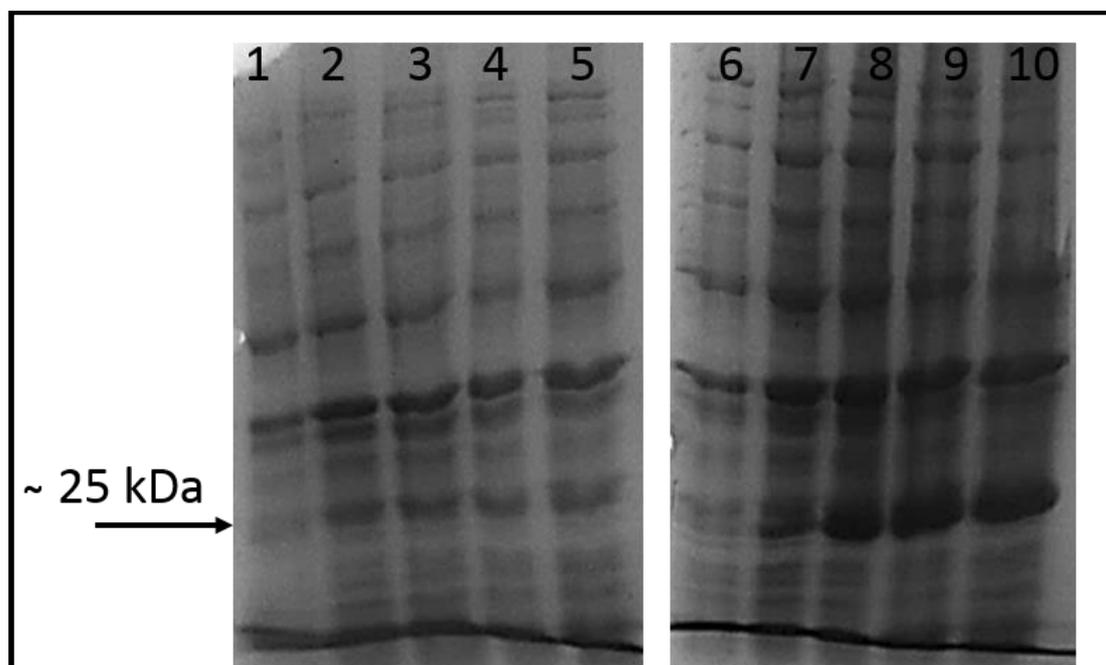
Após a ligação, os plasmídeos foram transformados em *Escherichia coli* TOP 10 para subclonagem gênica. As colônias foram selecionadas por resistência a ampicilina devido o marcador neo-2, devidamente explicado em material e métodos, e cultivadas para extração plasmidial, após confirmação dos insertos por PCR. Com a extração plasmidial, estes foram então digeridos, só que agora com as enzimas *NcoI* e *NotI*, pois o sitio de restrição no plasmídeo pLESXY está logo após o stop códon carregando junto ao inserto a cauda de histidina H6, como explicado anteriormente. Os procedimentos de purificação e quantificação foram repetidos como na digestão anterior com a concentração de: ADF/Cofilina 15,3 ng/ $\mu$ L; Rab1-GTPase 18,1 ng/ $\mu$ L e o plasmídeo pET28(a)+ que foi aberto com as mesmas enzimas 30,1 ng/ $\mu$ L.

Repetiu-se a mesma etapa de ligação como descrito acima, para a ligação dos insertos ao vetor de expressão pET28(a)+, que primeiramente foi transformado em *Escherichia coli* TOP10 e extraído para estoque plasmidial.

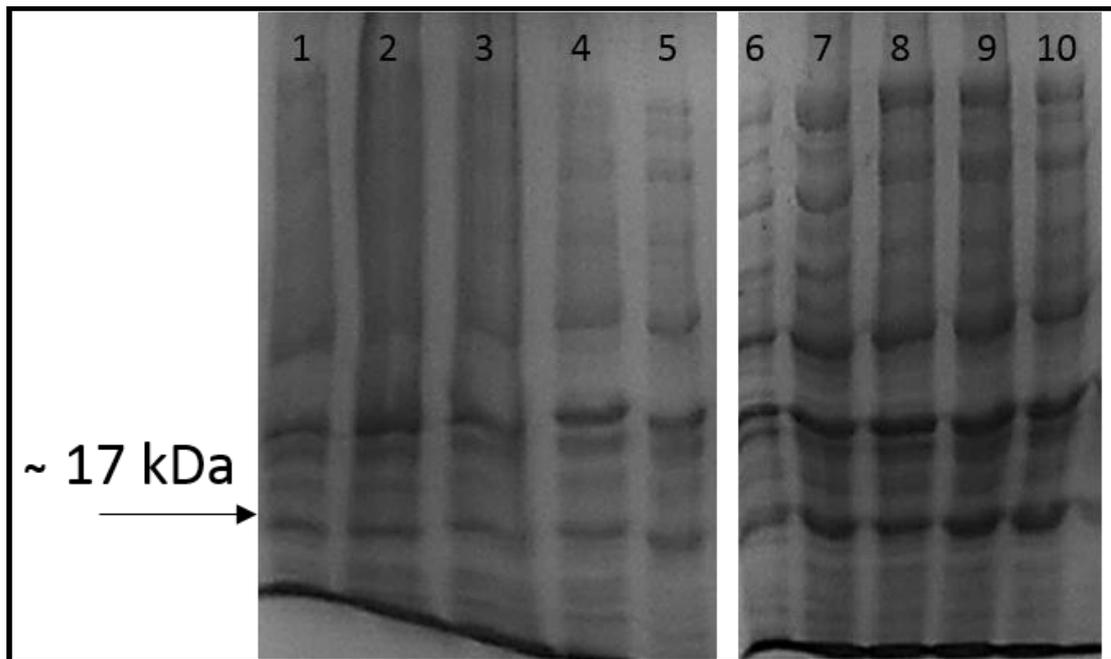
## 5.6 Expressão heteróloga em *E.coli* Rosetta

Com o estoque plasmidial dos genes em pET28(a)+, realizou-se enfim a transformação destes em *E.coli* Rosetta BL21(DE3)pLYsS™. As colônias foram selecionadas e confirmado a presença do inserto por PCR, novamente, cultivadas em meio líquido, e então foram submetidas à indução da expressão das respectivas proteínas.

Com 1 hora após a indução das proteínas podemos detectar em gel a expressão positiva de ambas as proteínas nos poços identificados como 7 nas imagens de SDS-PAGE, logo abaixo nas figuras 36 e 37.



**Figura 36** - Gel SDS-PAGE 1 mm a 12% de acrilamida com amostras de colônias *E.coli* Rosetta BL21(DE3)pLYsS™ com vetor de expressão pET28(a)+ com o gene Rab1-GTPase. 1) Controle Negativo 0 h ; 2) Controle Negativo após 1 h de indução; 3) Controle Negativo após 2h de indução; 4) Controle negativo após 3; 5) Controle Negativo após 4 horas de indução; 6) Cultura antes da indução; 7) Cultura 1h após indução; 8) Cultura 2h após a indução; 9) Cultura 3h após a indução e 10) Cultura 4h após indução.

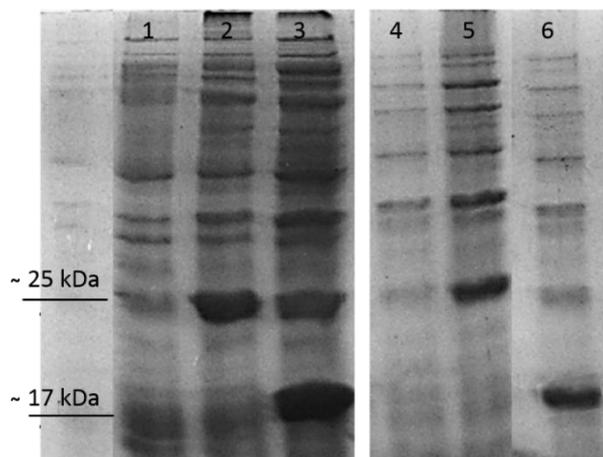


**Figura 37** - Gel SDS-PAGE 1 mm a 12% de acrilamida com amostras de colônias *E. coli* Rosetta BL21(DE3)pLYsS™ com vetor de expressão pET28(a)+ com o gene ADF/Cofilina. 1) Controle Negativo 0 h ; 2) Controle Negativo após 1 h de indução; 3) Controle Negativo após 2h de indução; 4) Controle negativo após 3; 5) Controle Negativo após 4 horas de indução; 6) Cultura antes da indução; 7) Cultura 1h após indução; 8) Cultura 2h após a indução; 9) Cultura 3h após a indução e 10) Cultura 4h após indução

### 5.7 Solubilidade e purificação das proteínas Rab1-GTPase e ADF/Cofilina

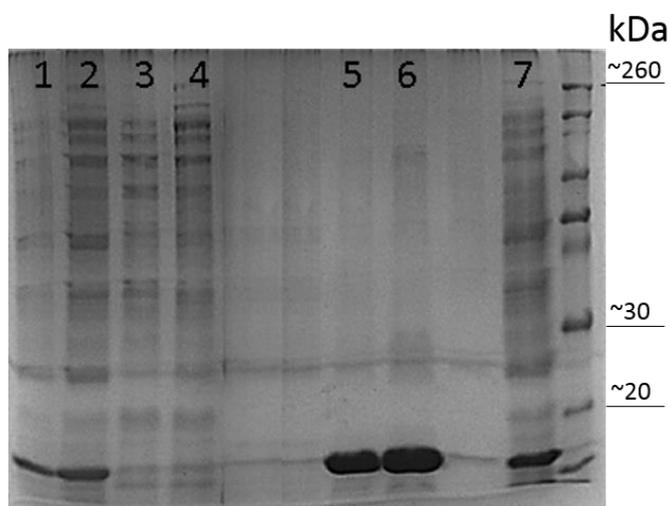
Prontamente, avaliou-se a solubilidade das proteínas, estas foram sonicadas em tampão PBS com e sem uréia onde percebe-se que elas estão mais abundantes em meio aquoso sem uréia conforme a figura 38.

A existência de uma relação entre os níveis de expressão do mRNA e a solubilidade proteica estão diretamente relacionadas. Foi observado que proteínas recombinantes tendem a formar agregados amiloides. Sabendo desta relação entre o nível de expressão e a solubilidade proteica e que a formação de agregados muda a conformação da proteína é essencial o teste de solubilidade (144).

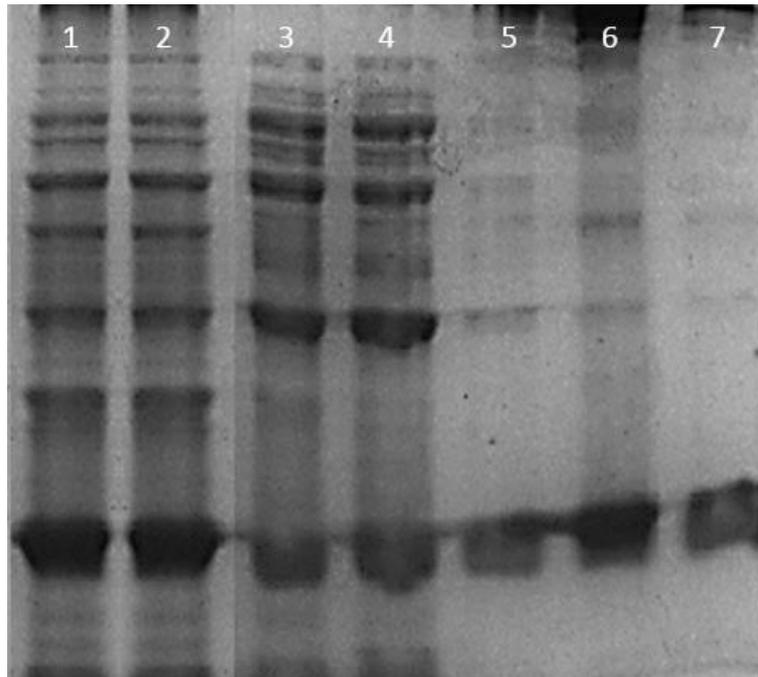


**Figura 38** - Determinação da solubilidade proteica das proteínas Rab1-GTPase e ADF/Cofilina. Gel SDS/PAGE 1 mm 12% de acrilamida, Os pellets das culturas foram sonicadas em tampão PBS com e sem úreia. 1) Controle Negativo (PBS); 2) Proteína Rab 1 -GTPase (PBS); 3) Proteína ADF/Cofilina (PBS); 4) Controle Negativo (PBS+Uréia); 5) Proteína Rab 1 -GTPase (PBS+Uréia); 6) Proteína ADF/Cofilina (PBS+Uréia).

Após a determinação do tempo de expressão e a solubilidade das proteínas, volumes maiores de culturas foram induzidas para a purificação proteica por interação dos resíduos de histidina com a matriz Ni-NTA (Quiagen).



**Figura 39** - Purificação Proteína ADF/Cofilina por cromatografia coluna de afinidade. 1) Amostra sonicada em tampão PBS prévia antes da etapa de purificação; 2) Filtrado do extrato proteico; 3) Primeira lavagem; 4) Segunda Lavagem 5) Primeira Eluição; 6) Segunda Eluição. 7) Pellet Cultura sem sonicação e 8) Marcador molecular Novex sharp pre stained protein standard. Gel SDS/PAGE 12% acrilamida. 1 mm.



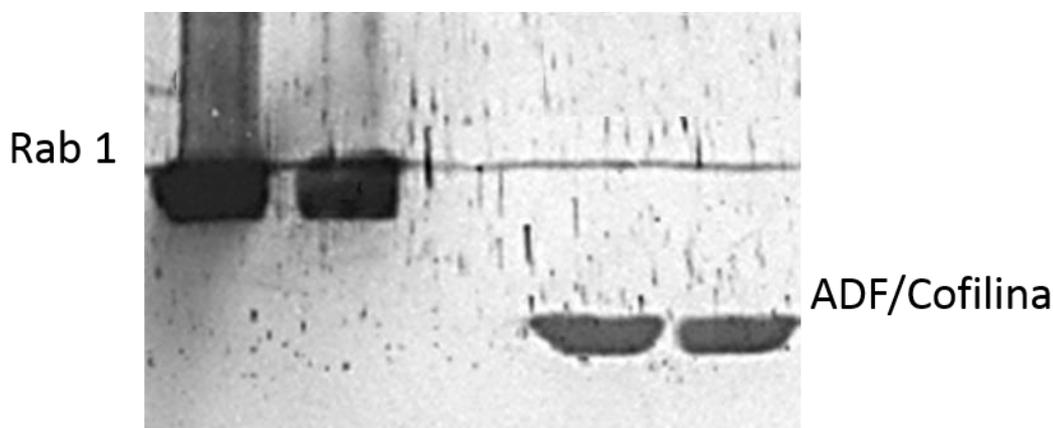
**Figura 40-** Purificação Proteína Rab1-GTPase por cromatografia em coluna de afinidade. 1) Amostra sonicada em tampão PBS prévia antes da etapa de purificação; 2) Filtrado do extrato proteico; 3) Primeira lavagem; 4) Segunda Lavagem 5) Primeira Eluição; 6) Segunda Eluição. 7) Terceira eluição. Gel SDS/PAGE 12% acrilamida. 1 mm.

Podemos observar uma excelente purificação para a proteína ADF/Cofilina, quase não houve perda de proteínas nas etapas de lavagem e duas eluições foram suficientes para a coleta da proteína com pouquíssimas impurezas. Enquanto que para a proteína Rab1-GTPase, houve muita perda proteína, principalmente nas etapas de lavagem. E para uma melhor eluição foram necessárias 3 etapas de eluição e estas apresentaram mais resíduos em relação a primeira, ver figuras 39 e 40.

## 5.8 Western blotting e ELISA

Amostras obtidas na etapa de purificação foram submetidas a SDS-PAGE, e com o término da separação eletroforética, realizou-se a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose de 0,45 µm.

Esta técnica confirmou que as bandas intensas observadas na figura são das proteínas recombinantes Rab1-GTPase e ADF/Cofilina, pois anticorpos fizeram o reconhecimento da cauda de anti-histidinas nas proteínas, ver figura 41.



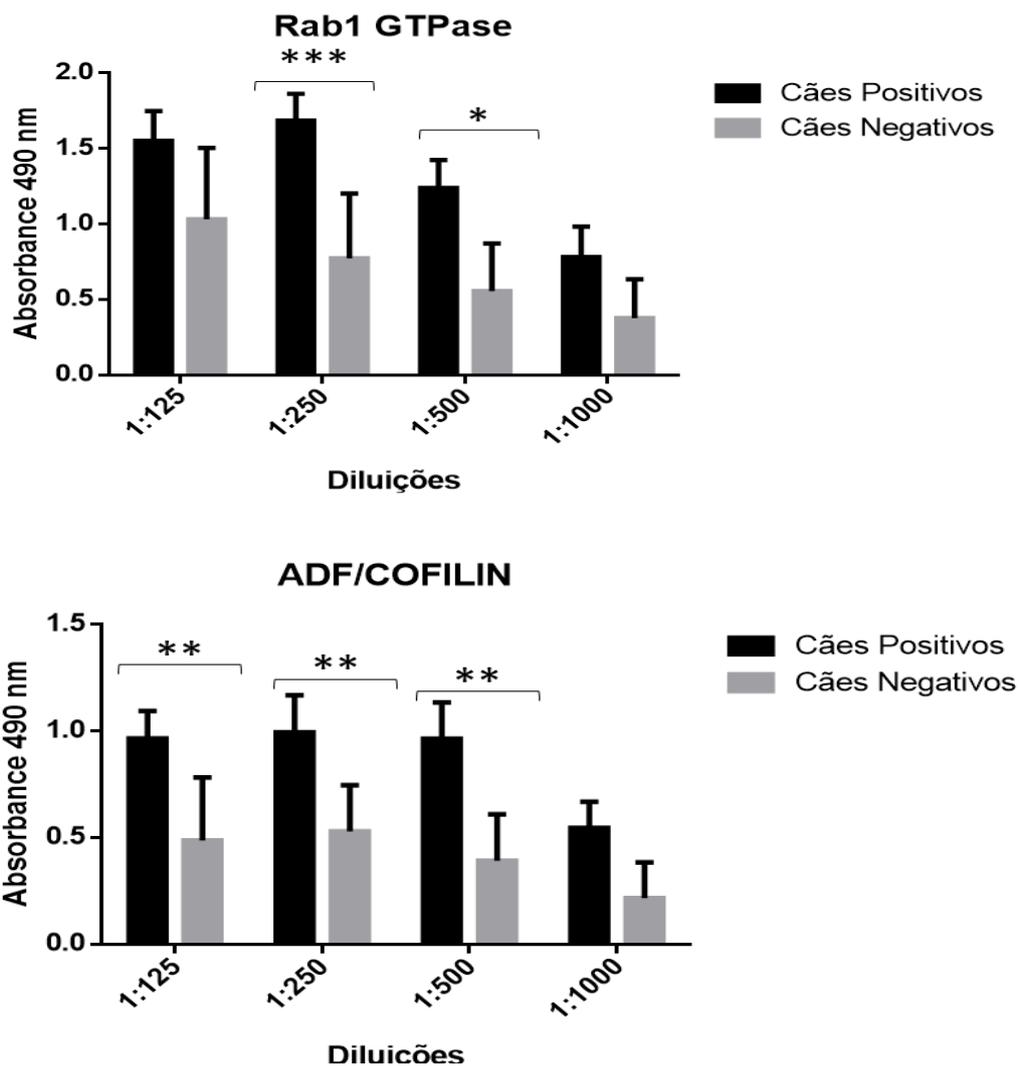
**Figura 41** - Western Blotting das proteínas recombinantes purificadas em resina de níquel, sondadas com anticorpo primário IgG de camundongo anti-HISTag e anticorpo secundário IgG-AP de cabra anti IgG de camundongo. A revelação das bandas foi realizada por reação enzimática da enzima fostatase alcalina (AP) conjugada aos anticorpos secundários de cabra.

O diagnóstico da Leishmaniose Visceral canina pode ser feito pela detecção de anticorpos séricos específicos (IgG) utilizando-se técnicas sorológicas quantitativas como o IFAT e o ELISA. Altos níveis de anticorpos estão associados com alto parasitismo e progressão da doença (145). Entretanto, alguns cães permanecem soro negativos por períodos variáveis após serem infectados com *Leishmania* (146).

Os métodos sorológicos como IFAT, ELISA e testes rápidos estão entre as técnicas diagnósticas mais comumente empregadas em estudos clínicos e de pesquisa sobre infecção por *L. infantum* (57,61). Tanto para IFAT quanto para ELISA, a quantificação usando o título de anticorpos ou a densidade

óptica permite a classificação dos níveis de anticorpos contra o antígeno de *L. infantum*. A técnica ELISA permite o uso de diferentes tipos de antígenos. Estes antígenos podem ser classificados em quatro grupos de acordo com sua natureza: extratos inteiros ou solúveis de promastigotas, extratos inteiros ou solúveis de amastigotas, proteínas recombinantes e proteínas purificadas. A sensibilidade e especificidade da técnica ELISA varia de acordo com o antígeno utilizado (61,147).

As amostras purificadas obtidas na primeira e segunda eluição foram dosadas EL1 Rab: 3,533 mg/mL; EL2 Rab: 0,755 mg/L; EL1 Cof: 1,137 mg/mL e EL2 Cof: 0,753 mg/mL. Logo após, realizou-se cálculo da diluição para realização do ensaio de ELISA, cujas placas foram sensibilizadas com 100 uL por poço com solução contendo 5 µg/mL de proteína purificada. O teste foi em quadruplicata e a leitura foi realizada na absorvância 490 nm. Os dados foram avaliados no GraphPad Prism v. 6 e obtivemos os seguintes resultados apresentados na figura 42



**Figura 42** - Avaliação da antigenicidade das proteínas heterólogas Rab1-GTPase e ADF/Cofilina em diferentes diluições de soros de cães, por meio do teste sorológico ELISA.  $P < 0.05$  (\*);  $P < 0.01$ (\*\*) e  $P < 0.001$ (\*\*\*).

A proteína Rab1-GTPase, pela significância estatística demonstrou ser mais imunogênica que a proteína ADF/Cofilina, mas esta demonstrou-se mais sensível em diferentes diluições. Nenhuma das proteínas demonstrou sensibilidade na diluição 1:1000.

Pesquisas mostraram que a proteína Rab 1 GTPase da *L. major* foi capaz de induzir níveis significativos de IFN- $\gamma$  em indivíduos com a infecção

por *L. major* ou *L. infantum*, o que nos sugere como possibilidade novas pesquisas quanto a imunogenicidade desta proteína (107).

Em um outro estudo a proteína Rab-2 do *Angiostrongylus cantonensis* induziu em células esplênicas de camundongos in vitro a expressão da citocina IFN- $\gamma$  (148)

Estudos anteriores adotaram estratégias semelhantes para avaliar antígenos recombinantes como potencial marcador de diagnóstico (62,68). As proteínas recombinantes têm demonstrado uma maior sensibilidade e especificidade quando comparadas aos ensaios com extratos solúveis totais de *Leishmania* (68,71).

Temos o antígeno recombinante proveniente de uma proteína clonada de *L. chagasi* (sin. *Infantum*) chamada rK39 que foi relatada como altamente reativa em soro de cães e de humanos em ELISA. Este antígeno apresentou uma sensibilidade de 98% e uma especificidade de 89%. Verificou-se que os títulos de anticorpos anti-rK39 foi 59 vezes maior que para antígeno solúvel TSA (149,150).

Todavia, a escolha de um marcador para diagnóstico sorológico que apresente uma maior sensibilidade, deve ainda estar associada à redução de possíveis reações cruzadas com outras espécies (151).

Os resultados preliminares das proteínas alvo estudadas demonstraram que a Rab1-GTPase e a ADF/Cofilina conseguem distinguir cães infectados de cães não-infectados. No entanto, há variações quanto ao antígeno, ou seja, a Rab1-GTPase apresentou-se mais imunogênica onde observamos um  $p < 0,001$  na diluição 1:250 e quanto a sensibilidade na detecção em soros diluídos, pois a ADF/Cofilina apresentou-se mais sensível em diferentes concentrações séricas onde obtivemos  $p$  value 0,01 para três diluições 1:125, 1:250 e 1:500. O cut – off foi de 0,81, assim com base nestes critérios as amostras são classificadas da seguinte forma: resultado não-reagente: amostra  $<$  “cut-off” e reagente: amostra  $\geq$  “cut-off”.

Estes resultados prévios validam a hipótese de uso deste antígeno como um potencial marcador diagnóstico. Entretanto, se faz necessário alguns ajustes como aumentar o número de amostras (n) a serem avaliadas;

padronizar melhor a técnica em relação às concentrações e razões entre os reagentes; avaliar a possibilidade de um ensaio combinado como os testes ELISA de 4ª geração, que são capazes de detectar simultaneamente a presença de mais de um antígeno ou de antígenos e anticorpos em um mesmo ensaio, ou em uma mesma amostra, aumentando a sensibilidade e especificidade.

Avaliar a reatividade das proteínas em soros de animais infectados com outras espécies de tripanossomatídeos e outras espécies de microrganismos patogênicos de cães para determinar a especificidade do teste, e os valores preditivos negativos e positivos.

## 6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Selecionamos duas proteínas envolvidas com vias de secreção não-clássicas a partir de dados proteômicos (102) que foram submetidas a análises *in silico* onde identificamos regiões conservadas por homologia das sequências proteicas e caracterizamos algumas de suas propriedades. Com sucesso clonamos e expressamos em sistema procariótico ambas as proteínas. A purificação das proteínas recombinantes permitiu testá-las quanto à capacidade de serem reconhecidas por soros de cães infectados com LVC por meio do ELISA. Todavia, faz-se necessário aumentar o número de amostras e realizar novos testes que possibilitem determinar a sua sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo.

Uma melhor padronização, controle e monitoramento sobre os grupos negativos e positivos podem reduzir variáveis e nos levar a uma conclusão mais assertiva. As proteínas poderão, ainda, serem testadas em novos ensaios, como a avaliação da imunidade celular *in vitro*, verificar a antigenicidade em soros de humanos infectados, estudá-las como potencial alvo terapêutico por inibição da atividade, visto que as proteínas exercem atividades fundamentais no protozoário e no processo de interação parasito-hospedeiros

## 7. REFERÊNCIAS

1. Jain K, Jain NK. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. *J Immunol Methods* [Internet]. 2015; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022175915000939>
2. Matlashewski G, Arana B, Kroeger A, Battacharya S, Sundar S, Das P, et al. Visceral leishmaniasis: Elimination with existing interventions. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2011;11(4):322–5. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70320-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70320-0)
3. van Griensven J, Diro E. Visceral Leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am* [Internet]. 2012;26(2):309–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.005>
4. Foroughi-Parvar F, Hatam G. Vaccines for Canine Leishmaniasis. *Adv Prev Med* [Internet]. 2014;2014:1–9. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/apm/2014/569193/>
5. World Health Organization, 2015 [http: <http://apps.who.int/gho/data/node.main.NTDLEISHVEND?lang=en> Accessed on 2015/04/28]. 2015;2015.
6. de Oliveira Lara-Silva F, Michalsky ÉM, Fortes-Dias CL, de Oliveira Pires Fiuza V, Pessanha JEM, Regina-Silva S, et al. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. *Acta Trop* [Internet]. 2015; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X15000881>
7. Werneck GL. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. *Cad Saude Publica*. 2010;26(4):644–5.
8. MINISTÉRIO DA SAÚDE. No Title. 2014;11334. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/726-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-visceral-lv/11334-situacao-epidemiologica-dados>
9. Brasil. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral [Internet]. 2006. 1-120 p. Available from: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_controle\\_leishmaniose\\_visceral.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral.pdf)
10. Rangel EF, Vilela ML. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) e urbanização da leishmaniose visceral no Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2008;24(12):2948–52.

11. OPAS PAHO, WHO WHO. LEISHMANIASES. Epidemiological Report of the Americas. 2017;(5). Available from: <http://new.paho.org/leishmaniasis>
12. Abasi M, Lotfi P, Bazmani A, Matini M, Hajilooi M. Evaluation of FcyRIIB-NA1 / NA2 Polymorphism in Visceral Leishmaniasis. 2014;16(4):1–4.
13. Poinar, G Jr., Poinar, R. *Paleoleishmania proterus* n. gen., n. sp., (Trypanosomatidae: Kinetoplastida) from Cretaceous Burmese Amber. *Protist*. 2004;155(September):305–10.
14. GEORGE POINAR J and RP. EVIDENCE OF VECTOR-BORNE DISEASE OF EARLY CRETACEOUS REPTILES. *VECTOR-BORNE ZOONOTIC Dis*. 2004;4(4):281–5.
15. Cook GC. William Twining (1790-1835): the first accurate clinical descriptions of “tropical sprue” and Kala-azar? *J Med Biogr*. 2001;9:125–31.
16. Steverding D. The history of leishmaniasis. *Parasit Vectors* [Internet]. 2017;10(1):82. Available from: <http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-2028-5>
17. Gibson ME. The identification of kala-azar and the discovery of *Leishmania Donovanii*. *Med Hist* [Internet]. 1983;27(2):203–13. Available from: [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0025727300042691](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0025727300042691)
18. Leishman WB. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. 1903. *Natl Med J India*. 1903;7(4):196–200.
19. Ross R. Note on the Bodies Recently Described By Leishman and Donovan. *Br Med J* [Internet]. 1903;2(2237):1261–2. Available from: <http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.2.2237.1261>
20. Ross R. Further Notes on Leishman’S Bodies. *Bmj* [Internet]. 1903;2(2239):1401–1401. Available from: <http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.2.2239.1401>
21. Nicolle C. Recherches sur le kala-azar enterprises à l’Institut Pasteur de Tunis. *Arch Inst Pasteur Tunis*. 1908:97–112. 1908;1908.
22. Origine canine du kala-azar. Nicolle C, Comte C *Bull Soc Pathol Exot*. 1908;1:299 – 301. 1908;1908.
23. Lindenberg A. L’ulcère de Bauru ou le bouton d’Orient au Brésil: communication préliminaire. *Bull Soc Path Exot* [Internet]. 1909;2:252–4. Available from: [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=L%27ulcère+de+Baur](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=L%27ulcère+de+Baur)

- u+ou+le+bouton+d%60Orient+au+Brésil&author=Lindenberg+A&publication\_year=1909&journal=Bull+Soc+Path+Exot&volume=2&pages=252-254#0
24. Carini A, Paranhos U. Identification de l' «Ulcers de Bauru» avec le bouton d'Orient. *Bull Soc Path Exot.* 1909;2:1909.
  25. “Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem.” Cunha, A. M., and E. Chagas. *Leishmania chagasi* (1937): 3-9. 1937;1937.
  26. MAURICIO IL, HOWARD MK, STOTHARD JR, MILES MA. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology* [Internet]. 1999;119(3):S0031182099004710. Available from: [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0031182099004710](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182099004710)
  27. Berman JJ. *Taxonomic Guide to Infectious Diseases: Understanding the Biologic Classes of Pathogenic Organisms.* Elsevier/Academic Press. 2012;374.
  28. Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Henrique C, Costa N. Urban parasitology : visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol* [Internet]. 2011;27(9):403–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2011.04.001>
  29. Ready PD. Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill Bull Eur sur les Mal Transm = Eur Commun Dis Bull.* 2010;15(10):19505.
  30. Grimaldi G, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg.* 1989;41(6):687–725.
  31. Lainson R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Rev Pan-Amazônica Saúde* [Internet]. 2010;1(2):13–32. Available from: [http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2176-62232010000200002&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232010000200002&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
  32. Borovsky D, Schlein Y. Trypsin and chymotrypsin-like enzymes of the sandfly *Phlebotomus papatasi* infected with *Leishmania* and their possible role in vector competence. *Med Vet Entomol* [Internet]. 1987;1(3):235–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2979536>
  33. PIMENTA PFP, MODI GB, PEREIRA ST, SHAHABUDDIN M, SACKS DL. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology* [Internet]. 1997;115(4):S0031182097001510. Available from: [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0031182097001510](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182097001510)

34. Pimenta P, Turco S, McConville M, Lawyer P, Perkins P, Sacks D. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science* (80- ) [Internet]. 1992;256(5065):1812–5. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1615326>
35. Coelho-Finamore JM, Freitas VC, Assis RR, Melo MN, Novozhilova N, Secundino NF, et al. *Leishmania infantum*: Lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts. *Int J Parasitol* [Internet]. 2011;41(3):333–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.10.004>
36. Rogers ME, Ilg T, Nikolaev A V., Ferguson MAJ, Bates PA. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* [Internet]. 2004;430(6998):463–7. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature02675>
37. Santos VC, Araujo RN, Machado LA, Pereira MH, Gontijo NF. The physiology of the midgut of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva 1912): pH in different physiological conditions and mechanisms involved in its control. *J Exp Biol* [Internet]. 2008;211(Pt 17):2792–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18723537>
38. Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*. 2007;37(10):1097–106.
39. Schlein Y, Jacobson RL, Shlomai J. Chitinase Secreted by *Leishmania* Functions in the Sandfly Vector. *Proc R Soc B Biol Sci* [Internet]. 1991;245(1313):121–6. Available from: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspb.1991.0097>
40. Shakarian a M, Dwyer DM. Structurally conserved soluble acid phosphatases are synthesized and released by *Leishmania* major promastigotes. *Exp Parasitol* [Internet]. 2000;95(2):79–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10910708>
41. ROGERS ME, CHANCE ML, BATES PA. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology* [Internet]. 2002;124(5):12049412. Available from: [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0031182002001439](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182002001439)
42. Serafim TD, Figueiredo AB, Costa PAC, Marques-da-Silva EA, Gonçalves R, de Moura SAL, et al. *Leishmania* Metacyclogenesis Is Promoted in the Absence of Purines. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(9).
43. Romero GAS, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in latin America - A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(1).
44. van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, et al. Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a

- Vector for Leishmania Entry into Macrophages. *J Immunol* [Internet]. 2004;173(11):6521–5. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.173.11.6521>
45. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63(6):601–10.
  46. Camargo RA, Tuon FF, Sumi D V., Gebrim EM, Imamura R, Nicodemo AC, et al. Mucosal leishmaniasis and abnormalities on computed tomographic scans of paranasal sinuses. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;83(3):515–8.
  47. Tuon FF, Amato VS, Bacha HA, AlMusawi T, Duarte MI, Neto VA. Toll-like receptors and leishmaniasis. *Infect Immun*. 2008;76(3):866–72.
  48. Cunningham AC. Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by Leishmania. *Exp Mol Pathol* [Internet]. 2002;72:132–41. Available from: <http://www.sciencedirect.com.libezproxy.open.ac.uk/science/article/pii/S0014480002924184>
  49. Capel F, Carvalho T De. Francilene Capel Tavares de Carvalho Perfil de citocinas do padrão Th1 , Th2 , Th17 e o visceral pré e pós tratamento. 2016;28–9.
  50. Naderer T, McConville MJ. The Leishmania-macrophage interaction: A metabolic perspective. *Cell Microbiol*. 2008;10(2):301–8.
  51. Sacks D, Anderson C. Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of Leishmania infection in mice. *Immunol Rev*. 2004;201:225–38.
  52. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2003;3(1):23–35. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri978>
  53. Rodrigues V, Cordeiro-da-Silva A, Laforge M, Silvestre R, Estaquier J. Regulation of immunity during visceral Leishmania infection. *Parasit Vectors* [Internet]. 2016;9(1):118. Available from: <http://www.parasitesandvectors.com/content/9/1/118>
  54. Barbosa A, Martins-filho OA, Mayrink W, Tafuri WL, Corre R. Veterinary Immunology and Immunopathology Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. 2009;128:87–95.
  55. TILLEY, L.P.; SMITH JR. FWK. Consulta veterinária em cinco minutos. Espécies canina e felina. 3.ed. São Paulo: Manole 2008, editor. 2008. 2008 p.
  56. Giannuzzi AP, Ricciardi M, De Simone A, Gernone F. Neurological

- manifestations in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*: descriptions of 10 cases and a review of the literature. *J Small Anim Pract.* 2017;58(3):125–38.
57. Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2009;165(1–2):1–18.
  58. Reguera RM, Morón M, Pérez-Pertejo Y, García-Estrada C, Balaça-Fouce R. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2016;227:98–114.
  59. Yasur-Landau D, Jaffe CL, David L, Baneth G. Allopurinol Resistance in *Leishmania infantum* from Dogs with Disease Relapse. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(1):1–13.
  60. Elmahallawy EK, Sampedro Martínez A, Rodríguez-Granger J, Hoyos-Mallecot Y, Agil A, Navarro Mari JM, et al. Diagnosis of leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries.* 2014;8:961–72.
  61. Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol.* 2008;158(4):274–87.
  62. Menezes-Souza D, Mendes TADO, Gomes MDS, Bartholomeu DC, Fujiwara RT. 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* [Internet]. 2015;9(1):e3426. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003426>
  63. Moreno J, Salud I De, Iii C, Alvar J, Can C, Molina R, et al. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol.* 2004;57(FEBRUARY).
  64. Faria AR, Andrade HM de. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. *Rev Pan-Amazônica Saúde* [Internet]. 2012;3(2):47–57. Available from: [http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2176-62232012000200007&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232012000200007&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
  65. Bourdoiseau G, Marchal T, Magnol JP. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. *J Vet Diagn Invest.* 1997;9(4):439–40.
  66. Gomes YM, Paiva Cavalcanti M, Lira RA, Abath FGC, Alves LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. *Vet J.* 2008;175(1):45–52.
  67. Liautaud B, Vignier N, Miossec C, Plumelle Y, Kone M, Delta D, et al. First case of visceral leishmaniasis caused by *leishmania martiniquensis*. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;92(2):317–9.

68. Chávez-Fumagalli M a., Martins VT, Testasicca MCS, Lage DP, Costa LE, Lage PS, et al. Sensitive and specific serodiagnosis of *Leishmania infantum* infection in dogs by using peptides selected from hypothetical proteins identified by an immunoproteomic approach. *Clin Vaccine Immunol.* 2013;20(6):835–41.
69. Costa LE, Lima MIS, Chávez-Fumagalli M a., Menezes-Souza D, Martins VT, Duarte MC, et al. Subtractive phage display selection from canine visceral leishmaniasis identifies novel epitopes that mimic *leishmania infantum* antigens with potential serodiagnosis applications. *Clin Vaccine Immunol.* 2014;21(1):96–106.
70. de Paiva-Cavalcanti M, de Moraes RCS, Pessoa-e-Silva R, Trajano-Silva LAM, Gonçalves-de-Albuquerque S da C, Tavares D de HC, et al. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell Biosci [Internet].* 2015;5(1):31. Available from: <http://www.cellandbioscience.com/content/5/1/31>
71. Maia Z, Lírio M, Mistro S, Mendes CMC, Mehta SR, Badaro R. Comparative study of rK39 *Leishmania* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: Systematic review with meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(1).
72. Bhattacharyya T, Bowes DE, El-Safi S, Sundar S, Falconar AK, Singh OP, et al. Significantly Lower Anti-*Leishmania* IgG Responses in Sudanese versus Indian Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(2).
73. Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania* and the Leishmaniasis: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. *Adv Parasitol.* 2007;64.
74. Medicine USNL of. NCBI/genomes; National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA [Internet]. 2017. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
75. Oliveira RDR. Padronização e comparação de técnicas de reação em cadeia por polimerase (PCR) para detecção do metapneumovírus humano em secreções respiratórias São Paulo. 2007;90.
76. Mehrdad G, Gharavi MJ, Akhlaghi L, Mohebbali M, Meamar AR, Aryan E, et al. Development and Assessment of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Diagnosis of Human Visceral Leishmaniasis in Iran. *Iran J Parasitol.* 2014;9(1):50–9.
77. Monroy-Ostria A, Nasereddin A, Monteon VM, Guzmán-Bracho C, Jaffe CL. ITS1 PCR-RFLP diagnosis and characterization of *leishmania* in clinical samples and strains from cases of human cutaneous leishmaniasis in states of the Mexican Southeast. *Interdiscip Perspect*

Infect Dis. 2014;2014.

78. Bensoussan E, Nasereddin A, Schnur LF, Jaffe CL, Jonas F. Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2006;44(4):1435–9.
79. Abbasi I, Kirstein OD, Hailu A, Warburg A. Optimization of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for the detection of *Leishmania* DNA in human blood samples. *Acta Trop [Internet].* 2016;162:20–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.06.009>
80. Pereira L, Abbehusen M, Teixeira C, Cunha J, Nascimento IP, Fukutani K, et al. Vaccination with *Leishmania infantum* Acidic Ribosomal P0 but Not with Nucleosomal Histones Controls *Leishmania infantum* Infection in Hamsters. *PLoS Negl Trop Dis [Internet].* 2015;10:e0003490. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003490>
81. Abass E, Bollig N, Reinhard K, Camara B, Mansour D, Visekruna A, et al. rKLO8, a Novel *Leishmania donovani* - Derived Recombinant Immunodominant Protein for Sensitive Detection of Visceral Leishmaniasis in Sudan. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(7).
82. Ana LPMACSA, ´ MMMACM ´ ,a MJMA, Ulrich ACPRPEA, Steinhoff Henrique C. TeixeiraWorkspace.Henrique LPMAN and letters correspond to the affiliation list. C to expose these in author workspace. A links open the author workspace. CSAN and letters correspond to the affiliation list. C to expose t. Diagnostic accuracy of rKLO8 versus rK26 ELISAs for screening of canine visceral leishmaniasis. *Acta Trop.* 2017;166.
83. Kubar J, Fragaki K. Recombinant DNA-derived leishmania proteins: From the laboratory to the field. *Lancet Infect Dis.* 2005;5(2):107–14.
84. ALEX H. HUTAGALUNG and PETER J. NOVICK. Role of Rab GTPases in Membrana Traffic and Cell Physiology. Manuscript, Author Physiol Cell. 2013;91(1):119–49.
85. Deneka M, Neeft M, Sluijs P van der. Regulation of Membrane Transport by rab GTPases. *Crit Rev Biochem Mol Biol [Internet].* 2003;38(2):121–42. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/713609214>
86. Bahl S, Parashar S, Malhotra H, Raje M, Mukhopadhyay A. Functional characterization of monomeric GTPase Rab1 in the secretory pathway of *Leishmania*. *J Biol Chem.* 2015;290(50):29993–30005.
87. Pereira-Leal JB, Seabra MC. Evolution of the rab family of small GTP-binding proteins. *J Mol Biol [Internet].* 2001;313(4):889–901. Available

from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283601950727>

88. Alberts B, Johnson A, Lewis J et al. Molecular Biology of the Cell. In: New York: Garland Science; 2002., editor. Molecular Biology of the Cell. 4th editio. 2002. p. 720–5.
89. Pierini R, Cottam E, Roberts R, Wileman T. Modulation of membrane traffic between endoplasmic reticulum, ERGIC and Golgi to generate compartments for the replication of bacteria and viruses. *Semin Cell Dev Biol.* 2009;20(7):828–33.
90. Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(2):107–17.
91. Qualmann B, Kessels MM. New players in actin polymerization - WH2-domain-containing actin nucleators. *Trends Cell Biol.* 2009;19(6):276–85.
92. Kunda P, Baum B. The actin cytoskeleton in spindle assembly and positioning. *Trends Cell Biol.* 2009;19(4):174–9.
93. Van Troys M, Huyck L, Leyman S, Dhaese S, Vandekerkhove J, Ampe C. Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation. *Eur J Cell Biol.* 2008;87(8–9):649–67.
94. Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell.* 2003;112(4):453–65.
95. Carlier AM, Laurent V, Santolini J, Melki R, Xia G, Hong Y, et al. Factor ( ADF / Cofilin ) Enhances the Rate of Actin Depolymerizing Filament Turnover: Motility Implication in Actin-based. *J Cell Biol.* 1997;136(6):1307–22.
96. Tammana TVS, Sahasrabudhe AA, Mitra K, Bajpai VK, Gupta CM. Actin-depolymerizing factor, ADF/cofilin, is essentially required in assembly of *Leishmania flagellum*. *Mol Microbiol.* 2008;70(4):837–52.
97. Ralston KS, Hill KL. The flagellum of *Trypanosoma brucei*: New tricks from an old dog. *Int J Parasitol.* 2008;38(8–9):869–84.
98. Schwartz KJ, Peck RF, Tazeh NN, Bangs JD. GPI valence and the fate of secretory membrane proteins in African trypanosomes. *J Cell Sci* [Internet]. 2005;118(Pt 23):5499–511. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16291721>
99. García-Salcedo J a, Pérez-Morga D, Gijón P, Dilbeck V, Pays E, Nolan DP. A differential role for actin during the life cycle of *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* 2004;23(4):780–9.
100. Santarém N, Silvestre R, Tavares J, Silva M, Cabral S, Maciel J, et al. Immune response regulation by *Leishmania* secreted and nonsecreted

- antigens. *J Biomed Biotechnol.* 2007;2007.
101. Chang KP, Reed SG, McGwire BS, Soong L. Leishmania model for microbial virulence: The relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. *Acta Trop.* 2003;85(3):375–90.
  102. Silverman JM, Chan SK, Robinson DP, Dwyer DM, Nandan D, Foster LJ, et al. Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biol* [Internet]. 2008;9(2):R35. Available from: <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2008-9-2-r35>
  103. Skeiky YAW, Benson DR, Elwasila M, Badaro R, Burns JM, Reed SG. Antigens shared by *Leishmania* species and *Trypanosoma cruzi*: Immunological comparison of the acidic ribosomal P0 proteins. *Infect Immun.* 1994;62(5):1643–51.
  104. Soto M, Requena JM, Quijada L, Guzman F, Patarroyo ME, Alonso C. Identification of the *Leishmania infantum* P0 ribosomal protein epitope in canine visceral leishmaniasis. *Immunol Lett.* 1995;48(1):23–8.
  105. Silverman JM, Clos J, de'Oliveira CC, Shirvani O, Fang Y, Wang C, et al. An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *J Cell Sci* [Internet]. 2010;123(6):842–52. Available from: <http://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.056465>
  106. Silverman JM, Reiner NE. *Leishmania* Exosomes Deliver Preemptive Strikes to Create an Environment Permissive for Early Infection. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2012;1(January):1–8. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2011.00026/abstract>
  107. Chamakh-Ayari R, Chenik M, Chakroun AS, Bahi-Jaber N, Aoun K, Meddeb-Garnaoui A. *Leishmania* major large RAB GTPase is highly immunogenic in individuals immune to cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasit Vectors* [Internet]. 2017;10(1):185. Available from: <http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-2127-3>
  108. Tammana TVS, Sahasrabuddhe AA, Bajpai VK, Gupta CM. ADF/cofilin-driven actin dynamics in early events of *Leishmania* cell division. *J Cell Sci.* 2010;123:1894–901.
  109. Tsai C-H, Lee Y-J. Focus on ADF/Cofilin: Beyond Actin Cytoskeletal Regulation. *ISRN Cell Biol* [Internet]. 2012;2012:1–7. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/597876/>
  110. Dai K, Liao S, Zhang J, Zhang X, Tu X. Structural and Functional Insight into ADF/Cofilin from *Trypanosoma brucei*. *PLoS One.* 2013;8(1):2–13.

111. Aslett M, Aurrecochea C, Berriman M, Brestelli J, Brunk BP, Carrington M, et al. TriTrypDB: A functional genomic resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic Acids Res.* 2009;38(SUPPL.1):457–62.
112. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* [Internet]. 2011;8(10):785–6. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nmeth.1701>
113. It A, Predisi T, The M, Predisi A, Sequences P, Options C, et al. PrediSi : [Internet]. 2003 [cited 2015 Jul 1]. Available from: <http://www.predisi.de/home.html>
114. Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* [Internet]. 1999;294(5):1351–62. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283699933107>
115. Gupta R, Brunak S. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pac Symp Biocomput* [Internet]. 2002;322:310–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11928486>
116. Chauhan JS, Rao A, Raghava GPS. In silico Platform for Prediction of N-, O- and C-Glycosites in Eukaryotic Protein Sequences. *PLoS One.* 2013;8(6):1–10.
117. Larsen JEP, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res* [Internet]. 2006;2:2. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1479323&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
118. Raghava SS and GPS. Prediction of continuous B-Cell Epitopes in an antigen Using Recurrent Neural Network. *Proteins.* 2006;65(2):40–8.
119. Chen J, Liu H, Yang J, Chou KC. Prediction of linear B-cell epitopes using amino acid pair antigenicity scale. *Amino Acids.* 2007;33(3):423–8.
120. El-Manzalawy Y, Dobbs D, Honavar V. Predicting flexible length linear B-cell epitopes. *Comput Syst Bioinformatics Conf* [Internet]. 2008;7:121–32. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3400678&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
121. El-Manzalawy Y, Dobbs D, Honavar V. Predicting linear B-cell epitopes using string kernels. *J Mol Recognit.* 2008;21(4):243–55.
122. Vincze T, Posfai J, Roberts RJ. NEBcutter : a program to cleave DNA with restriction enzymes. 2003;31(13):3688–91. Available from:

<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>

123. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith J a, et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. Vol. 1, Molecular Biology. 2003. 146-146 p.
124. Promega. *Protocols & Applications Guide*. *Protoc Appl Guid* [Internet]. 2009;1.1-2; 1.9-15; 9.2-3; 9.31-32; 13.1-23. Available from: [https://www.promega.com/~media/files/resources/paguide/letter/paguide\\_us.pdf?la=en](https://www.promega.com/~media/files/resources/paguide/letter/paguide_us.pdf?la=en)
125. Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*. 1975;258(5536):598–9.
126. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680–5.
127. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1979;76(9):4350–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/388439>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC411572>
128. Blackstock WP, Weir MP. Proteomics: Quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol*. 1999;17(3):121–7.
129. Bridging genomics and proteomics. In: Penningto SR, Dunn MJ. *Proteomics from protein sequence to function*. Cahill DJ, Nordhoff E, O'Brien J, Klose J, Eickhoff H, Lehrach H. BIOS Scientific Publishers Limited. 2001; p.122. 2001;2001.
130. Nickel W, Seedorf M. Unconventional Mechanisms of Protein Transport to the Cell Surface of Eukaryotic Cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* [Internet]. 2008;24(1):287–308. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175320>
131. Schatz G, Dobberstein B. Common Principles of Protein Translocation Across Membranes. *Science* (80- ). 2014;271(5255):1519–26.
132. Simpson RJ, Jensen SS, Lim JWE. Proteomic profiling of exosomes: Current perspectives. *Proteomics*. 2008;8(19):4083–99.
133. Prudovsky I, Tarantini F, Landriscina M, Neivandt D, Kirov A, Small D, et al. Secretion Without Golgi. *J Cell Biochem*. 2009;103(5):1327–43.
134. Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc* [Internet].

- 2007;2(4):953–71. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nprot.2007.131>
135. Bharate SB, Sawant SD, Singh PP, Vishwakarma RA. Kinase Inhibitors of Marine Origin. 2013;
  136. Machado VG, Nome F. Compostos fosfatados ricos em energia. *Quim Nova*. 1999;22(3):351–7.
  137. Heger CD, Wrann CD, Collins RN. Phosphorylation provides a negative mode of regulation for the yeast Rab GTPase Sec4p. *PLoS One*. 2011;6(9):1–12.
  138. Ayad N, Hull M, Mellman I. Mitotic phosphorylation of rab4 prevents binding to a specific receptor on endosome membranes. *EMBO J*. 1997;16(15):4497–507.
  139. Bamburg JR, Bernstein BW. Roles of ADF/cofilin in actin polymerization and beyond. *F1000 Biol Rep* [Internet]. 2010;7(August):1–7. Available from: <http://www.f1000biology.com/reports/10.3410/B2-62>
  140. 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*. 2004;4(6):1633–49.
  141. Pellequer JL, Westhof E, Van Regenmortel MHV. Molecular Design and Modeling: Concepts and Applications Part B: Antibodies and Antigens, Nucleic Acids, Polysaccharides, and Drugs. *Methods Enzymol* [Internet]. 1991;203(X):176–201. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/007668799103010E>
  142. Haste Andersen P, Nielsen M, Lund O. Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. *Protein Sci* [Internet]. 2006;15(11):2558–67. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1110/ps.062405906>
  143. Cheng W, Yin K, Lu D, Li B, Zhu D, Chen Y, et al. Structural insights into a unique legionella pneumophila effector lida recognizing both gdp and gtp bound rab1 in their active state. *PLoS Pathog*. 2012;8(3).
  144. Tartaglia GG, Pechmann S, Dobson CM, Vendruscolo M. A Relationship between mRNA Expression Levels and Protein Solubility in *E. coli*. *J Mol Biol* [Internet]. 2009;388(2):381–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2009.03.002>
  145. Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Vale AM, Marques MJ, Giunchetti RC, Mayrink W, et al. Isotype patterns of immunoglobulins: Hallmarks for clinical status and tissue parasite density in brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol*

- Immunopathol. 2006;112(3–4):102–16.
146. Strauss-Ayali D, Jaffe CL, Burshtain O, Gonen L, Baneth G. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *J Infect Dis.* 2004;189(9):1729–33.
  147. Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H. Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays , an Immunofluorescent-Antibody Test , and Two Rapid Tests and Gel Tests ) for Serological Diagnosis of Symptomatic and Asymptomatic *Leishmania* Infections in Dogs Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent A. Society [Internet]. 2005;43(11):5515–9. Available from: <http://jcm.asm.org/content/43/11/5515.long>
  148. Chuang CC, Chen CW, Su KE, Tsai YT, Du WY. A RAB family antigen of *Angiostrongylus cantonensis* induces a Th1-type immune response in vitro and in vivo. *Exp Parasitol.* 2013;134(1):122–7.
  149. Burns JM, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1993;90(2):775–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=45748&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  150. Kumar R, Pai K, Pathak K, Sundar S. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Recombinant K39 Antigen in Diagnosis and Prognosis of Indian Visceral Leishmaniasis These include: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Recombinant K39 Antigen in Diagnosis and Prognosis of Indian Visceral Leishmani. 2001;8(6):1220–4.
  151. Disease C genomic analysis of three *L* species that cause diverse human, Christopher S Peacock<sup>1</sup>, Kathy Seeger<sup>1</sup>, David Harris<sup>1</sup>, Lee Murphy<sup>1</sup>, Jeronimo C Ruiz<sup>2</sup>, Michael A Quail<sup>1</sup>, Nick Peters<sup>1</sup>, Ellen Adlem<sup>1</sup>, Adrian Tivey<sup>1</sup>, Martin Aslett<sup>1</sup>, Arnaud Kerhornou<sup>1</sup>, Alasdair Ivens<sup>1</sup>, Audrey Fraser<sup>1</sup>, Marie-Adele Rajandream<sup>1</sup>, Tim Carver<sup>1</sup>, Hal JC, Mottram<sup>5</sup>, Deborah F Smith<sup>4</sup> and MB. Comparative genomic analysis fo three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet.* 2008;39(7):839–47.

## 8. ANEXO



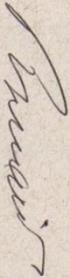
**Universidade de Brasília**  
 Instituto de Ciências Biológicas  
 Comitê de Ética no Uso Animal

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 106668/2014, 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.