

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética**

Wagner José Tenório dos Santos

**Otimização das condições para superexpressão em
Escherichia coli de proteínas quiméricas com potencial
para diagnóstico da leishmaniose visceral**

**Recife
2015**

Wagner José Tenório dos Santos

**Otimização das condições para superexpressão em
Escherichia coli de proteínas quiméricas com potencial
para diagnóstico da leishmaniose visceral**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Dr. Osvaldo Pompilio de Melo Neto

Coorientador : Dr. Franklin Barbalho Magalhães

Recife

2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Santos, Wagner José Tenório dos

Otimização das condições para superexpressão em *Escherichia coli* de proteínas quiméricas com potencial para diagnóstico da leishmaniose visceral/ Wagner José Tenório dos Santos – Recife: O Autor, 2015.

80 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Coorientador: Franklin Barbalho Magalhães

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Ciências Biológicas. Genética, 2015.

Inclui bibliografia

- 1. Leishmaniose visceral 2. Escherichia coli- genética 3. Proteínas I. Melo Neto, Osvaldo Pompílio de (orientador) II. Magalhães, Franklin Barbalho (coorientador) III. Título**

616.9364

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-133

Wagner José Tenório dos Santos

Otimização das condições para superexpressão em *Escherichia coli* de proteínas quiméricas com potencial para diagnóstico da leishmaniose visceral

Aprovado em 06 / 03 / 2015

Banca Examinadora:

Dr. Osvaldo Pompilio de Melo Neto
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

Dra. Ana Maria Benko Iseppon
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Danilo Elias Xavier
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

Dra. Milena de Paiva Cavalcanti
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

Recife
2015

Ao "Poderoso" que sempre esteve junto de mim em
todos os momentos me possibilitando cada
conquista e guiando os meus passos.

Agradecimentos

A toda minha família por sempre acreditar em mim, principalmente aos meus pais, Regivaldo (Vado) e Nadja, e Willian, Wictor e Wanessa, meus irmãos, por todo o aconchego, amor, carinho e confiança que eles me passaram durante esta etapa. Agradecer por nunca ter me deixado fraquejar e sempre seguir em frente;

Ao meu orientador, Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto, pela oportunidade e confiança em me ter como aluno, pelos ensinamentos e orientação sempre prestada;

Ao meu co-orientador, Dr. Franklin Barbalho Magalhães, pela disposição em me guiar nesta etapa, pela amizade, incentivo e todos os conhecimentos que me foram passados;

Agradecer especialmente a Diego de Hollanda e Artur Leonel, pelos ensinamentos passados, pela paciência e pela amizade dentro e fora do laboratório;

A todos que fazem parte do BioTryp: Ada, Amaranta, Antônio, Artur, Camila, Christian, Dani, Diego, Éden, Gustavo, Irassandra, Jana, Jeyse, João, Kleison, Larissa, Ludmila, Maria, Marília, Rodrigo, Rômulo, Tamara e os funcionários do Departamento de Microbiologia pelo convívio diário;

Aos meus amigos de cinema e suchi's: Artur, Carol, Felipe, Ludmila, Nathaly, Rodrigo e Rômulo;

Aos meus grandes e melhores amigos, (Rubens, Jefferson, Érico, Hugo, Geo, Gabriella, Ricardo, Priscilla, Fábio, Mayara, Ivaldo, Ellen), passando desde os que da escola até os dias de hoje a todos os momentos de descontração e companheirismo durante toda a minha caminhada, pelos momentos de amor e amizade que me deram forças;

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães pela infra-estrutura e disponibilidade de recursos e ao órgãos de fomento (CNPq), pela bolsa e pelo apoio financeiro para a realização dos experimentos;

A UFPE e ao Departamento de Genética pelo apoio a minha formação profissional.

"Não fique parado esperando acontecer
Viva sua vida sem medo de arriscar
Se vai dar certo ou não o importante é tentar
Não tenha vergonha do que os outros vão pensar
Para ser alguém na vida, basta acreditar.
É só caindo no chão que se aprende a levantar
Nenhum pássaro no mundo nasce sabendo voar"

Túlio Dek

Resumo

A abordagem mais promissora para um diagnóstico eficaz da Leishmaniose Visceral (LV) utiliza ensaios sorológicos com proteínas recombinantes, pois apresentam grande sensibilidade e especificidade, associados a baixo custo e fácil execução. Misturas de alguns antígenos geram resultados mais promissores, contudo, a produção destas aumenta os custos e dificulta a padronização. É ideal a produção de uma única proteína quimérica que apresente boa sensibilidade e seja eficiente no diagnóstico das formas humana e canina da LV. Este estudo objetivou avaliar as condições para expressão em *Escherichia coli* de genes sintéticos codificando proteínas quiméricas compostas por regiões selecionadas de antígenos previamente identificados de *Leishmania infantum*. Quatro genes, contendo os mesmos antígenos em diferentes combinações, foram otimizados para expressão em procariotos e sintetizados. Sítios internos de restrição foram incluídos nas sequências de forma a permitir a eliminação seletiva de segmentos específicos e se avaliar o efeito na expressão bacteriana da presença de diferentes regiões antigênicas, bem como de um peptídeo estimulador da tradução. A expressão das proteínas geradas foi então avaliada através de ensaios de *Western Blot*. Os resultados obtidos mostraram uma expressão equivalente, porém limitada, das diferentes proteínas quiméricas, independente da sua composição antigênica. Proteínas menores tiveram resultados mais promissores na expressão e o peptídeo estimulador da tradução foi essencial para otimizar essa expressão, porém ainda faz-se necessário mais estudos avaliando a sensibilidade e especificidade dessas proteínas para o diagnóstico da LV.

Palavras-Chaves: Diagnóstico, proteínas quiméricas, leishmaniose visceral

Abstract

The most promising approach for effective diagnosis of Visceral Leishmaniasis (VL) uses serological assays with recombinant proteins, since they have high sensitivity and specificity associated with low cost and easy implementation. Mixtures of some antigens generate the most promising results, however, these increase production costs and impairs its standardization. The best option would be the production of a single chimeric protein showing good sensitivity and being effective for the diagnosis of the human and canine forms of VL. This study aimed to evaluate the conditions for expression in *Escherichia coli* of synthetic genes encoding chimeric proteins composed of selected regions of previously identified antigens of *Leishmania infantum*. Four genes, containing the same antigens in different combinations, were optimized for expression in prokaryotes and synthesized. Internal restriction sites were included in the sequences to allow selective removal of specific segments and to evaluate the effect on the bacterial expression of the presence of different antigenic regions, as well as a translational enhancer peptide. The expression of proteins generated was then evaluated by Western blot assays. The results showed equivalent expression, however limited, of the different chimeric proteins, regardless of their antigenic composition. Smaller proteins produced more promising results in the expression and the translation enhancer peptide was important to optimize this expression, however further studies are still necessary to evaluate the sensitivity and specificity of these proteins for the diagnosis of VL.

Key Words: Diagnosis, chimeric proteins, visceral leishmaniasis

Lista de Ilustrações

Figura 1: Comparação entre as cerâmicas pré-Colombianas e pacientes com lesões causadas por leishmaniose	4
Figura 2: Classificação taxonômica de espécies representativas de <i>Leishmania</i> sp. em seus três subgêneros	6
Figura 3: Formas da <i>Leishmania</i> observadas ao microscópio óptico	8
Figura 4: Insetos Flebotomíneos	9
Figura 5: Ciclo de vida das espécies de <i>Leishmania</i>	11
Figura 6: Distribuição geográfica da Leishmaniose Cutânea no mundo.....	13
Figura 7: Distribuição geográfica da Leishmaniose Visceral no mundo	14
Figura 8: Sinais característicos de Leishmaniose tegumentar ou cutânea.....	16
Figura 9: Sinais clínico característico da leishmaniose mucocutânea.....	17
Figura 10: Sinal clínico característicos da Leishmaniose Visceral	18
Figura 11: Mapa do pUC57 simples	38
Figura 12: Esquema representativo dos genes quiméricos sintetizados	47
Figura 13: Confirmação da primeira subclonagem.....	49
Figura 14: Construção da quimera 1	51
Figura 15: Construção da quimera 2	52
Figura 16: Construção da quimera 3	54
Figura 17: Construção da quimera 4	56

Figura 18: Gel representativo mostrando a liberação dos insertos nos tamanhos esperados.....	58
Figura 19: Análise da expressão em Escherichia coli das diferentes proteínas recombinantes.....	60
Figura 20: Western Blot representativo do reconhecimento das construções quiméricas derivadas do gene Q1.....	63
Figura 21: Western Blot representativo do reconhecimento das construções quiméricas derivadas do gene Q2.....	64
Figura 22: Western Blot representativo do reconhecimento das construções quiméricas derivadas do gene Q3.....	66
Figura 23: Western Blot representativo do reconhecimento das construções quiméricas derivadas do gene Q4.....	67

Lista de Tabelas

Tabela 1: Técnicas mais comumente utilizadas para diagnóstico de Leishmaniose Visceral.....	27
Tabela 2: Nomenclatura das construções geradas e o tamanho do inserto liberado quando digeridas pelas enzimas <i>XbaI/HindIII</i>	55
Tabela 3: Nomenclatura das construções proteicas e seus pesos moleculares determinados no gel SDS-PAGE.....	57
Tabela 4: Todas as construções quiméricas completas e truncadas os seus tamanhos previstos, em destaque a sequência que melhor teve um perfil de expressão.....	61

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Item	Definição
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i> - Célula apresentadora de antígeno
CDC	Centro de controle de doenças
cDNA	DNA complementar
D.O	Densidade óptica
DAT	<i>Direct Antiglobulin Test</i> - Teste de Aglutinação Direta
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> – Ácido Desoxirribonucléico
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i> – Ensaio imunoenzimático
IC	Teste Imunocromatográfico
IPTG	Isopropil-tio- β -D-galactopiranosídeo
IL	Interleucina
kDa	KiloDalton
LB	Luria Bertani
LC	Leishmaniose cutânea
LDPC	Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar
LMC	Leishmaniose Muco-Cutânea
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
mRNA	RNA mensageiro
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em Cadeia da Polimerase
pUC57	Vetor de clonagem comercial
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta

SDS-	<i>Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
PAGE	<i>Dodecil sulfato de sódio – Eletroforese em gel de poliacrilamida</i>
TBS	<i>Tris Buffered Saline- Tampão Salino Tris</i>
Th1/2	Células T auxiliares
tRNA	RNA transportador
WB	Western-Blot
WHO	<i>World Health Organization – Organização Mundial de Saúde</i>

Sumário

Resumo.....	Viii
Abstract.....	Ix
Lista de ilustrações.....	X
Lista de Tabelas.....	Xii
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos.....	Xiii
1. Introdução.....	1
2. Revisão da Literatura.....	3
2.1 As Leishmanioses.....	3
2.1.1 Histórico e Taxonomia.....	4
2.1.2 Aspectos morfológicos do parasite.....	7
2.1.3 Os Vetores.....	9
2.1.4 Ciclo Biológico.....	10
2.2 Epidemiologia.....	12
2.3 Manifestações Clínicas.....	14
2.3.1 Leishmaniose Cutânea ou Tegumentar.....	15
2.3.2 Leishmaniose Mucocutânea.....	16
2.3.3 Leishmaniose Visceral Humana.....	17
2.3.4 Leishmaniose Visceral Canina.....	18
2.4 Imunopatologia da Leishmaniose.....	19

2.4.1 Resposta Imune.....	19
2.5 Diagnóstico da Leishmaniose Visceral.....	22
2.5.1 Método Clínico.....	23
2.5.2 Método Parasitológico.....	23
2.5.3 Métodos Moleculares.....	24
2.5.4 Métodos Sorológico e Imunológico.....	24
2.6 Controle da Leishmaniose Visceral.....	28
2.7 Vacinas contra Leishmaniose Visceral.....	30
2.7.1 Vacina contra Leishmaniose Visceral Canina.....	33
2.8 Estudos Prévios que originaram este trabalho.....	33
3. Objetivos.....	36
3.1 Objetivo Geral.....	36
3.2 Objetivos Específicos.....	36
4. Material e Métodos.....	37
4.1 Construção dos genes quiméricos e otimização da sua expressão.....	38
4.2 Digestão com enzimas de restrição.....	38
4.3 Purificação dos Insertos e dos Vetores Plasmidiais.....	39
4.4 Ligação dos Fragmentos, Transformação, Minipreparação e Confirmação da Subclonagem.....	40
4.4.1 Estratégias de Truncagens dos Genes Quiméricos.....	41

4.4.2 Confirmação da Subclonagem e da Construção das Quimeras.....	42
4.5 Expressão das proteínas Quiméricas.....	42
4.6 Purificação das Proteínas Quiméricas.....	43
4.7 Ensaios de <i>Western-Blot</i>	44
5. Resultados.....	46
5.1 Subclonagem dos Genes Sintéticos (Q1, Q2, Q3 e Q4) em Vetores de Expressão.....	48
5.2 Subclonagens para as construções quiméricas parciais.....	49
5.2.1 Obtenção das truncagenes da construção Q1.....	50
5.2.2 Obtenção das truncagenes da construção Q2.....	51
5.2.3 Obtenção das truncagenes da construção Q3.....	52
5.2.4 Obtenção das truncagenes da construção Q4.....	55
5.2.5 Análise das diferentes construções quiméricas.....	57
5.3 Expressão das proteínas quiméricas completas e truncadas.....	58
5.4 Reconhecimento das proteínas quiméricas por anticorpos e <i>Western-Blot</i>	61
5.4.1 Reconhecimento das proteínas quiméricas Q1 e suas truncagens.....	62
5.4.2 Reconhecimento das proteínas quiméricas Q2 e suas truncagens.....	63
5.4.3 Reconhecimento das proteínas quiméricas Q3 e suas	65

truncagens.....	
5.4.4 Reconhecimento das proteínas quiméricas Q4 e suas truncagens.....	66
6. Discussão.....	68
7. Conclusões.....	72
8. Referências Bibliográficas.....	73
9. Anexo Currículo Lattes atualizado (correspondente ao período do curso).....	79

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose constitui uma das seis doenças tropicais que causam mais preocupações no mundo. A doença é letal quando não tratada e responde por mais de 200 mortes anuais. No Brasil, a Leishmaniose Visceral (LV), a forma mais grave da doença, é associada à infecção por *Leishmania infantum* e afeta principalmente crianças, com 53,6% dos casos ocorrendo na região Nordeste. Para o seu controle é imprescindível à construção de um teste diagnóstico eficaz e de baixo custo dirigido para o seu reservatório, o cão doméstico e para os indivíduos afetados.

Atualmente estudos mais promissores para o desenvolvimento de testes com essas características utilizam ensaios sorológicos com proteínas recombinantes, pois apresentam grande sensibilidade e especificidade, associados a baixo custo e fácil execução.

Sabe-se que a utilização de proteína recombinante na confecção de testes sorológicos minimiza os problemas de produção e padronização. Até o momento, entretanto, ainda não se conseguiu identificar um único antígeno capaz de, por meio de testes sorológicos, detectar satisfatoriamente a produção de anticorpos em cães e humanos com LV, tendo em vista a diversidade da resposta imune humoral gerada durante a doença.

Misturas de duas ou mais proteínas recombinantes geraram resultados mais promissores, contudo, a produção de um sistema de diagnóstico com dois, três ou mais antígenos, aumenta os custos e dificulta a padronização. Considera-se que o ideal seria a produção de uma única proteína quimérica que apresente sensibilidade comparada às misturas de antígenos e que seja tão eficiente no

diagnóstico da forma humana quanto canina da LV, tendo em vista que esta doença é um grave problema de Saúde Pública, pois os cães são muito afetados pelo controle ineficaz desta doença.

Neste trabalho, regiões antigênicas de proteínas pré-selecionadas tiveram suas regiões codificadoras otimizadas para expressão em procariotos e foram inseridas em sequência de forma a gerar genes quiméricos contendo diferentes combinações antigênicas. Estes genes foram desenhados fusionados a sítios múltiplos de clonagem e contendo em suas extremidades fragmentos codificando para peptídeos sintéticos comumente utilizados para se estimular a expressão em bactérias ou facilitar a purificação das respectivas proteínas recombinantes. Para obtenção de condições ótimas de expressão foi avaliada a composição das regiões antigênicas incluídas na proteína quimérica, bem como a presença ou ausência dos peptídeos estimuladores da tradução. As melhores proteínas completas e suas fragmentações geradas foram então purificadas por cromatografia de afinidade e, em seguida, foram avaliadas quanto ao potencial no reconhecimento do anticorpo através de ensaios de *Western-Blot*, das quais as melhores combinações serão testadas para avaliar a sensibilidade e especificidade frente a soros de cães e humanos com LV.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 As Leishmanioses

As Leishmanioses são doenças infecto-parasitárias causadas por protozoários flagelares pertencentes à família Trypanosomatidae e ao gênero *Leishmania*. Estes protozoários apresentam um ciclo de vida heteróximo, vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados (incluindo o homem e outros mamíferos silvestres e/ou domésticos como o cão) e insetos dípteros vetores, estes últimos pertencendo aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. As Leishmanioses continuam sendo uma das principais doenças negligenciadas, endêmica em regiões tropicais, subtropicais e do Mediterrâneo. Esta doença pode ser apresentada através de três formas clínicas distintas, variando de acordo com a espécie de parasita e a forma de manifestação. São elas: a Leishmaniose Tegumentar ou Cutânea (LC); a Leishmaniose Mucocutânea (LMC); e a Leishmaniose Visceral (LV), forma mais grave da doença (Ministério da Saúde, 2014).

A LC manifesta-se como lesões de pele numerosas principalmente sobre as partes do corpo a descoberto, enquanto que a LMC desfigura e devasta partes faciais como nariz e boca (Chappuis et al. 2007). A LV, por sua vez, é a forma mais grave da doença podendo ser fatal quando não tratada (Giorgobiani et al. 2011).

2.1.1 Histórico e Taxonomia

Evidências de muito tempo atrás, entre 400 e 900 anos d.C, sugerem a ocorrência precoce de casos de Leishmaniose. Em cerâmicas e estátuas antigas deste período observa-se deformações de lábios e narizes, lesões na pele e deformidades faciais humanas, sinais característicos da Leishmaniose Mucocutânea. Outro tipo de evidência deriva da observação de lesões ulcerativas em corpos mumificados identificados através de descobertas arqueológicas (Lainson, 2010) (Figura 1). É possível que a Leishmaniose Visceral seja tão antiga quanto à Leishmaniose Tegumentar ou Mucocutânea, porém pela dificuldade em identificar sinais externos de fácil visualização fica difícil a sua identificação, não havendo relatos escritos ou de imagem em relação a essa forma da doença (Tuon *et al*, 2008; Lainson, 2010).



Figura 1. Comparação entre as cerâmicas pré-Colombianas e pacientes com lesões causadas por leishmaniose. A figura mostra a presença de leishmaniose em populações anteriores à colonização europeia. Fonte: Fundação Osvaldo Cruz (2012).

Em 1903, três pesquisadores: James Wright, William Leishman e Charles Donovan, descobriram, independentemente, o agente etiológico da Leishmaniose, que possuía semelhanças com a forma intracelular (amastigota) do *Trypanosoma*. Ross em 1903 estabeleceu um novo gênero, *Leishmania*, e em 1908, na Tunísia, identificou-se em cão uma nova espécie que passou a ser chamada de *Leishmania infantum* (Basano e Camargo, 2004).

Em 1909 no Brasil, Lindenberg isolou formas do parasito idênticas a *Leishmania tropica* em lesões cutâneas de trabalhadores residentes próximos à mata no interior de São Paulo. Nesse mesmo ano, Gaspar Vianna batizou essa forma isolada de *Leishmania braziliensis* por considerar esse parasita diferente da *L. tropica*. (Pessôa e Martins, 1982; Paraguassu-chaves, 2001; Basano e Camargo, 2004).

Em 1982, foi realizada a primeira revisão taxonômica das espécies de *Leishmania*. Os parasitas eucariotos do gênero *Leishmania* são taxonomicamente pertencentes ao reino Protista, filo Euglenozoa, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, e são subdivididos em dois grandes subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (Sharma e Singh, 2008; Tuon *et al.*, 2008). O subgênero *Sauroleishmania*, apenas infecta espécies de lagartos, ficando em um grupo separado. Os dois grandes subgêneros foram criados em 1987 por Lainson e Shaw (Schmidt *et al.*, 2009; Neves, 2011), com base em estudos observando as diferenças no desenvolvimento do parasito no intestino do inseto vetor.

O subgênero *Leishmania* é composto pelas espécies dos complexos *donovani* (*L. donovani*, *L. infantum* /*chagasi*) e *mexicana* (*L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. venezuelensis*) e as espécies *L. tropica*, *L. major* e *L. aethiopica*, que se desenvolvem no intestino médio do vetor. Já o subgênero

Viannia é representado pelas espécies, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* e *L. peruviana*, que se localizam na parte posterior do intestino do flebotomíneo (Schmidt *et al.*, 2009). O subgênero *Sauroleishmania*, por sua vez, inclui as espécies *L. tarentolae* e *L. gymnodactyli*, que não infectam o homem (Bates, 2007; C.D.C., 2008). Atualmente, existem cerca de 30 espécies conhecidas de *Leishmania* (Figura 2), das quais 10 estão presentes no Velho Mundo e as outras 20 no Novo Mundo, sendo pelo menos 21 delas capazes de causar a Leishmaniose cutânea e/ou Visceral (Ready, 2013; Schönan *et al.*, 2011).

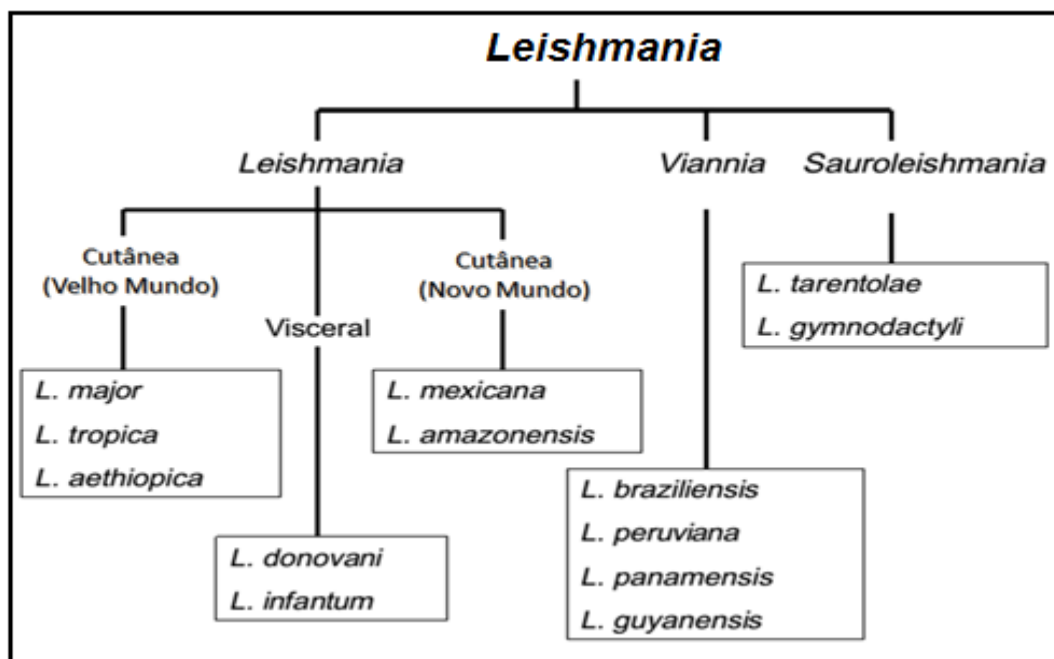


Figura 2. Classificação taxonômica de espécies representativas de *Leishmania* sp. em seus três subgêneros. As espécies citadas acima incluem algumas das espécies mais conhecidas que são o foco de pesquisas biomédicas. Os parasitos nos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* infectam mamíferos, enquanto os do *Sauroleishmania* infectam répteis como seus hospedeiros vertebrados. Adaptado de Bates, 2007; Nascimento, 2012.

Existe uma grande dificuldade em classificar as espécies do gênero *Leishmania*, devido à sua grande semelhança morfológica (Schmidt *et al.*, 2009). Primariamente essa classificação se baseou em vários critérios vetoriais, distribuição geográfica, tropismo, propriedades antigênicas e manifestações clínicas, que muitas vezes se mostraram inadequadas (Bañuls *et al.*, 2007).

Atualmente, ferramentas de caracterização genética ou molecular passaram a ser utilizadas e diversas classificações, bem como a origem filogenética de cada espécie, foram propostas. Uma destas discordâncias foi sobre a classificação da *L. chagasi* e da *L. infantum*, que atualmente são considerados parasitos idênticos, da mesma espécie, esta nomenclatura definindo apenas onde eles se encontram, Novo Mundo ou Velho Mundo, mas que atualmente utiliza a nomenclatura mais antiga *L. infantum* (Lukes *et al.*, 2007; Kuhls *et al.*, 2011; Leblois *et al.*, 2011; Schönian *et al.*, 2011).

2.1.2 Aspectos morfológicos do parasita

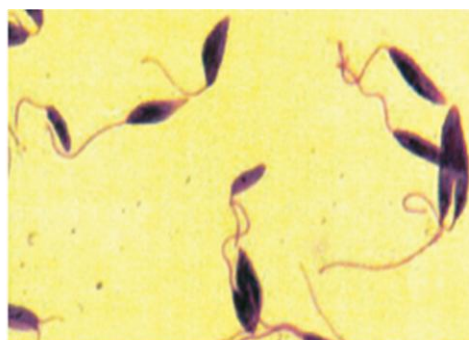
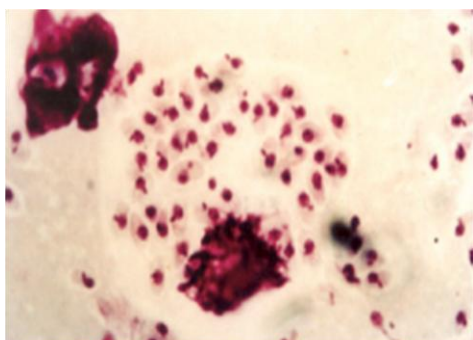
Os protozoários do gênero *Leishmania* são microorganismos que possuem um ciclo de vida digenético (dois hospedeiros) e apresentam duas formas evolutivas bem distintas, tanto funcionalmente quanto morfológicamente, as formas promastigotas e as amastigotas (Tsigankov *et al.*, 2013; Fernandes, 2013).

As formas amastigotas (Figura 3A) estão presentes no hospedeiro vertebrado, apresentando formato de esferoide para ovóide e medindo de 1 a 3 µm de comprimento por 3 a 6 µm de diâmetro. São formas intracelulares obrigatórias, imóveis, pois possuem um curto flagelo situado dentro na bolsa flagelar, a qual funciona principalmente como um local de endocitose e exocitose.

Desenvolvem-se em vacúolos de células do sistema fagocítico mononuclear e, conseqüentemente, são células acidófilas, adaptadas ao baixo pH deste ambiente (Schmidt et al., 2009; Neves, 2011).

As formas promastigotas (Figura 3B) são encontradas no intestino do vetor (hospedeiro invertebrado), apresentando-se alongada com uma grande variação no seu tamanho (medindo de 10 a 40 μm de comprimento por 1,5 a 3 μm de diâmetro). São formas extracelulares, flageladas, que podem se apresentar como promastigotas procíclicas, definidas como células mais ovóides, móveis e com atividade replicativa, ou como promastigotas metacíclicas, formas infectivas, mais alongadas e sem capacidade de proliferação (Besteiro et al., 2007; Brotherton et al, 2010; Neves, 2011, Bhaskar, Neeti, Goya, 2012).

A diferenciação morfológica entre as duas formas de vida de *Leishmania* é ativada pela variação de temperatura e pH enfrentada pelo parasita durante seu ciclo de vida e pode ser mimetizada em culturas *in vitro* (Brotherton et al, 2010; Tsigankov et al, 2013).



A) Forma aflagelar (amastigota) B) Forma flagelar (promastigota)

Figura 3. Formas da *Leishmania* observadas ao microscópio óptico. (A) formas amastigotas visualizadas em um macrófago infectado de rato. (B) e formas promastigotas procíclicas Fonte: <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/morfologia.htm>

2.1.3 Os Vetores

A Leishmaniose tem como vetores, invertebrados pertencentes ao filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. Dois gêneros são conhecidos, *Phlebotomus* (presente no Velho Mundo) e *Lutzomyia* (presente no Novo Mundo) (Figura 4) (Sharma e Singh, 2008). Esses flebotomíneos vetores medem aproximadamente 2 a 3 mm de comprimento e apresentam corpo e asas cobertas por pelos e cores variando de cinza-prata a preto. Quando estão em repouso suas asas ficam entreabertas apresentando a característica de “V”. São insetos que não conseguem voar longas distâncias, geralmente voam muito baixo e são mais ativos no alvorecer e no crepúsculo (Kato *et al.*, 2010).

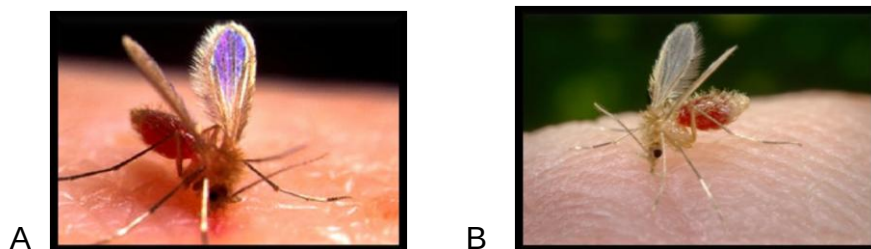


Figura 4. Insetos *Flebotomíneos* A: *Lutzomyia* sp. e B: *Phlebotomus* sp se alimentando em humanos. Estão representados os hospedeiros invertebrados dos parasitos *Leishmania* sp, estando o gênero *Phlebotomus* presente no Velho Mundo e *Lutzomyia* nas Américas. Fonte: Sharma e Singh, 2008.

De acordo com sua taxonomia, são registradas aproximadamente 800 espécies de flebotomíneos, divididas em cinco gêneros. Esses gêneros são *Phlebotomus* e *Sergentomyia* no Velho Mundo e *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e

Warileya no Novo Mundo. Estudos comprovaram que apenas os gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) são responsáveis pela transmissão das diversas formas de Leishmaniose e menos de 10% de todas as espécies identificadas são apontadas como vetores desta doença (Sharma e Singh, 2008; Kato *et al.*, 2010). No Brasil, a transmissão da leishmaniose ocorre através das espécies de *Lutzomyia*, sendo as principais formas: *Lu. (Lutzomyia) longipalpis*, *Lu. (Nyssomyia) intermedia* e *Lu. (N.) whitmani* (Carvalho *et al*, 2013).

2.1.4 Ciclo Biológico

O ciclo de vida do parasita *Leishmania* é dividido em dois momentos, o primeiro no hospedeiro vertebrado (mamífero) e o segundo no hospedeiro invertebrado (flebotomíneo) (Dawit G, *et al*; 2013). Este ciclo começa quando a fêmea do mosquito flebotomíneo infectado ingere sangue do hospedeiro vertebrado (cão ou humano). Enquanto o mosquito ingere o sangue, o inseto regurgita as formas promastigotas metacíclicas do parasita (forma infectante, localizada na válvula estomadeal do vetor), juntamente com seus componentes salivares. As promastigotas metacíclicas são então fagocitadas por diferentes tipos de células do sistema imune encontrados no local da inoculação onde se diferenciam nas formas amastigotas (Kaye & Scott, 2011) (Figura 5).

Este ciclo se completa quando os macrófagos infectados por amastigotas são ingeridos por outro flebotomíneo, onde passarão por vários estágios de desenvolvimento até voltar à forma metacíclica. Cada um desses estágios é caracterizado por mudanças morfológicas e funcionais com o objetivo de assegurar a sobrevivência dentro do vetor (Kamhawi, 2006). Após as etapas de

diferenciação, as formas promastigotas metacíclicas migrarão para a válvula estomacal para serem inoculadas em outro hospedeiro vertebrado e dar continuidade ao ciclo (McGwire and Satoskar, 2014; Rougeron *et al*, 2010) (Figura 5).

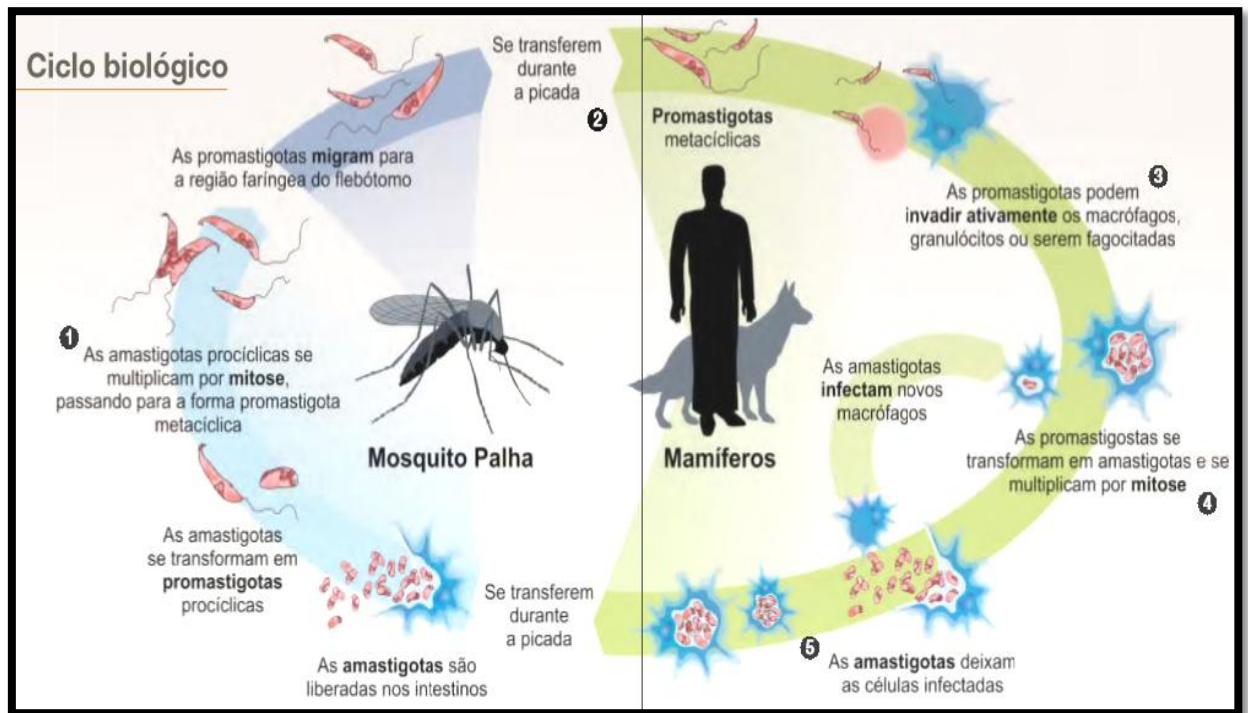


Figura 5. Ciclo de vida das espécies de *Leishmania*. Mosquitos flebotomíneos regurgitam as formas promastigotas metacíclicas no hospedeiro vertebrado (mamíferos), onde serão fagocitadas por células do sistema imune (macrófagos) e diferenciadas nas formas amastigotas. Os macrófagos infectados com amastigotas são ingeridos por outros mosquitos vetores. Dentro do mosquito, as formas amastigotas passarão por várias diferenciações até voltarem às formas promastigotas metacíclicas, que se localizarão na válvula estomacal do inseto e infectarão novos hospedeiros. Adaptado de: http://Leishmaniasis_life_cycle_diagram_en.svg

2.2 Epidemiologia

A Leishmaniose é considerada como a principal doença negligenciada e afeta principalmente indivíduos de países em desenvolvimento. A prevalência ocorre em regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia, Mediterrâneo, Sudoeste da Europa e Sul e Centro da América. Esta doença é endêmica em 98 países, sendo 72 países em desenvolvimento. Aproximadamente 350 milhões de pessoas estão em situação de risco e 1,5 a 2 milhões de novos casos são registrados anualmente (Alvar J *et al*, 2012).

A Leishmaniose Cutânea é a forma mais comum de leishmaniose e provoca úlceras nas partes expostas do corpo, deixando cicatrizes ao longo da vida e deficiência grave, com 95% dos casos ocorrendo nas Américas, na bacia do Mediterrâneo e do Oriente Médio e Ásia Central. Mais de dois terços dos novos casos de LC ocorrem em seis países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irão (República Islâmica do) e República Árabe da Síria. Estima-se que 0,7 a 1,3 milhões de novos casos ocorrem em todo o mundo anualmente (WHO, 2013) (Figura 6).

A Leishmaniose Mucocutânea conduz à destruição parcial ou total das membranas mucosas do nariz, boca e garganta e quase 90% dos casos registrados de MC ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru (WHO, 2013).

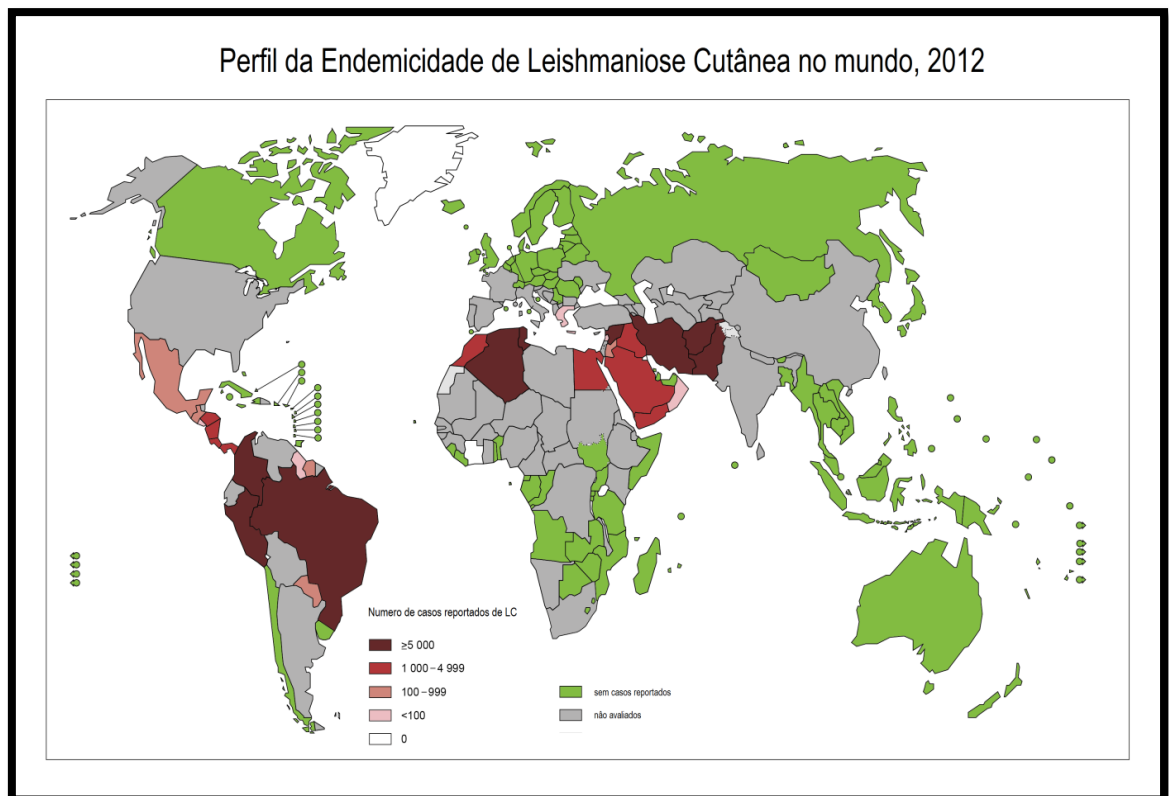


Figura 6. Distribuição geográfica da Leishmaniose Cutânea no mundo: As áreas em vermelho apresentam prevalência sendo as mais escuras com um maior numero de casos de LC, onde o Brasil se encontra inserido. Nas áreas em verde não existem casos reportados. Fonte: http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_CL_2013

A Leishmaniose Visceral, também conhecida como Calazar, é fatal se não for tratada. É caracterizada por ataques de febre irregular, perda de peso, aumento do baço e do fígado, e anemia. É altamente endêmica no subcontinente indiano e no leste da África. Estima-se que 200 a 400 mil novos casos de LV ocorrem em todo o mundo a cada ano. Mais de 90% dos novos casos ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (Figura 7) (WHO, 2013).

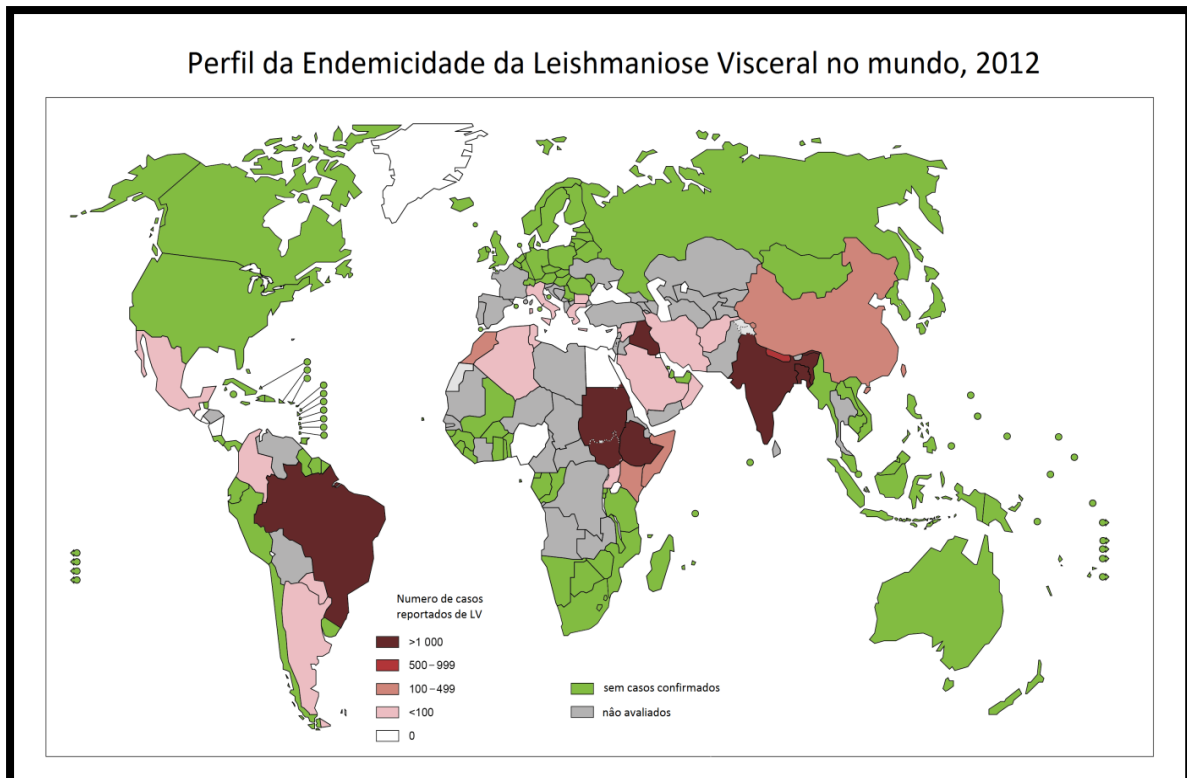


Figura 7: Distribuição geográfica da Leishmaniose Visceral no mundo: As áreas mais escuras apresentam uma maior prevalência no numero de casos de LV, onde o Brasil se encontra inserido. Nas áreas em verde não existem casos reportados. Fonte: http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_VL_2013

No Brasil, a LC ou LT (Leishmaniose Tegumentar Americana) é o tipo mais frequente de Leishmaniose e tem como principal causador a *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Costa-Silva *et al*, 2014). Ela ocorre predominantemente em estados da região Norte e Centro Oeste e acomete indivíduos de ambos os sexos e de todas as faixas etárias, predominando os maiores de 10 anos, com 90% dos casos, e o sexo masculino, em 74% (Ministério da Saúde, 2013). Em relação à LV, no Brasil ela é associada à infecção por *L. infantum*, e afeta principalmente crianças (53,6% dos casos ocorrem na região Nordeste) (Ministério da Saúde, 2014). Ela apresenta uma média de aproximadamente 3,5 mil casos anuais registrados, com estimativa de até 6 mil casos (Alvar *et al*, 2012).

Segundo o Ministério da Saúde, de 2000 a 2013, foi registrado em Pernambuco 1.589 casos da LV, com 122 mortes. (Ministério da Saúde, 2014). Mais de 50% das ocorrências foram registradas no Sertão e 37,9% no Agreste, com a Região Metropolitana do Recife e o litoral do estado somando aproximadamente 10% dos registros. O Estado tem altos índices de prevalência da doença e ocorrem registros de casos em todas as regiões geográficas. Chama atenção à existência de um grupo endêmico localizado na região Agreste, formado por municípios como Altinho, Caruaru, Riacho das Almas, São Caetano e Surubim, onde se concentra número significativo de casos. Nas outras regiões do Estado, merecem destaque os municípios de Salgueiro (Sertão), Petrolina (Sertão do São Francisco), Itamaracá (Região Metropolitana de Recife) e Goiana (Zona da Mata) (Dantas-Torres e Brandão-Filho, 2006; Brasil, 2011).

2.3 Manifestações Clínicas

2.3.1 Leishmaniose Cutânea ou Tegumentar

A LC ou LT é a forma menos grave de Leishmaniose e pode ser causada pelas espécies: *Leishmania (L.) major*, *L. (L.) tropica* (Velho Mundo), *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) braziliensis* (Novo Mundo). A forma de manifestação dessa doença é caracterizada por uma lesão ulcerativa ou nodular, que se desenvolve nas proximidades ou no próprio local da inoculação do parasito. Elas geralmente são encontradas em áreas descobertas do corpo, susceptíveis a picada do vetor,

como rosto, antebraço e parte inferior das pernas (McGwire & Satoskar, 2013). (Figura 8).



Figura 8. Sinais característicos de Leishmaniose tegumentar ou cutânea. Lesão ulcerada franca, única, pequena, com bordas elevadas, infiltradas com hiperemia ao seu redor e fundo granuloso, (Ministério da Saúde, 2010)

2.3.2 Leishmaniose Mucocutânea

A LMC acomete os tecidos mucocutâneos, dependendo do nível da metástase dos parasitos ou da extensão da lesão no tecido cutâneo-mucoso. Causada pelo parasita *Leishmania braziliensis*, a LMC apresenta frequentemente uma infecção desfigurante resultando na destruição local de tecido do nariz, boca, oro-naso-faringe e pálpebras e pode progredir para danos à função respiratória e dificultar a nutrição. A patogênese subjacente resultante da doença não é bem compreendida e é provavelmente resultado de uma complexa interação entre parasito e o hospedeiro (De Oliveira e Brodskyn, 2012; Goto e Laulleta, 2012). (Figura 9).



Figura 9. Sinal clínico característico da leishmaniose mucocutânea.

Imagens de pacientes com lesões características de leishmaniose mucocutânea. Fonte: Chappuis *et al.*, (2007)

2.3.3 Leishmaniose Visceral humana

Após o período de incubação (cerca de 2-6 meses), os sintomas da LV aparecem quando o parasita se estabelece nos órgãos viscerais, tais como baço, nódulos linfáticos, medula óssea e fígado. Os sintomas clínicos desta forma de Leishmaniose são caracterizados por uma infecção sistêmica e incluem febre persistente prolongada, perda de apetite, perda de peso, fadiga, tosse, dor abdominal, edema e diarreia, bem como aumento do baço, fígado e nódulos linfáticos, pancitopenia, anemia, e hipergamaglobulinemia (Chappuis *et al.*, 2007).

A infecção, causada pelos protozoários *L. donovani* ou *L. infantum*, nem sempre resulta em sinais clínicos e sintomas, desta forma alguns indivíduos mantêm o parasita sem manifestação da doença, sugerindo que o estado imunológico do hospedeiro pode desempenhar um papel importante. No entanto, em qualquer fase da infecção, se a imunidade enfraquece a LV assintomática ou subclínica pode emergir como uma doença.

Cerca de 5 a 20% dos pacientes de LV tratados no subcontinente indiano podem desenvolver a Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar (LDPC), normalmente

após o período de 2 a 7 anos. Erupções cutâneas e ulcerações maculopapular ou nodulares na pele são os sintomas comuns em LDPC (Singh, 2006). Além disso, a LDPC também foi encontrada em indivíduos que nunca tiveram história prévia de LV, sugerindo assim a sua infecção subclínica. A LDPC não é uma doença fatal, mas suas lesões de pele servem de acolhimento dos parasitas invasivos infectados, que pode servir como um reservatório para a transmissão de LV (Figura 10).



Figura 10. Sinal clínico característicos da Leishmaniose Visceral. As demarcações indicam os pacientes com hepatoesplenomegalia, característica clínica típica da LV. Fontes: Ministério da Saúde, (2006).

2.3.4 Leishmaniose Visceral canina

A LV canina está presente em aproximadamente 50 países e no Brasil os cães soropositivos de áreas urbanas e rurais desta doença podem corresponder de 5,9 a 25% da população total (Bruno *et al*, 2014). O cão doméstico desempenha grande importância na epidemiologia da LV em áreas endêmicas, pois é o principal reservatório doméstico da doença, pois atualmente já é encontrado casos de LV em gatos. (Pirajá *et al*, 2013). Essa importância advém do fato do Calazar (nome popular dado a doença) ser mais prevalente na

população canina que na humana, e dos casos humanos normalmente serem precedidos por casos caninos (Ministério da Saúde, 2013).

A LV canina é de evolução lenta e início insidioso. Esta é uma doença sistêmica e severa, cujas manifestações clínicas são dependentes do tipo de resposta imunológica expressa pelo animal infectado. O quadro clínico dos cães infectados apresenta um espectro de características clínicas que varia do aparente estado sadio a um severo estágio final. Inicialmente, os parasitas estão presentes no local da picada, mas posteriormente ocorre a infecção de vísceras e dispersão através da derme. A perda de pelos causada pela infecção expõe grandes áreas da pele extensamente parasitada (Saridomichelakis, 2009, Ministério da Saúde, 2014). Os sintomas clínicos mais frequentemente observados na LV canina incluem dificuldade locomotora, articulações aumentadas e dolorosas, perda de peso, polidipsia, apatia, anorexia, vômito e diarreia, polifagia, epistaxe e melena. Dentre os achados de exame físico, merecem destaque a linfadenomegalia, caquexia, hipertermia, esplenomegalia, uveíte e conjuntivite. As lesões renais são a principal causa de óbito na LV canina (Ribeiro, 2007).

2.4 Imunopatologia da Leishmaniose Visceral

2.4.1 Resposta Imune

O sistema imunológico apresenta funcionamento complexo e envolve interações específicas entre os seus componentes e entre os diferentes parasitos. A atuação do sistema imunológico confere ao indivíduo a imunidade nas formas

inata (neutrófilos, macrófagos e células dendríticas) e adaptativa (linfócitos T e B), dirigidas em resposta a um antígeno (Kedzierski, 2010). Para iniciar a cascata da resposta imune, o macrófago apresenta os antígenos aos linfócitos T CD4+, que podem ser diferenciados em pelo menos duas subpopulações: Th1 e Th2. A diferenciação preferencial das células Th1 ou Th2 depende de alguns fatores, como a dose infectante de antígeno, o mecanismo de apresentação pela célula apresentadora de antígeno (APC), a via de inoculação e o padrão genético do hospedeiro. Algumas das citocinas produzidas pela resposta do tipo Th1 ou Th2 possuem caráter regulador, favorecendo ou inibindo a expansão celular (Murray *et al.*, 2005; Neves, 2011).

A resposta imune adaptativa é classificada em duas respostas: a resposta imune humoral e a celular. Na resposta imune humoral (Th2), os linfócitos T CD4+ dessa classe são produtores de citocinas (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13), que estimulam a diferenciação dos linfócitos B (para produzirem as imunoglobulinas IgA, IgG, IgM, IgE), que funcionam como moléculas efetoras. Na resposta imune celular, também denominada de resposta imune do tipo Th1, linfócitos T CD4+, produtores de citocinas como IFN- γ , interleucina-2 (IL-2) e fator de necrose tumoral (TNF) estimulam à atividade microbida de macrófagos e/ou a atividade citolítica de linfócitos T CD8 (linfócitos citotóxicos), resultando na destruição de microrganismos presentes em compartimentos intracelulares (Piscopo e Mallia Azzopardi, 2007; Abbas *et al.*, 2008).

Independente da espécie de *Leishmania*, após a picada do inseto e inoculação do parasita, os parasitas serão englobados inicialmente pelos macrófagos ou células dendríticas, onde o parasita irá se replicar. Enquanto estiver dentro do macrófago, o patógeno irá modular a sua ação microbida e

aumentar a fluidez da membrana celular, resultando em problemas na apresentação de antígeno dessas células (Kaye & Aebische, 2011).

A imunologia e patogenia da Leishmaniose são complexas e estão associadas a um grande número de fatores genéticos e celulares que implicam na resistência e susceptibilidade do hospedeiro. O controle da infecção acontece através do recrutamento de células da resposta Th1 e interleucinas (IL) IL-12, IL-18, IL-27 que ativam os macrófagos. Como o IFN- γ , a IL-12 também gera uma resposta efetiva aumentando a produção da resposta Th1. Por outro lado no baço, a resposta Th2 sustenta a persistência do parasita. Outro adjuvante desse tipo de resposta é o fator de necrose tumoral (TNF- α). (Nozzi *et al*, 2014).

A resposta imune da LC e LV estão associadas com uma interação das células T auxiliares (Th1/Th2) e suas principais citocinas que são o IFN- γ , e a IL-4 no caso das duas doenças, no caso somente da LV o fator envolvido é IL-10 (P. Bhattachary, N. Ali; 2013). A resistência do hospedeiro à Leishmaniose em geral está associada à ativação seletiva e diferenciação de células efectoras T-auxiliares CD4⁺ (Th1), as quais secretam um padrão de citocinas específicas (IL-2, INF- γ , IL-12 e TNF- α). Estas citocinas, conhecidas como citocinas pré-inflamatórias, favorecem a ativação de células fagocíticas capazes de destruir o parasita de *Leishmania* dentro dos fagolisossomos, através da produção de radicais livres de óxido nítrico e de oxigênio (Stanley e Enqwerda, 2007; Goto e Prianti, 2009; El-On, 2009; Kaye e Aebischer, 2011; Neves, 2011).

Por outro lado, a suscetibilidade à infecção está relacionada com a resposta de células CD4⁺ (Th2), que induzem a resposta humoral, produzindo as IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e TGF- β , responsáveis por atividades anti-inflamatórias, como: a inibição de macrófagos, pelo IL-4 produzido pelas células

TCD4+; a inibição da transcrição do TNF- α ; e a inibição da produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Stanley e Enqwerda, 2007; Goto e Prianti, 2009; Kaye e Aebischer, 2011; El-On, 2009; Neves, 2011).

O desenvolvimento da infecção da LV dependerá então da resposta desenvolvida pelo hospedeiro vertebrado, pois se ocorrer: o aumento da resposta do tipo Th2 em relação à do tipo Th1, a desativação de macrófagos por ação de citocinas e o aumento de IL-10 em sinergismo com o aumento da IL-4 mesmo em presença de níveis de IFN- γ , levam o hospedeiro ao fracasso no controle da infecção (Goto e Prianti, 2009; Kaye e Aebischer, 2011).

2.5 Diagnóstico da Leishmaniose Visceral

O diagnóstico da LV é de fundamental importância para o controle precoce das complicações da doença e diferentes técnicas podem ser utilizadas para esse diagnóstico nas formas humana e canina da doença. O diagnóstico desta doença é comumente realizado com base em conjunto de critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. O diagnóstico clínico, entretanto, é de extrema complexidade, visto que algumas doenças compartilham sintomatologia similar a outras patologias linfoproliferativas presentes nas áreas onde incide a LV, como por exemplo: Doença de Chagas e Esquistossomose. Muitos avanços têm sido gerados na área de diagnóstico da LV, porém, ao que se diz respeito aos testes disponíveis, nenhum apresenta 100% de sensibilidade e especificidade (Alves e Bevilacqua, 2004; Singh, 2006; Srivastava *et al.*, 2011).

Segundo a Organização Mundial de Saúde o diagnóstico para a LV se baseia em alguns pontos discutidos a seguir.

2.5.1 Método Clínico

Esse diagnóstico pode ser feito com base em várias indicações, como: febre baixa recorrente, envolvimento linfático, anemia, leucopenia, hepatoesplenomegalia e caquexia, combinados com o perfil epidemiológico, através da história de residência em uma área endêmica. (Assis; 2008)

2.5.2 Método Parasitológico

Devido à sua elevada especificidade, a Microscopia é considerada o padrão ouro para o diagnóstico das Leishmanioses, pois consiste da avaliação direta do parasita (Herwaldt, 1992). A visualização deste pode ser feita em material de biópsia ou punção aspirativa do baço, fígado, medula óssea ou linfonodos, sendo preferência da maioria dos autores a aspiração da medula óssea que em adultos ocorre através da punção esternal e em crianças da punção da crista ilíaca. Uma desvantagem do método é que o aspirado de medula óssea ou de baço é uma técnica arriscada e dolorosa (Sundar et al. 2002).

No caso do cão os procedimentos são os mesmos que indicados aos humanos (aspirados do baço, linfonodos e medula), entretanto são impraticáveis em programas de Saúde Pública (Sundar; Rai, 2002).

O parasita *Leishmania* pode ser encontrado no interior de células fagocitárias (macrófagos) fixas ou livres, sendo reconhecidas por sua morfologia de amastigotas. A técnica de aspirado não é recomendada para estudos de campo, devido à complexidade do procedimento e probabilidade de morte em casos de aspirado de baço (Srividya et al, 2012).

2.5.3 Métodos Moleculares

Várias técnicas utilizando a biologia molecular foram desenvolvidas para a detecção e identificação dos parasitas do gênero *Leishmania*. A principal técnica é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction*) é a mais confiável para determinar a presença e a identificação do parasito não apenas nos casos agudos da doença, mas também para monitorar a cura parasitológica após o tratamento (Maia *et al.* 2006; Ferreira *et al.* 2008).

Esta técnica tem sido descrita como apresentando alta sensibilidade e especificidade para a detecção do parasita, independente da imunocompetência ou da história clínica do paciente. Entretanto os seus resultados dependem de algumas variáveis: área endêmica, tipo de amostra e o método de extração do DNA (Singh, 2006; Srivastava *et al.*, 2011). A PCR dependerá de alguns diferentes fatores para sua eficácia como: os iniciadores, a quantidade de cópias do gene alvo, o método de extração do DNA, o material biológico e o protocolo da PCR (Alvar *et al.* 2004; Cortes *et al.* 2004; Baneth e Aroch 2008).

2.5.4 Métodos Sorológicos e Imunológicos

A LV é caracterizada por uma hipergamaglobulinemia e grande produção de anticorpos, o que facilita o uso de técnicas imunológicas para detecção desses anticorpos (anti-*Leishmania*), evitando os invasivos testes parasitológicos. Entre estas se destacam as reações de: ELISA (ensaio imunoenzimático), RIFI (imunofluorescência indireta), DAT (teste de aglutinação direta), *Imunoblotting* (*Western-Blot*) e teste rápido (Srivastava *et al.*, 2011).

O teste de ELISA é uma metodologia moderna que permite a realização de grande número de exames em curto espaço de tempo, sendo o mais utilizado para imunodiagnóstico de LV. Esse teste tem alta sensibilidade e permite a detecção de baixos títulos de anticorpos, mas é pouco preciso na detecção de casos subclínicos ou assintomáticos, pois o desempenho do teste de ELISA no diagnóstico da LV e principalmente a canina está relacionado não só com o tipo de antígeno utilizado, mas também com o estado clínico do cão em teste (Rosário *et al.*, 2005)

A RIFI apresenta sensibilidade considerável, porém com baixa especificidade onde observam-se reações cruzadas em títulos baixos com outras doenças como a Doença de Chagas, Malária e Esquistossomose. Entretanto, sua aplicação requer alto nível de habilidade, experiência e também equipamento especializado e de alto custo. Além disso, as diluições seriadas do soro tornam o teste laborioso para triagem com grande número de amostras, além de ser uma reação não adaptada para estudos epidemiológicos em larga escala (Gradoni, 2002; Gontijo; Melo, 2004).

O DAT é baseado na detecção da aglutinação direta de promastigotas de *Leishmania* que reage com anticorpos anti-*Leishmania* no soro, resultando na aglutinação das formas promastigotas, sendo uma técnica de fácil execução. Entretanto apresenta dificuldades na padronização e controle de qualidade do antígeno. (Gontijo; Melo, 2004). Uma das limitações do DAT é o longo tempo de incubação necessário (18 horas) e as várias diluições que devem ser feitas para o soro ou plasma, as quais deixam o teste laborioso e não adequado para a triagem de um grande número de amostras (Harith *et. al* 1989).

Tanto os testes moleculares como os testes sorológicos apresentam resultados variáveis de sensibilidade e especificidade, porém todos exigem equipamentos que não são apropriados para o uso em campo (Cañavate *et al.*, 2011). Uma alternativa é o teste rápido imunocromatográfico, que é feito com base em imunocromatografia de membrana de nitrocelulose, onde se utiliza o antígeno recombinante (rK39), fixado no papel. O antígeno recombinante rK39 é um peptídeo 39 amino-ácidos de *L. infantum* que foi identificado como muito atraente para o diagnóstico da LV (Paul, 2014).

O teste rápido baseado no rK39 apresentou 100% de sensibilidade e 98% de especificidade em testes de reconhecimento da LV humana. Com isso, este teste passou a ser visto como um instrumento promissor em programas de controle da LV, pois requer pequena quantidade de sangue periférico e é de rápida execução e leitura (entre 10 e 20 minutos), podendo ser utilizado em condições de campo (Chappuis *et al.*, 2007; Boelaert *et al.* 2008; Gomes *et al.*, 2008).

Entretanto, foram levantadas discrepâncias entre trabalhos que utilizaram a rK39 em diferentes países do mundo, por exemplo, no continente africano, e mostraram resultados marcadamente diferentes, tendo uma sensibilidade alta em humano, mas uma sensibilidade baixa em cães. Estes dados sugerem que a sensibilidade de um antígeno pode variar em relação à região em que ele está sendo utilizado (Romero, 2010 e Srivastava *et al.*, 2013). Mesmo no Brasil, o desempenho diagnóstico do k39 foi considerado razoável para confirmação da infecção em casos suspeitos de LV canina, e a sensibilidade para detectar cães infectados foi muito baixa para estudos epidemiológicos de grande escala e programas de controle operacional (Quinnel *et al.*, 2013).

Recentemente no Brasil, foi utilizado outro teste rápido imunocromatográfico baseado no antígeno recombinante rK28 que é um gene sintético gerado a partir da fusão de várias sequências repetidas do *L. danovani* haspb1 e rK39 e ELISA como método confirmatório. O teste foi realizado com soro de cães infectados com a doença de três Estados (Bahia, Rio Grande do Norte e Minas Gerais). O teste apresentou 98% de sensibilidade em cães sintomáticos e apresentou baixos níveis de sensibilidade (47%) em cães assintomáticos (Fraga *et al*, 2014)

Outros antígenos considerados candidatos para o diagnóstico da LV são o recombinante A2 e os antígenos, recombinantes ou purificados, derivados das glicoproteínas de membranas gp63, gp70, gp72, todas específicas do gênero *Leishmania* (Carvalho *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2008). Já os antígenos recombinantes ou purificados gp63, gp72, gp70, melhoram a sensibilidade e a especificidade dos ELISAs, entretanto, reações cruzadas com enfermidades causadas por outros tripanossomatídeos podem ainda ocorrer (Alves e Bevilacqua, 2004; Dourado *et al.*, 2007). A Tabela 1 resumidamente mostra os testes sorológicos mais comumente utilizados para o diagnóstico da LV bem como suas vantagens e desvantagens.

Tabela 1. Técnicas mais comumente utilizadas para diagnóstico de Leishmaniose Visceral

Adaptada de (Elmahallawy *et al.*, 2014)

Métodos	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Vantagens	Desvantagens
RIFI	87-100	77-100	Positivo no início do estágio de infecção e indetectável de seis a nove meses até a cura	Requer um laboratório sofisticado. Sem aplicação em campo
ELISA	Alta	Alta	Pode ser usada para rastreio de larga escala em estudos epidemiológicos	Sensibilidade e especificidade são muito influenciadas pelo antígeno usado.
Western-Blot	90-98	98-100	Fornecer resposta detalhada de anticorpos para vários antígenos de <i>Leishmania</i> .	Demorado, tecnicamente pesado e expansivo.
DAT	85-100	91-100	Teste rápido e aplicado em campo	Precisa de um longo tempo de incubação. Indisponibilidade do antígeno comercial positivo.
rK39	90-100	93-100	Barato, rápido, simples e pode ser realizado por pessoal destreinado.	Apresenta resultados diferentes em diferentes regiões

2.6 Controle da Leishmaniose Visceral

Na maioria dos casos, o tratamento de primeira linha contra a LV são os antimoniais pentavalentes. Nos últimos anos, outros medicamentos têm sido extensivamente estudados e tornaram-se de grande valor, como a anfotericina B lipossomal, a droga leishmanicida mais potente disponível comercialmente, que atua nas formas promastigotas e amastigotas do parasita, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Ministério da Saúde, 2014). Mesmo assim, o número de casos de LV está

aumentando em todo o mundo, e os problemas duradouros com ferramentas de quimioterapia atuais ainda são uma questão crítica. Além disso, em muitos países em desenvolvimento, o custo do tratamento é o maior desafio enfrentado pelas autoridades de saúde (Bruno *et al*, 2014).

A via intravenosa e intramuscular de administração de medicamentos e o tratamento em longo prazo reforça a necessidade de uma droga segura e de administração oral. Recentemente, novas formulações da anfotericina B (anfotericina-B-lipossomal e anfotericina-B-dispersão coloidal) tornaram-se disponíveis comercialmente como também uma droga oral (miltefosina) vem sendo utilizada na Índia, com resultados promissores no tratamento do calazar indiano (Croft e Oliarro, 2011). Várias formulações de lipossomas desta droga também estão disponíveis no mercado, tais como AmBisome que já foi registrado no Brasil, Índia e Egito (Sundar *et al*. 2011).

AmBisome (anfotericina B lipossomal) é uma droga relativamente segura, mas seu alto custo é uma grande limitação para o tratamento geral. No entanto, a OMS tem fornecido o medicamento a preço mais baixo, especialmente para os países em desenvolvimento, embora ele ainda seja caro e fora do alcance de pessoas pobres (Mondal *et al*. 2010). No entanto, é uma droga teratogênica e não pode ser utilizado em mulheres em idade fértil (Dorlo *et al*; 2012). Diversas outras drogas anti-*Leishmania* tais como sitamaquina, pentamidina e paromomicina estão em diferentes etapas de ensaios clínicos (Mondal *et al* . 2010).

O tratamento para os cães traz riscos para a Saúde Pública por contribuir com a disseminação da doença e não é recomendado. Os cães não são curados e continuam como reservatórios do parasito e o uso rotineiro de drogas em cães não previne a ocorrência de recidivas, tem efeito limitado na infectividade de

flebotomíneos e levam ao risco de selecionar parasitos resistentes às drogas utilizadas para o tratamento humano (Ministério da Saúde, 2014). A recomendação para cães infectados com a *L. infantum* é a eutanásia, que deve ser realizada de forma integrada com as demais ações recomendadas pelo Ministério da Saúde (MS). Vale ressaltar que essa medida é indicada como forma de controle por meio de inquéritos censitários apenas para municípios com transmissão moderada e intensa (Ikeda-Garcia, *et al.* 2007; Miró *et al.*, 2008; Ministério Da Saúde, 2014).

2.7 Vacina contra a Leishmaniose Visceral

Atualmente, tem havido numerosas tentativas de desenvolver uma vacina eficaz contra diferentes formas de Leishmaniose e há várias categorias de vacinas candidatas. Em geral, as vacinas em desenvolvimento podem ser divididas em várias categorias: vacinas de primeira geração que consistem em *Leishmania* viva (Leishmanização); as vacinas de segunda geração, incluindo proteínas recombinantes e vacinas de DNA e as suas combinações; e as vacinas vivas atenuadas de *Leishmania* (Mutiso *et al*, 2013).

A história da vacina contra a leishmaniose é muito antiga e a mesma tem sido tradicionalmente usada no Oriente Médio desde os tempos antigos. O processo de vacinação com o parasita *Leishmania* vivo, denominado Leishmanização, tem sido praticado há séculos no Oriente Médio e da Ásia Central contra a Leishmaniose Tegumentar. (Nadim *et al.*, 1983). As preocupações de segurança associadas às vacinas de parasitas vivos, posteriormente, obrigou os pesquisadores a mudar seu foco em direção a

alternativas mais seguras de usar parasitas mortos, chamados vacinas de primeira geração. O ano de 1940 foi o do início de ensaios realizados com vacinas, principalmente na América do Sul para a LC. Antes disso, a estratégia utilizando parasita morto havia sido proposta para fins terapêuticos contra a LC (Alvar *et al.* 2013).

A utilização deste tipo de vacina viva, no entanto, foi descartada, devido aos perigos de se utilizar microrganismos vivos no processo de vacinação. Isso aconteceu basicamente devido aos problemas de padronização do método, em relação às culturas em larga escala e ao fato de que os parasitas estavam perdendo a sua virulência à medida que iam sendo repicados. A infecção pela *Leishmania* também estava causando imunossupressão, que resultou em baixa resposta imunológica quando administrada em crianças (Modabber, 2010).

O desenvolvimento de vacinas de segunda geração para a Leishmaniose levou à utilização de técnicas inovadoras como proteínas recombinantes, quimeras (conjunto de proteínas fusionadas), vacinas de DNA, lipossomos e sistemas de imunização com células dendríticas. Nesses métodos, várias proteínas foram testadas em vários modelos animais (rato, hamster e cão) e os resultados foram diversificados, com diferentes níveis de proteção. Em relação a esses modelos animais, a utilização do cão é importante, já que uma vacina totalmente eficaz para esse hospedeiro, que é o principal reservatório do parasita, levaria a um melhor controle de áreas endêmicas (Evans e Kedzierski, 2012).

Diferentes proteínas recombinantes foram testadas como vacinas em modelos murinos. Como por exemplo, a proteína A2, que é específica da forma amastigota de *L. donovani*, e foi capaz de induzir proteção contra o parasita (Ghosh *et al.*, 2001; Ghosh *et al.*, 2001). Outra proteína da forma amastigota,

LCR1, também foi testada e apresentou proteção parcial (Streit *et al*, 2000). Como alternativa para o uso de uma única proteína recombinante, foram realizados testes com quimeras, produzidas a partir da fusão de um conjunto de proteínas antigênicas individuais. A Leish-111f, uma proteína composta por três moléculas (TSA e LmSTI1 provenientes de *L. major* e LeIF de *L. braziliensis*) repetidas em *tandem* e administradas com adjuvante MPL-SE, demonstrou proteção em cães contra a LV (Coler *et al*, 2007, Trigo *et al*, 2010).

Nos testes com vacina de DNA, o antígeno mais estudado é o LACK (homóloga de *Leishmania* de receptores de proteína quinase C ativada) é uma proteína de 36 kDa altamente conservada entre as diferentes espécies e formas evolutivas de *Leishmania*, e induz proteção contra infecção cutânea por *L. major* por intermédio do redirecionamento da resposta patogênica (Th2) para a protetora (Th1). Quando administrado sem adjuvantes, o mesmo não gerou proteção em modelos murinos (Marques-da-Silva *et al*, 2005; Melby *et al*, 2001). Entretanto, quando administrado com adjuvantes, o antígeno demonstrou proteção nos mesmos modelos experimentais (Gomes *et al*, 2007) e em cão (Ramiro *et al*, 2003; Ramos *et al*, 2008). O método de inoculação de antígenos por células dendríticas, em modelo murino como vacina terapêutica, gerou proteção quando foi realizado carregado com extrato solúvel de *L. donovani* e alta expressão de IL-12 (Ahuja *et al*, 1999). O sistema de inoculação de antígenos por lipossomos gerou apenas resultados com proteção parcial em modelo murino, mas se tornou uma nova alternativa para testes vacinais futuros (Henriquez *et al*, 2010).

2.7.1 Vacina contra Leishmaniose Visceral Canina

Há mais de 30 anos, pesquisadores vêm tentando desenvolver uma vacina contra a LV canina. Porém, para que sua utilização seja recomendada pelo Ministério da Agricultura e da Saúde, a vacina tem que prevenir a infecção canina ou a transmissão do parasito do cão para o inseto vetor, para redução da incidência da doença humana (Evans e Kedzierski, 2012). As vacinas que foram produzidas para serem utilizadas para prevenção da LV canina no Brasil são: a vacina de Ligante Fucose-Manose [(Fucose Mannose Ligand-FML)/saponina], comercialmente conhecida como LEISHMUNE® (Borja-Cabrera *et al.*, 2002), porém o Ministério da Saúde suspendeu a utilização desta vacina por não atender aos estudos de Fase III (estudos em grande escala). Outra vacina é a com base em proteína A2/saponina, comercialmente conhecida como Leish-Tec® (Fernandes *et al.*, 2008), apesar desta última encontrarem-se disponíveis no mercado, o Ministério da Saúde não recomenda sua utilização (SVS/MS, 2006).

Testes utilizando modelo canino ainda não evidenciaram a eficácia destas vacinas em bloquear a transmissão do parasito (Borja-Cabrera *et al.*, 2010; De Amorim *et al.*, 2010). Além do mais, recomenda-se a realização de estudos de fase III antes da liberação dessas vacinas como forma de controle da LV canina no Brasil (SVS/MS, 2013).

2.8 Estudos prévios do que originaram este trabalho

Em estudos realizados anteriormente, numa colaboração entre as unidades da FIOCRUZ de Pernambuco (Departamento de Microbiologia, Centro de

Pesquisas Aggeu Magalhães) e Bahia (Laboratório de Patologia e Biointervenção, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz) buscou-se identificar novos polipeptídeos de *L. infantum* com potencial para uso no diagnóstico sorológico da LV. Novos antígenos foram então identificados através do rastreamento de bibliotecas de expressão de *L. infantum* (genômica e de cDNA) com soros de animais e pacientes humanos acometidos por esta doença. Como resultado deste rastreamento, e após análise por homologia das sequências dos clones obtidos com sequências de bancos de dados genômicos de *L. infantum* e *L. major*, foram identificados clones codificando treze proteínas distintas (Magalhães, 2008). Proteínas recombinantes derivadas de vários destes clones foram avaliadas quanto ao seu potencial no diagnóstico da leishmaniose visceral por meio de ensaios de ELISA com soros de animais e humanos portadores de LV. Um resultado importante derivado destas análises é que os antígenos mais eficientes na detecção da LV humana não eram os melhores para a LV canina e vice-versa, ressaltando a importância de se avaliar em separado os dois sistemas, humano e canino, na hora de se otimizar os testes de detecção da LV (Magalhães, 2007; Oliveira *et al.*, 2011; Nascimento, 2009).

Utilizando-se duas proteínas recombinantes (Lci1A e Lci2B) como teste rápido imunocromatográfico para o diagnóstico de cães infectados com *L. infantum*, foi possível verificar que esses dois antígenos em parceria com a rK28 aumentaram a sensibilidade de 88% para 93,5%, mostrando que a combinação de antígenos é uma ótima alternativa no diagnóstico da LV (Fraga *et al.*, 2014). Misturas de duas ou mais proteínas recombinantes também foram avaliadas por ELISA com soros de cães gerando resultados promissores, sendo observado um aumento da sensibilidade dos testes (Nascimento, 2009). Contudo a produção de

um sistema de diagnóstico com duas, três ou mais proteínas recombinantes, aumenta os custos e dificulta a padronização.

Recentemente, em um estudo precursor, foi possível construir, expressar, purificar e avaliar proteínas quiméricas geradas a partir de combinações antigênicas de três das melhores proteínas originalmente identificadas. Três quimeras foram geradas pela combinação de fragmentos das mesmas três proteínas antigênicas e que variam quanto ao posicionamento de cada fragmento ao longo da sequência proteica. Observou-se que uma das combinações aumentou o reconhecimento do anticorpo apresentado a proteína recombinante em aproximadamente cinco vezes (diluição seriada dos soros positivos), demonstrando alta sensibilidade (Tavares, 2012). Este resultado indica que a construção de proteínas quiméricas é uma alternativa possível e viável para o aperfeiçoamento de testes de diagnóstico sorológico da LV humana e canina.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar as condições para a expressão em *Escherichia coli* de genes quiméricos sintetizados quimicamente e codificando para proteína compostas por regiões selecionadas de antígenos previamente identificados de *L. infantum*. Definir a composição antigênica e as melhores condições para se alcançar uma superexpressão eficiente e compatível com uma maior antigenicidade das proteínas quiméricas resultantes.

3.2 Objetivos Específicos

1. Sintetizar e subclonar em vetor de expressão procariótico genes quiméricos codificando para proteínas contendo regiões antigênicas de múltiplas proteínas nativas de *Leishmania infantum*;
2. Ampliar a diversidade dos genes quiméricos a partir de reações de subclonagem visando a retirada de segmentos selecionados dos genes originalmente sintetizados;
3. Avaliar o reconhecimento das proteínas quiméricas por soro dirigido contra diferentes componentes antigênicos incluídos na sua composição;
4. Comparar o efeito de diferentes combinações das regiões antigênicas e outras sequências sintéticas na eficiência da expressão das diferentes proteínas quiméricas em *Escherichia coli*.

4. MATERIAL E METODOS

4.1 Construção dos genes quiméricos e otimização da sua expressão

Sequências otimizadas correspondentes a quatro genes quiméricos contendo diferentes combinações de fragmentos derivados de proteínas antigênicas de *Leishmania infantum* foram desenhadas em etapa que precedeu este trabalho. Foram selecionados quatro dos melhores genes que apresentaram resultados promissores no diagnóstico da LV e da LV canina, estes genes foram submetidos a ensaios através do programa de Bioinformática (BCPred12) que é um novo método para prever epitopos de células B lineares (EL-Manzalawy *et al*, 2008).

Estes genes foram unidos e otimizados pelo programa GENDESIGN e primeiro momento estas sequências foram enviadas para a síntese comercial, encomendada a empresa GENSCRIPT, sintetizadas e disponibilizadas já clonadas no vetor comercial pUC57 simples (Figura 11).

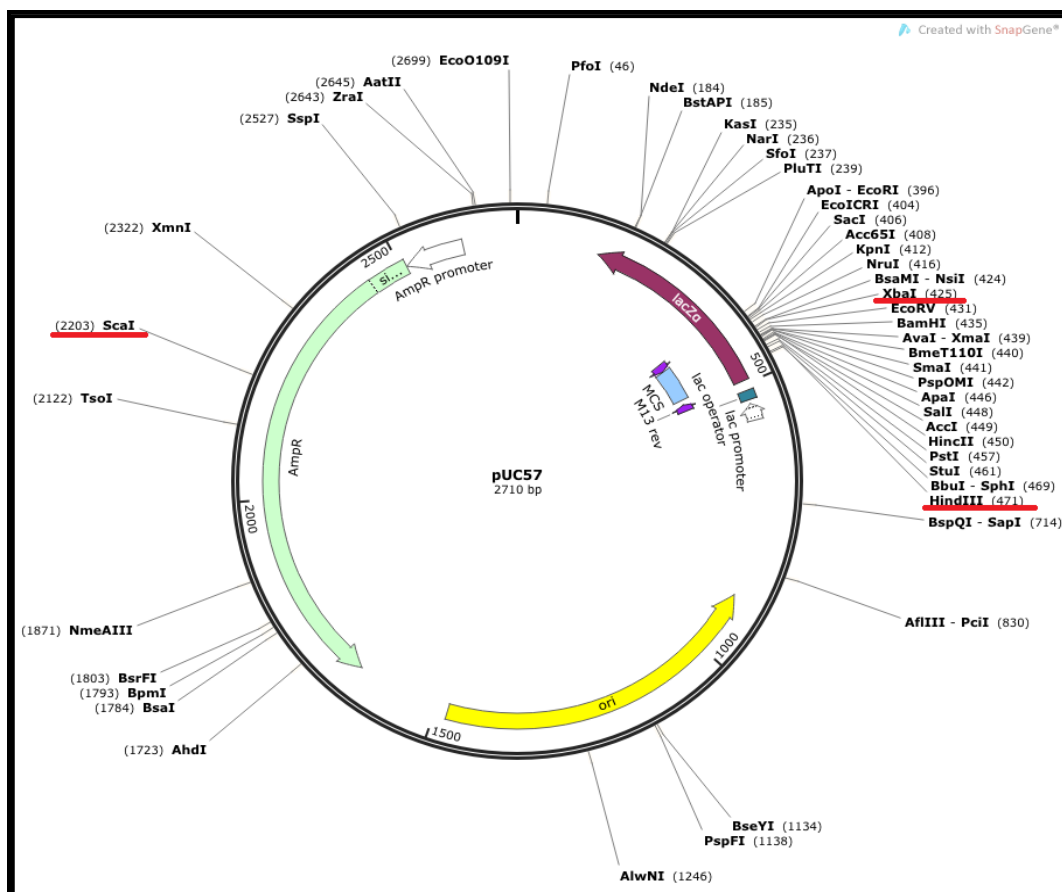


Figura 11. Mapa do pUC57 simples. Mostrando os sítios das enzimas *XbaI*, *HindIII* e *ScaI* (marcado de vermelho). Os genes sintéticos foram inseridos entre os sítios de *XbaI*/*HindIII*. Fonte: http://www.genscript.com/vector/SD1176-pUC57_plasmid_DNA.html

4.2 Digestão com enzimas de restrição

Após a síntese comercial dos genes sintéticos (Q1, Q2, Q3 e Q4), conforme as estratégias traçadas, eles foram digeridos por digestão dupla com as enzimas de restrição *XbaI* /*HindIII*, a fim de retirá-los do plasmídio de clonagem pUC57 e posteriormente subcloná-los no vetor de expressão pRSETa. Além da digestão por esse par de enzimas, também foi necessário o uso da enzima *ScaI* (indicada na Figura 11) a qual digere o plasmídio ao meio e dessa forma separar

os fragmentos correspondente aos genes sintéticos do fragmento correspondente ao plasmídeo. Na ausência da digestão com *ScaI*, apenas com o par de enzimas *XbaI/HindIII*, o tamanho dos fragmentos dos genes sintéticos seria muito semelhante ao do plasmídeo pUC57 linearizado, o que inviabilizaria a separação dos dois durante a etapa de subclonagem. Para correta utilização das enzimas foram seguidas todas as instruções do fabricante (New England Biolabs-inc.).

4.3 Purificação dos Insertos e dos Vetores Plasmidiais

Após as digestões, os insertos foram purificados e separados do vetor pUC57 através de corrida eletroforética em gel de agarose 1% corado com *SYBR safe DNA* (Invitrogen), sendo a análise da digestão feita por comparação entre o tamanho das bandas geradas pela digestão e o tamanho dos fragmentos esperados pelo mapeamento do sequenciamento. A documentação desta etapa foi feita através da fotografia do gel de agarose sob iluminação ultravioleta. Após a confirmação do sucesso das digestões, as bandas desejadas foram separadas das demais com a continuação da eletroforese por um tempo maior e com o auxílio de um bisturi, as bandas dos insertos foram excisadas do gel de agarose. Foi realizada a purificação dos fragmentos através do sistema de extração de DNA em gel de agarose *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* seguindo o protocolo do fabricante (GE Healthcare).

4.4 Ligação dos Fragmentos nos Plasmídios Vetores, Transformação, Minipreparação e Confirmação da Subclonagem

Os insertos obtidos foram ligados ao plasmídio de expressão (pRSETa) e fragmento purificado com a enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs-inc.) a 16 °C por 18 horas. As construções foram então utilizadas para transformar bactérias *Escherichia coli* (DH10β) competentes através de choque térmico (30 minutos imersas em gelo e 5 minutos em banho-maria à 37 °C) em solução tamponada de cloreto de magnésio. Em seguida, estas células, foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina na concentração de 100 µg/mL, crescendo durante 16 horas em estufa a 37 °C.

Após análise das placas, colônias de cada gene quimérico foram escolhidas aleatoriamente, isoladas e inoculadas em tubos contendo 3 mL de meio LB líquido com ampicilina (100 µg/mL). Os inóculos foram então colocados sob agitação constante em temperatura de 37°C por aproximadamente 16 horas. Após o crescimento, foram retiradas alíquotas de 1,5 mL dos inóculos, para obtenção de um sedimento através de centrifugação à 12.000 xg por 3 minutos. A partir do sedimento foi realizado o protocolo da extração de DNA plasmidial (minipreparação), utilizando-se sistema comercial (GenElute™ Plasmid Miniprep Kit da SIGMA), e a análise dos plasmídeos obtidos realizada em gel de agarose a 1%.

A enzima de modificação *Antarctic Phosphatase* (New England Biolabs), possui a função de desfosforilar a extremidade 5' do DNA e sua utilização foi necessária para minimizar os eventos de religação de DNA plasmidial nas etapas de subclonagem, eventos estes induzidos pela presença de fragmentos

resultantes de apenas uma das duas enzimas, *XbaI/HindIII*, utilizadas nas reações de subclonagem. Para fins de utilização dessa enzima foi seguido às instruções do fabricante. A escolha desta enzima (*Antarctic Phosphatase*) de modificação em relação a fosfatase alcalina tradicional (*Calf Intestinal Phosphatase* - CIP) se deu pelo fato da primeira possuir temperatura de inativação, facilitando assim seu uso e possibilitando um maior controle da reação.

4.4.1 Estratégias de Truncagens dos Genes Quiméricos

Após a primeira subclonagem dos genes quiméricos completos no vetor de expressão pRSETa foram realizadas diferentes reações de truncagens desses genes de forma a gerar diferentes construções variando quanto a presença ou não de fragmentos antigênicos selecionados. A primeira digestão, feita com as quatro construções, foi com a enzima *NcoI* (que excisa o fragmento pSS-gIII), retirando o *tag* de otimização da expressão. A segunda digestão, também feita nas quatro construções, foi com o par de enzimas *SalI/XhoI* excisando o fragmento C-terminal nas Q1 e Q2 reduzindo 1155 pb da sequência. Na Q3 esse par de enzimas também excisa seu fragmento C-terminal, no caso de 843 pb da sequência. Já na Q4 o mesmo par de enzimas excisa um fragmento ainda maior, de 1435 pb.

As quimeras Q3 e Q4 ainda propiciam outras digestões em sítios específicos. A Q3 digerida com a enzima *MfeI* excisa um fragmento interno de 103 pb e quando digerida com o par de enzimas *MfeI/EcoRI* excisa um fragmento interno ainda maior, reduzindo o gene em 695 pb. Já na Q4, esse par de enzimas

excisa o mesmo fragmento interno de 103 pb, enquanto que a digestão com *Sall* retira um segundo fragmento interno, reduzindo o gene em 592 pb.

Após todas as trucagens feitas, os fragmentos resultantes foram religados e transformados novamente em células competentes de *E. coli* da linhagem Top10 para a subsequente realização de minipreparação de DNA em pequena escala (SIGMA).

4.4.2 Confirmação da Subclonagem e da Construção das Quimeras.

A confirmação das subclonagens foi feita através do sequenciamento das minipreparações e por digestões com a dupla de enzima *XbaI/HindIII*. Depois de confirmada a subclonagem, algumas minipreparações foram selecionadas e transformadas novamente em células competentes de *E. coli* da linhagem DH10 β para realização de maxipreparação, extração de DNA em larga escala (Sambrook e Russel, 2001).

4.5 Expressão das proteínas quiméricas

Para a expressão das diferentes proteínas quiméricas, as construções plasmidiais geradas foram utilizadas para transformar células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) *plysS* e induzidas na presença de isopropil-Beta-D-galactosídeo (IPTG). A partir das células transformadas, foram feitos pré-inóculos em 20 ml de LB (Luria Bertani) na presença de ampicilina (100 μ g/ml), a 37°C e 160 rpm. Dessa cultura, 15 ml foram inoculados em 500 ml de meio LB com ampicilina (100 μ g/ml), até ser atingida uma densidade óptica (D.O) de 0,5 a 0,8 á um

comprimento de onda de 600 nm, onde foi acrescentado IPTG para uma concentração final de 0,1 mM. Após 3 horas de agitação a 28°C e 180 rpm, retirou-se uma alíquota, que foi fracionada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%). O resultado foi visualizado através da coloração do gel com Comassie Blue R-250.

Diferentes condições de expressão foram avaliadas como tempo de crescimento, concentração de IPTG adicionado e fase da cultura (densidade óptica) quando se induz a expressão das proteínas recombinantes.

4.6 Purificação das Proteínas Quiméricas

Para a obtenção das proteínas recombinantes, os sedimentos celulares obtidos após a indução com IPTG foram resuspensores em 20 mL de tampão de lise e equilíbrio (100 mM fosfato de sódio, 10 mM Tris, 8 M de Uréia, 20 mM de imidazol – pH 8,0) e solubilizados por ultra-sonicação, em 4 pulsos de 30 segundos com intervalos de 1 minuto, a 4°C. O material em seguida foi centrifugado a 12.000 g por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante resultante da centrifugação foi incubado por 1 hora com 500 µL de resina Ni-NTA agarose (Qiagen) e 2,5 mM de imidazol, a 4°C, sob leve agitação. Após a incubação com a resina, o material foi centrifugado a 6.000 g por 2 minutos, o sobrenadante descartado, e a resina lavada três vezes com 1 ml de tampão de equilíbrio (como descrito acima) através de etapas de suspensão e centrifugação. Mais duas lavagens foram realizadas com tampão desnaturante em pH 6,0 (100 mM fosfato de sódio, 10 mM Tris, 8 M de Uréia, 30 mM de imidazol), seguida da eluição das proteínas recombinantes realizada por meio de lavagens sucessivas com o

tampão de eluição (100 mM fosfato de sódio, 10 mM Tris, 8 M de Uréia, 1 M de imidazol – pH 4,5). Todos os sobrenadantes desta etapa foram separados e guardados a -80°C . Em seguida foram separados 10 μl de cada eluato e da resina, acrescidos de igual volume de tampão de amostra para SDS-PAGE duas vezes concentrado com 2-mercaptoetanol (50 $\mu\text{l}/\text{mL}$), fracionados em gel SDS-PAGE 15% e visualizados após coloração com Azul de Comassie R-250.

4.7 Ensaios de *Western Blot*

Para verificação do reconhecimento antigênico e confirmação das purificações foram realizados ensaios de *Western-blot* (Wb) com diversas diluições das proteínas quiméricas purificadas incubadas com soros de coelhos (gerados em trabalhos anteriores) produzidos através da imunização com as proteínas recombinantes individuais. Para isso, as proteínas quiméricas diluídas foram fracionadas em gel SDS-PAGE 15% e transferidas para membranas de PVDF (Immobilon-P Millipore®), as quais sofreram bloqueio em solução de leite a 5% em TBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH7,5) suplementadas com Tween-20 a 1% por 1 hora. Posteriormente, foram incubadas com os anticorpos em diluições finais de 1:3000 e 1:1000 para as proteínas completas e suas frações, em solução de leite a 5% em TBS / Tween-20 a 1% por 1h. As membranas foram lavadas três vezes com TBS/ Tween-20 a 1% por 10 minutos cada. Realizou-se nova incubação, durante 1 hora, com o segundo anticorpo (anti IgG de coelho, Jackson Immunoresearch Laboratories), marcado com peroxidase, numa diluição fixa de 1:10000 em solução de leite a 5% suplementado com TBS / Tween-20 a 1%. Em seguida, foram novamente lavadas três vezes com TBS / Tween-20 a 1% por 10

minutos. Após essas lavagens, as membranas foram banhadas numa solução de luminol 1,2 mM, iodofenol 0,4 mM e peróxido de hidrogênio 0,03% por 2 minutos, para realização da reação de quimioluminescência. Estas membranas foram, em seguida secas e, posteriormente, expostas a um filme de auto-radiografia durante 1 e 5 minutos. O filme foi revelado com uma solução de Dektol (1:2) por 1 minuto e lavado em solução de ácido acético diluído e fixado por 3 minutos.

5. RESULTADOS

Como etapa preliminar a realização deste trabalho, foram pré-selecionadas regiões de quatro proteínas de *Leishmania infantum* que apresentaram o melhor desempenho frente a soros de cães e humanos no diagnóstico da Leishmaniose Visceral. Nesta dissertação essas proteínas foram denominadas de: Ag1; Ag2; Ag3 e Ag4. Para as construções das proteínas quiméricas e a seleção das regiões antigênicas foi baseada em critérios de tamanho, solubilidade e potencial imunogênico. As respectivas sequências codificadoras foram então otimizadas para expressão em *Escherichia coli* e unidas em sequência, levando em consideração os seguintes parâmetros: fase de leitura, frequência de códon, estrutura secundária do mRNA, distribuição do conteúdo de GC e sítios de restrição. Pequenos espaçadores foram incluídos entre as regiões antigênicas nas proteínas quiméricas visando facilitar as condições de dobramento das proteínas recombinantes resultantes.

Foram, também, incluídas sequências otimizadas na extremidade 5' dos genes sintéticos bem como na região codificando as extremidades das proteínas, tais como: pRBS-SD1+6AA - sítio de ligação do ribossomo e sequência Shine-Dalgarno; pSS-gIII - Sequência N-terminal para otimizar expressão, proteína de envelope de fago; peptídeo T7 tag - sequência N-terminal para estabilizar e otimizar expressão; ET-6His – sequência de poli-histidinas (seis) introduzida na extremidade C-terminal para permitir a purificação das proteínas; e códon de terminação da tradução. Os genes citados acima deram origem a quatro construções quiméricas (Q1, Q2, Q3 e Q4), as quais diferem na ordem em que os fragmentos de proteínas antigênicas foram inseridos na construção, todas flanqueadas pelos sítios *XbaI*/*HindIII* para clonagem no vetor plasmidial.

Aos genes sintéticos, acrescentaram-se ainda sítios de enzimas de restrição em pontos estratégicos ao longo das construções, de forma a permitir uma fácil modificação destes genes, incluindo ou excluindo algumas sequencias e possibilitando uma maior manipulação da sua estrutura (Figura 12).

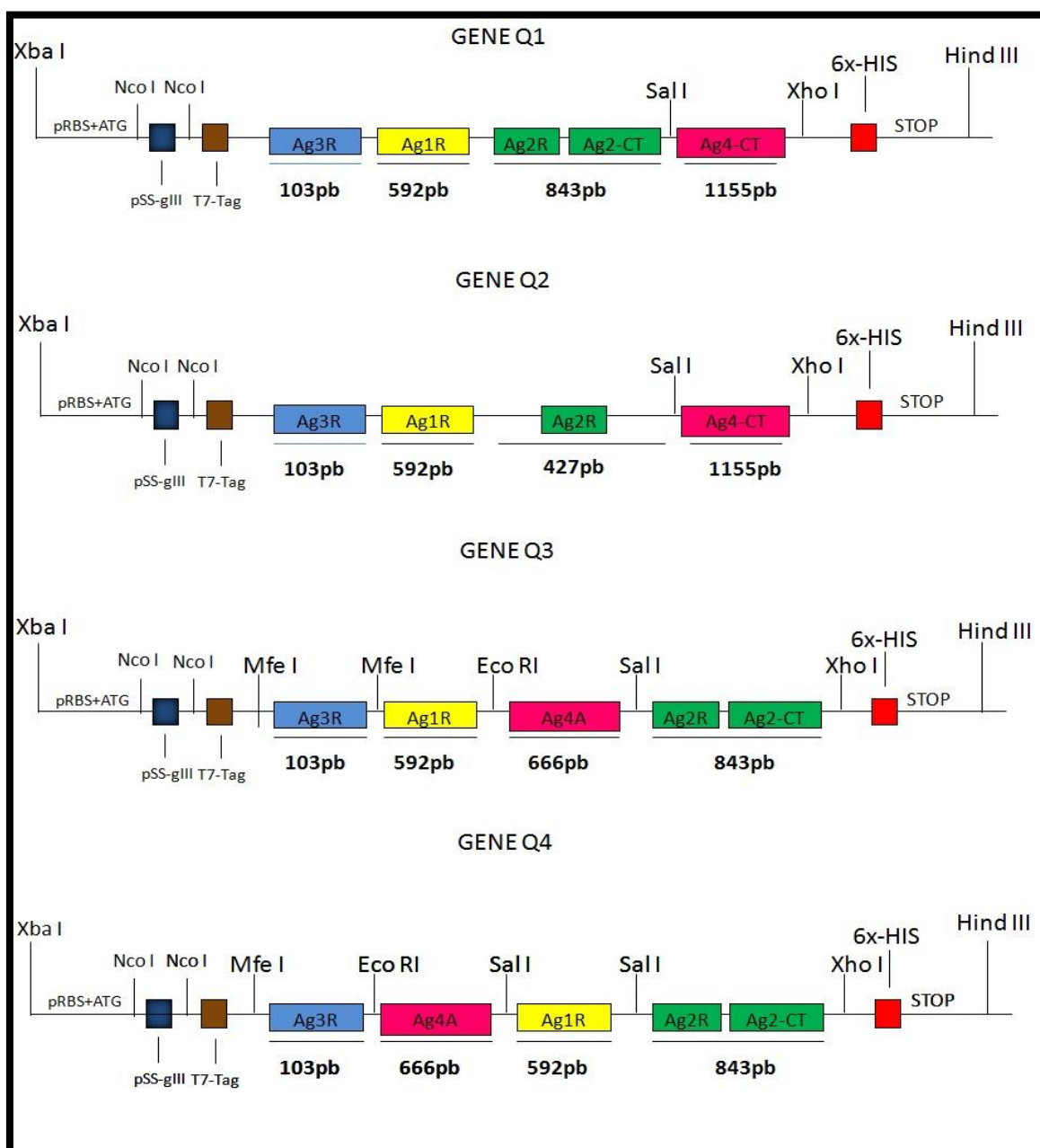


Figura 12. Esquema representativo dos genes quiméricos sintetizados: Observamos que todas as regiões de interesse foram desenhadas flanqueadas por sítios de enzimas de restrição de forma a se formular várias estratégias de subclonagens. As siglas A, R e CT significam: região Antigênica, região repetitiva e região C-Terminal respectivamente.

5.1. Subclonagem dos Genes Sintéticos (Q1, Q2, Q3 e Q4) em Vetores de Expressão.

De posse das construções gênicas, Q1, Q2, Q3 e Q4 sintetizados comercialmente e do plasmídio de expressão pRSETa realizou-se a extração do DNA plasmidial em larga escala, com o objetivo de obter uma grande quantidade de material genético plasmidial dos clones.

Seguindo a estratégia traçada para a primeira subclonagem como descrito na metodologia e representado na Figura 12, os genes sintéticos Q1, Q2, Q3 e Q4 foram subclonados no vetor de expressão pRSETa, através do auxílio da enzima *ScaI* que facilitou no processo de digestão e obtenção do inserto. As suas confirmações foram realizado através de digestões pelo par de enzimas de restrição *XbaI/HindIII*, onde o perfil de digestão pode ser observado de forma representativa na Figura 13, e por análise de sequenciamento das quais mostraram bandas nos tamanhos de 2845 pb, 2430 pb, 2360 pb e 2358 pb respectivamente. Como o plasmídio apresenta 2999 pb a visualização das bandas dos genes sintéticos de maior tamanho (Q1 e Q2) é dificultada mas sua presença foi confirmada por meio das reações de sequenciamento.

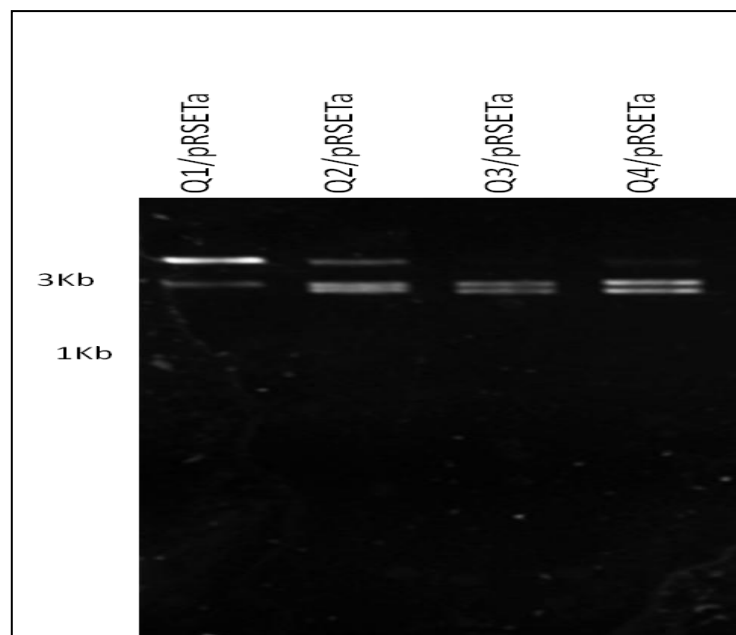


Figura 13. Confirmação da primeira subclonagem. Gel de agarose 1% mostrando o fracionamento e consequentemente a liberação dos insertos preditos após digestão com a dupla de enzima *XbaI/HindIII*. A digestão dos plasmídeos com os genes Q1 e Q2 foi parcial e mostra a banda correspondente ao plasmídeo linearizado.

5.2 Subclonagens para as construções quiméricas parciais

De posse das construções quiméricas completas clonadas no vetor pRSETa (Q1 COM, Q2 COM, Q3 COM e Q4 COM), para cada gene quimérico foram feitas digestões utilizando sítios de restrição internos presentes nos gene sintéticos, mas ausentes do vetor plasmidial, visando a geração de proteínas truncadas onde diferentes fragmentos peptídicos foram retirados dos genes completos. Os sítios de restrição selecionados foram inseridos com este propósito nos genes quiméricos ainda na fase de desenho das respectivas sequências. O

objetivo desta etapa foi o de se ampliar o número de proteínas quiméricas sintetizadas de forma a se verificar qual das alternativas e combinações antigênicas poderia melhorar a expressão proteica no sistema procariótico.

5.2.1 Obtenção das truncagens da construção Q1

Para a construção contendo o gene *Q1*, a primeira digestão foi realizada com a enzima *NcoI* que retira o peptídeo de otimização de expressão, com tamanho de 75 pb. Nesse sentido o plasmídeo pRSETa com o gene *Q1* completo foi digerido com *NcoI* e o produto da digestão separado em gel de agarose para purificação do fragmento contendo o plasmídeo e gene completo a exceção do fragmento de 75 pb. Este fragmento maior foi então religado de forma a gerar o gene sintético clonado no vetor pRSETa mas excluído o fragmento menor. Utilizando uma estratégia equivalente, uma segunda digestão foi feita a partir do gene completo utilizando as enzimas *Sall/XhoI*. Como os sítios de restrição para estas enzimas são complementares, a religação do fragmento maior produto desta digestão leva a produção de um gene quimérico, clonado no pRSETa, onde se retirou um fragmento de 1155 pb que codifica para o Ag4. A Figura 14 ilustra as construções geradas a partir do gene quimérico *Q1*.

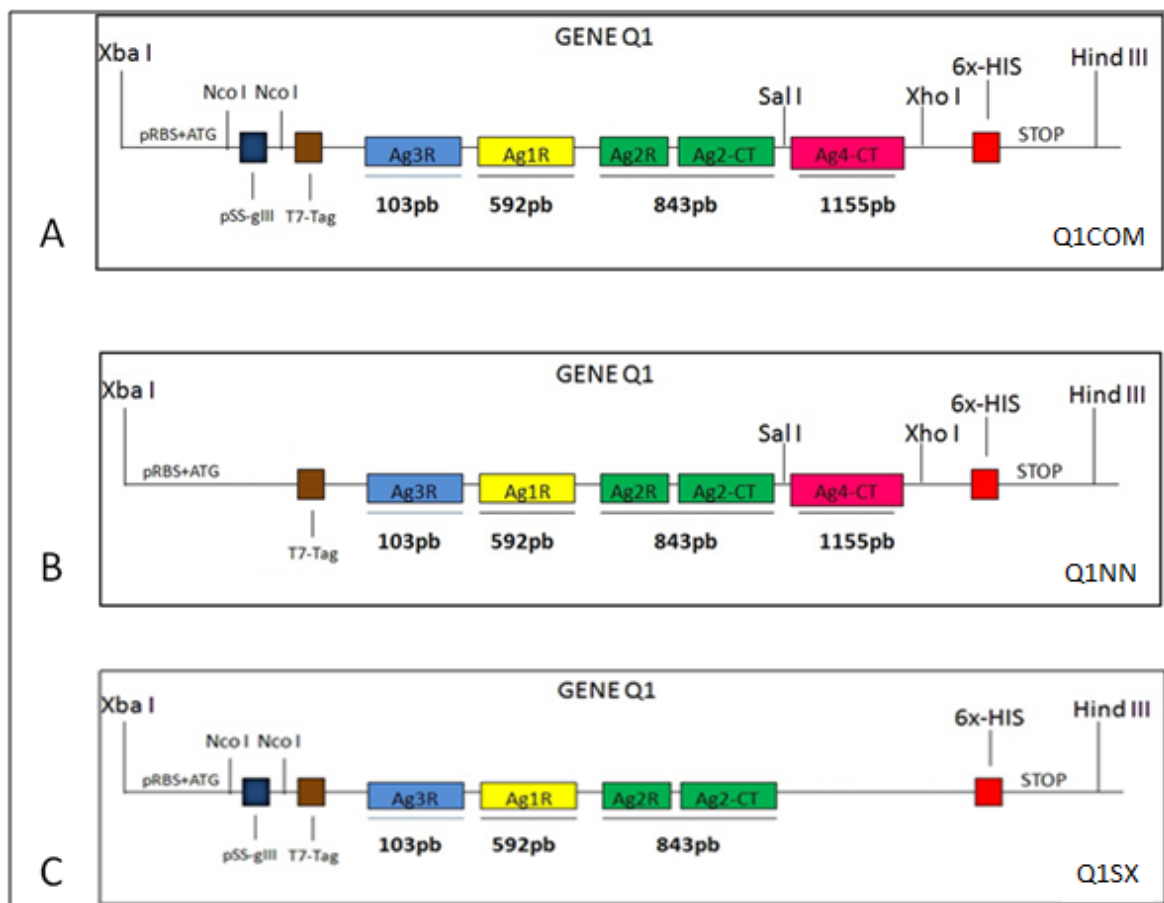


Figura 14. Construção da quimera 1: A) Q1COM flanqueada entre as enzimas *Xba*I/*Hind*III, a construção original B) Q1 sem o Tag de otimização excisado pela *Nco*I e C) Q1 sem o Ag4 excisado pelas *Sal*I/*Xho*I.

5.2.2 Obtenção das truncagens da construção Q2

Em relação ao gene quimérico Q1 a única diferença no gene Q2 é que o segmento que codifica o Ag2 nesta proteína não inclui o fragmento C-terminal da proteína (Ag2-CT) e que pode ou não interferir com a expressão da proteína quimérica. Para o gene Q2 então, uma estratégia equivalente a descrita acima com o gene quimérico Q1 foi realizada. Assim uma primeira digestão feita foi com a enzima *Nco*I que retira o peptídeo de otimização de expressão, com tamanho de 75 pb. Em seguida, uma segunda truncagem foi também realizada com o par

de enzimas *Sall/XhoI*, retirando o fragmento de 1155 pb que codifica o Ag4. A Figura 15 ilustra as construções geradas a partir do gene quimérico Q2.

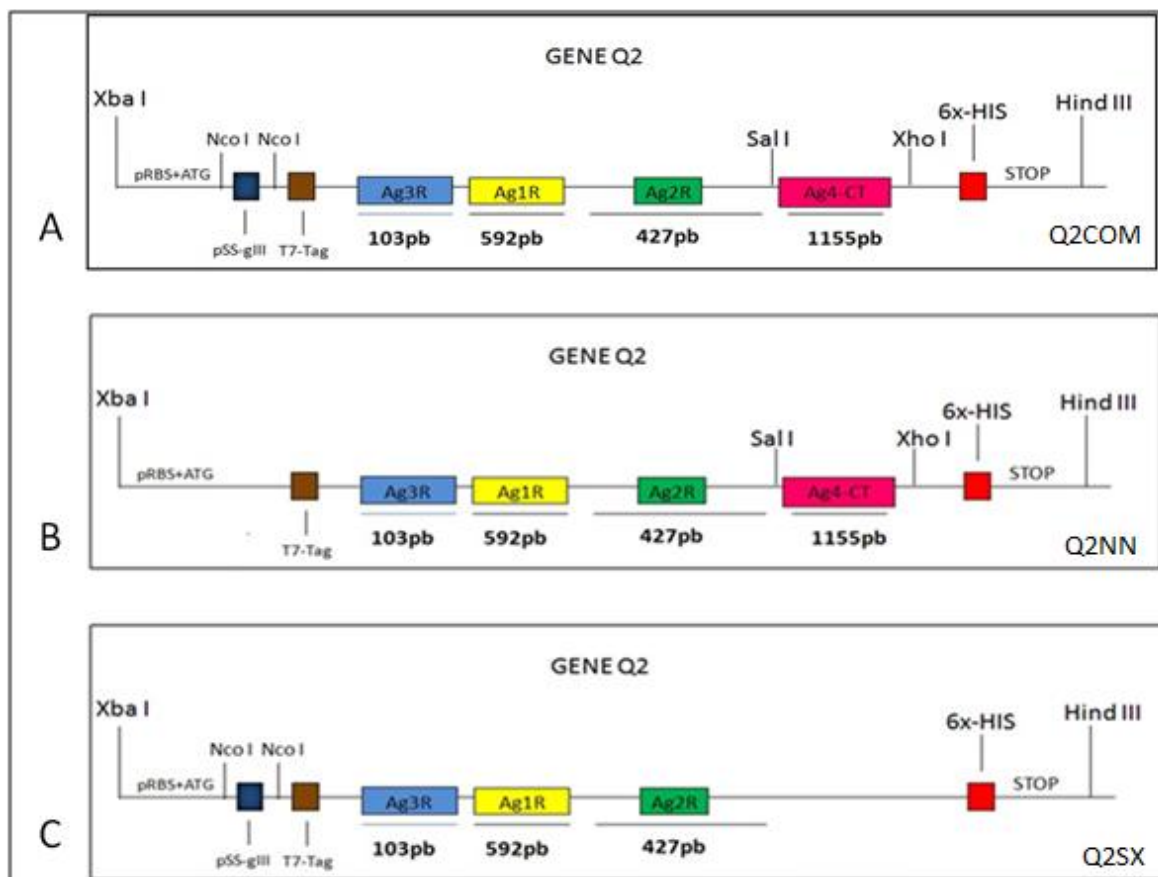


Figura 15. Construção quimérica 2: A quimera 2 não contém a região CT do Ag2 A) Q2COM flanqueada entre as enzimas *XbaI/HindIII*, B) Q2 sem o Tag de otimização excisado pela *NcoI* e C) Q2 sem o Ag4 excisado pelas *Sall/XhoI*.

5.2.3 Obtenção das truncagens da construção Q3

O gene quimérico Q3 codifica para uma proteína com a mesma composição antigênica do antígeno Q1, porém com uma inversão na ordem dos peptídeos antigênicos. Esse gene possui ainda um maior número de sítios de restrição, possibilitando a geração de uma quantidade maior de proteínas

recombinantes distintas. Da mesma forma que os demais, a primeira digestão feita foi com a enzima *NcoI* que retira o fragmento codificando o peptídeo de otimização de expressão, com tamanho de 75 pb. A segunda truncagem foi dada pela digestão com o par de enzimas *Sall/XhoI*, que neste caso retira o fragmento codificando o Ag2, que tem tamanho de 843 pb. Uma terceira digestão foi também realizada através da enzima *MfeI*, que retira o fragmento codificando o Ag3, com tamanho de 103 pb. E a última digestão foi feita através do par de enzimas *MfeI/EcoRI* retirando os fragmentos codificando os antígenos Ag3 e Ag1, com tamanhos de 103 e 592 pb, respectivamente. A Figura 16 ilustra as construções geradas a partir do gene quimérico Q3.

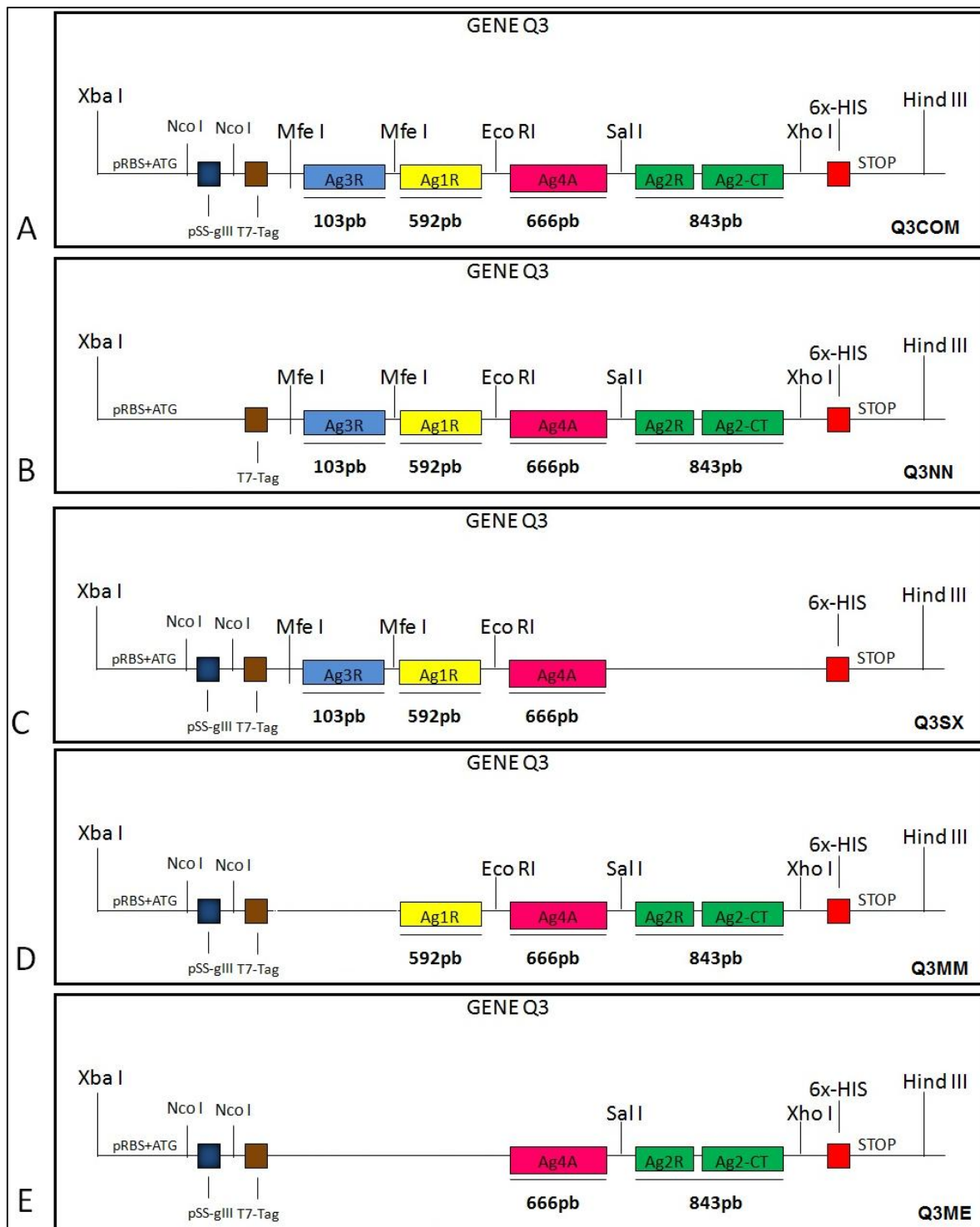


Figura 16. Construção da quimera 3: A) Q3COM flanqueada entre as enzimas *XbaI/HindIII*, B) Excisão do tag pSS-gIII flanqueado entre a enzima *NcoI*, C) Excisão do Ag2 entre as enzimas *SalI/XhoI*, D) Excisão do Ag3 pela enzima *MfeI*, e E) Excisão Ag3 e Ag1 pelo par de enzimas *MfeI/EcoRI*.

5.2.4 Obtenção das truncagens da construção Q4

O gene quimérico *Q4* também codifica para uma proteína com a mesma composição antigênica do antígeno *Q1*, porém com uma nova ordem dos peptídeos antigênicos. Assim como o *Q3*, Esse gene também possui um maior número de sítios de restrição e permitiu a geração de uma quantidade maior de proteínas recombinantes distintas. Para as truncagens, a primeira digestão também foi feita com a enzima *NcoI* retirando o peptídeo de. A segunda digestão com o par de enzimas *Sall/XhoI*, retirou os fragmentos codificando os Ag2 e Ag1, com tamanhos de 843 e 592 pb, respectivamente. Uma terceira digestão foi realizada através da enzima *MfeI/EcoRI* retirando o fragmento codificando o Ag3, de 103 pb. E a ultima digestão foi feita através da enzima *Sall*, retirando o fragmento codificando o Ag1, de 592 pb. A Figura 17 ilustra as construções geradas a partir do gene quimérico *Q4*.

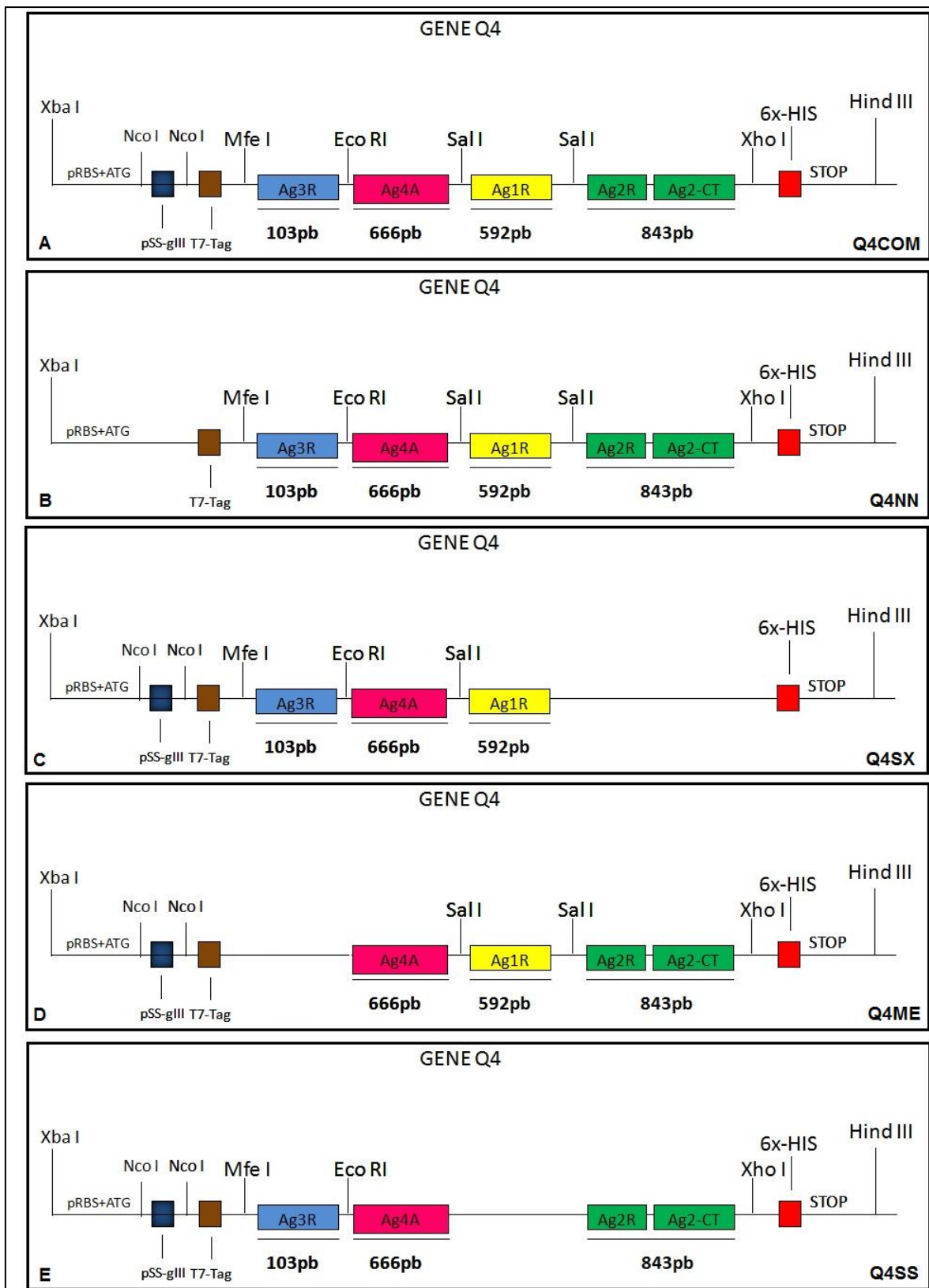


Figura 17. Construção da quimera 4: A) Q4COM flanqueada entre as enzimas *Xba*I/*Hind*III, B) Excisão do tag pSS-gIII flanqueado entre a enzima *Nco*I, C) Excisão do Ag2 e Ag3 entre as enzimas *Sal*I/*Xho*I, D) Excisão do Ag3 pela enzima *Mfe*I, e E) Excisão Ag2 pelo enzima *Sal*I.

5.2.5 Análise das diferentes construções quiméricas

Após se obter todas as digestões parciais tanto das quimeras completas como das quimeras truncadas, elas foram nomeadas de acordo com os sítios de restrição utilizados na sua obtenção (Tabela 2). No caso as construções geradas foram as seguintes: Q1COM, Q2COM, Q3COM e Q4COM, que correspondem as quimeras completas flanqueadas pelos sítios *XbaI/HindIII*; Q1NN, Q2NN, Q3NN e Q4NN, que correspondem as quimeras sem o peptídeo de otimização da tradução, gerado pelas digestões dos genes quiméricos com *NcoI*; Q1SX, Q2SX, Q3SX e Q4SX, correspondendo às construções quiméricas geradas pela digestão com as enzimas *Sall/XhoI*; Q3MM, correspondente a construção quimérica do Q3 gerada pela digestão com *MfeI*; Q3ME e Q4ME, correspondentes às construções quiméricas geradas pela digestão dos Q3 e Q4 com as enzimas *MfeI/EcoRI*; e por fim a Q4SS, corresponde a digestão do gene Q4 com a enzima *Sall*.

Tabela 2: Nomenclatura das construções geradas e o tamanho do inserto liberado quando digeridas pelas enzimas *XbaI/HindIII*.

NOMENCLATURA	Tamanho do inserto liberado (pb)
Q1COM	2845
Q1NN	2734
Q1SX	1690
Q2COM	2430
Q2NN	2319
Q2SX	1275
Q3COM	2360
Q3NN	2249
Q3SX	1517
Q3MM	2205
Q3ME	1719
Q4COM	2358
Q4NN	2247
Q4SX	923
Q4ME	2202
Q4SS	1716

As construções foram obtidas através da digestão pelas determinadas enzimas, purificação do inserto de interesse e religação, onde em seguida, foi obtido o DNA plasmidial em pequena e grande escala. As clonagens foram confirmadas por digestões com o par de enzimas *XbaI/HindIII* e pelo sequenciamento. A Figura 18 ilustra os insertos observados nos tamanhos determinados para as diferentes construções.

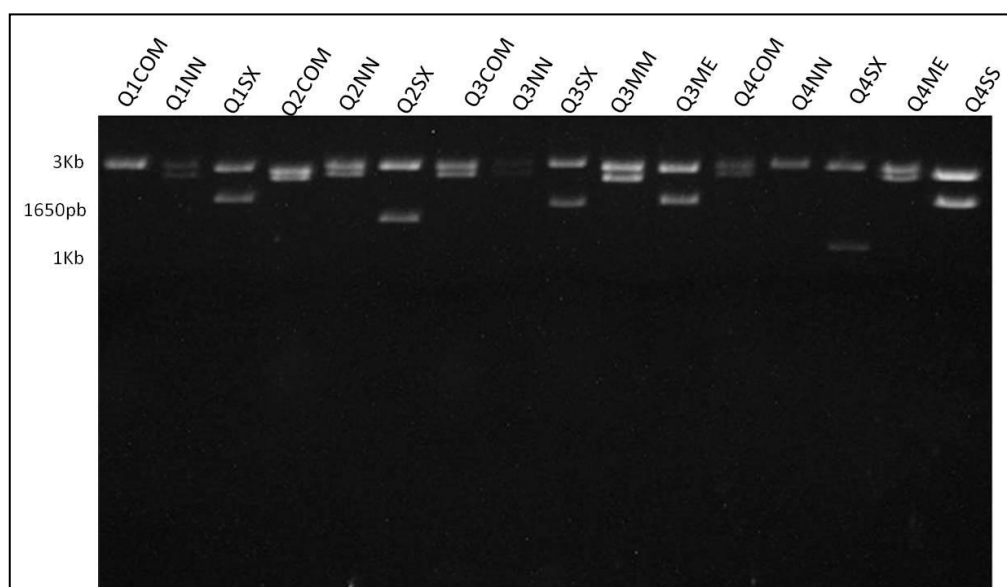


Figura 18. Gel representativo mostrando a liberação dos insertos nos tamanhos esperados: Gel de agarose 1% mostrando os insertos em seus tamanhos preditos, obedecendo a tabela 2, após a digestão com o par de enzimas *XbaI/HindIII*,

5.3 Expressão das proteínas quiméricas completas e truncadas

Uma vez que foi obtido o DNA plasmidial de todas as construções quiméricas de interesse e confirmados por digestão e sequenciamento, estas construções geradas foram transformadas em células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) plysS e induzidas na presença de isopropil-Beta-D-galactosídeo (IPTG). Após o período de crescimento e expressão, extratos bacterianos totais

de células expressando as diferentes proteínas foram fracionados em gel de SDS-PAGE, seguido de coloração com Azul de Coomassie para a visualização das proteínas de interesse. A Tabela 3 ilustra o peso molecular esperado para cada uma das proteínas recombinantes codificadas pelos diferentes genes quiméricos obtidos. Entretanto, como mostra a Figura 19, não foram obtidos resultados visualmente significativos no gel para a grande maioria das proteínas recombinantes. A única exceção foi a proteína quimérica Q2SX, como mostra a seta vermelha. O vetor pRSETa foi utilizado como controle negativo e uma proteína D2 foi utilizada como controle positivo, visto que a mesma apresenta em sua composição três antígenos em comum com as minhas construções. A tabela 4 mostra todas as construções e seus respectivos tamanhos de pares de bases e de kDa, além de mostrar o que foi retirado de cada construção.

Tabela 3: Nomenclatura das construções proteicas e seus pesos moleculares determinados no gel SDS-PAGE.

NOMENCLATURA	PESO MOLECULAR (kDa)
Q1COM	102,65
Q1NN	99,26
Q1SX	60,46
Q2COM	87,07
Q2NN	83,68
Q2SX	44,88
Q3COM	84,76
Q3NN	81,37
Q3SX	53,56
Q3MM	80,48
Q3ME	63,21
Q4COM	84,35
Q4NN	81,21
Q4SX	32,03
Q4ME	80,18
Q4SS	63,28

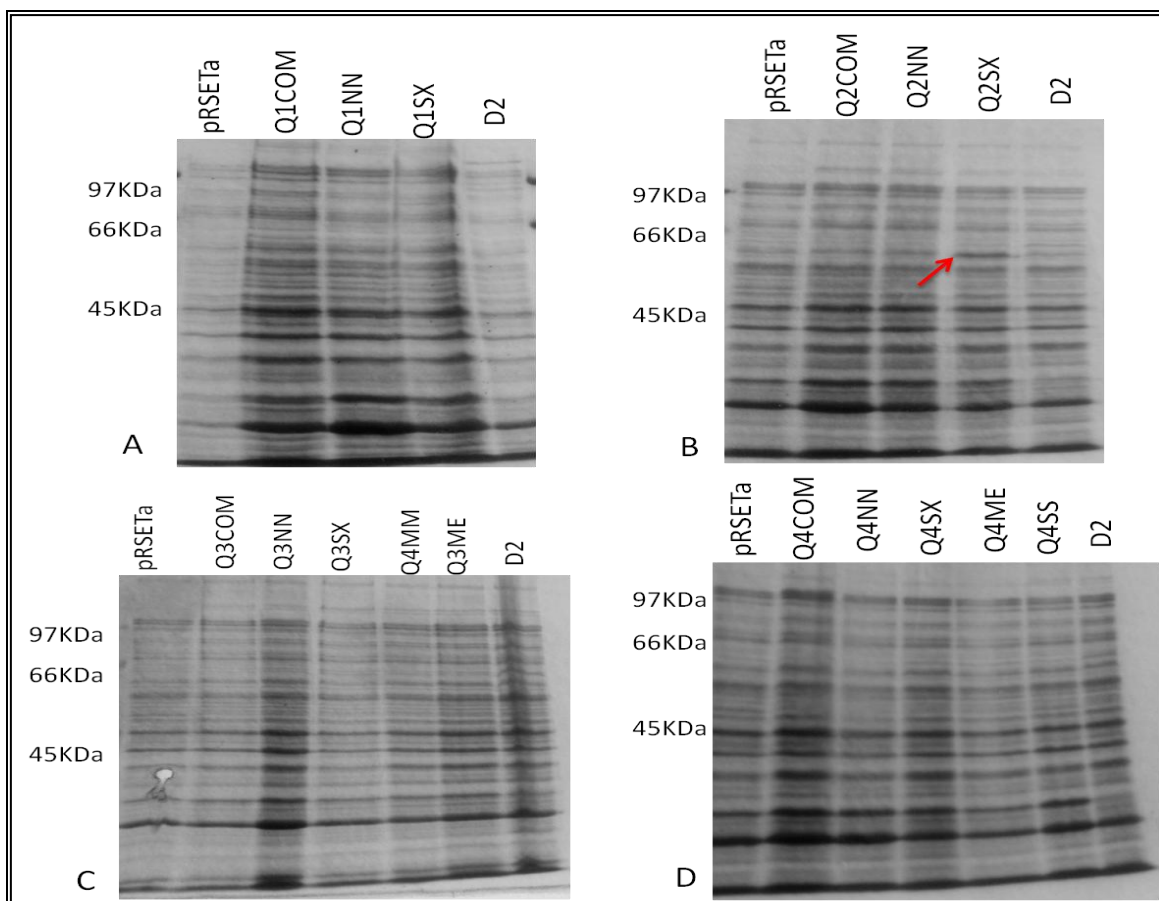


Figura 19. Análise da expressão em *Escherichia coli* das diferentes proteínas recombinantes: Gel de SDS-PAGE 15% representando as proteínas expressas em extratos totais de *E. coli* após indução com IPTG. Os números a esquerda indicam o peso dos marcadores moleculares em kDa, pRSETa utilizado como controle negativo e a D2 como outro controle positivo.

Tabela 4: Todas as construções quiméricas completas e truncadas os seus tamanhos previstos, em destaque a sequência que melhor teve um perfil de expressão.

<i>NOMENCLATURA</i>	<i>Ordem dos Antígenos</i>	<i>(pb)</i>	<i>(kDa)</i>
Q1COM	Tag-Ag3-Ag1-Ag2+Ag2CT-Ag4	2845	102,65
Q1NN	Ag3-Ag1-Ag2+Ag2CT-Ag4	2734	99,26
Q1SX	Tag-Ag3-Ag1-Ag2+AgCT	1690	60,46
Q2COM	Tag-Ag3-Ag1-Ag2-Ag4	2430	87,07
Q2NN	Ag3-Ag1-Ag2-Ag4	2319	83,68
Q2SX	Tag-Ag3-Ag1-Ag2	1275	44,88
Q3COM	Tag-Ag3-Ag1-Ag4-Ag2+Ag2CT	2360	84,76
Q3NN	Ag3-Ag1-Ag4-Ag2+Ag2CT	2249	81,37
Q3SX	Tag-Ag3-Ag1-Ag4	1517	53,56
Q3MM	Tag-Ag1-Ag4-Ag2+Ag2CT	2205	80,48
Q3ME	Tag-Ag4-Ag2+Ag2CT	1719	63,21
Q4COM	Tag-Ag3-Ag4-Ag1-Ag2+Ag2CT	2358	84,35
Q4NN	Ag3-Ag4-Ag1-Ag2+Ag2CT	2247	81,21
Q4SX	Tag-Ag3-Ag4	923	32,03
Q4ME	Tag-Ag4-Ag1-Ag2+Ag2CT	2202	80,18
Q4SS	Tag-Ag3-Ag4-Ag2+Ag2CT	1716	63,28

5.4. Reconhecimento das proteínas quiméricas por anticorpos através de ensaios de *Western Blot*.

Os extratos bacterianos expressando os diferentes genes quiméricos obtidos foram então submetidas a ensaios de *Western Blot* visando confirmar a expressão das diferentes proteínas quiméricas por meio de sua detecção com

soros disponíveis contra os antígenos Ag2, Ag3 e Ag4, ou soro comercial dirigido contra a sequência de poli-histidinas.

Não foi avaliado o Ag1, pois não se dispõe de soro contra ele no laboratório. Foi utilizado como controle negativo o pRSETa induzido e outro controle (proteína quimérica D2) servindo como comparativo, esta foi uma das proteínas quiméricas obtida em estudo prévio e que tem três proteínas semelhantes as que estão inseridas nestas construções, com aproximadamente 97 kDa de tamanho.

5.4.1 Reconhecimento das proteínas quiméricas Q1 e suas truncagens

Primeiramente as proteínas quiméricas derivadas do gene *Q1* (Q1COM, Q1NN e Q1SX), junto com a proteína controle D2, foram avaliadas com o primeiro anticorpo o Anti-Ag2, mostrando o reconhecimento destas proteínas nos tamanhos preditos, como indicados pelas setas em vermelho na Figura 20A. A Figura 20B mostra em seguida as proteínas quiméricas reconhecidas pelo Anti-Ag3, enquanto a figura 20C mostra o reconhecimento apenas das proteínas Q1COM e Q1NN através do Anti-Ag4, pois a proteína Q1SX e a D2 não contém o Ag4. Por fim, a figura 20D mostra o reconhecimento das proteínas pelo anticorpo Anti-Histidina, pois todas as construções quiméricas possuem a sequência de poli-histidinas na sua extremidade C-terminal.

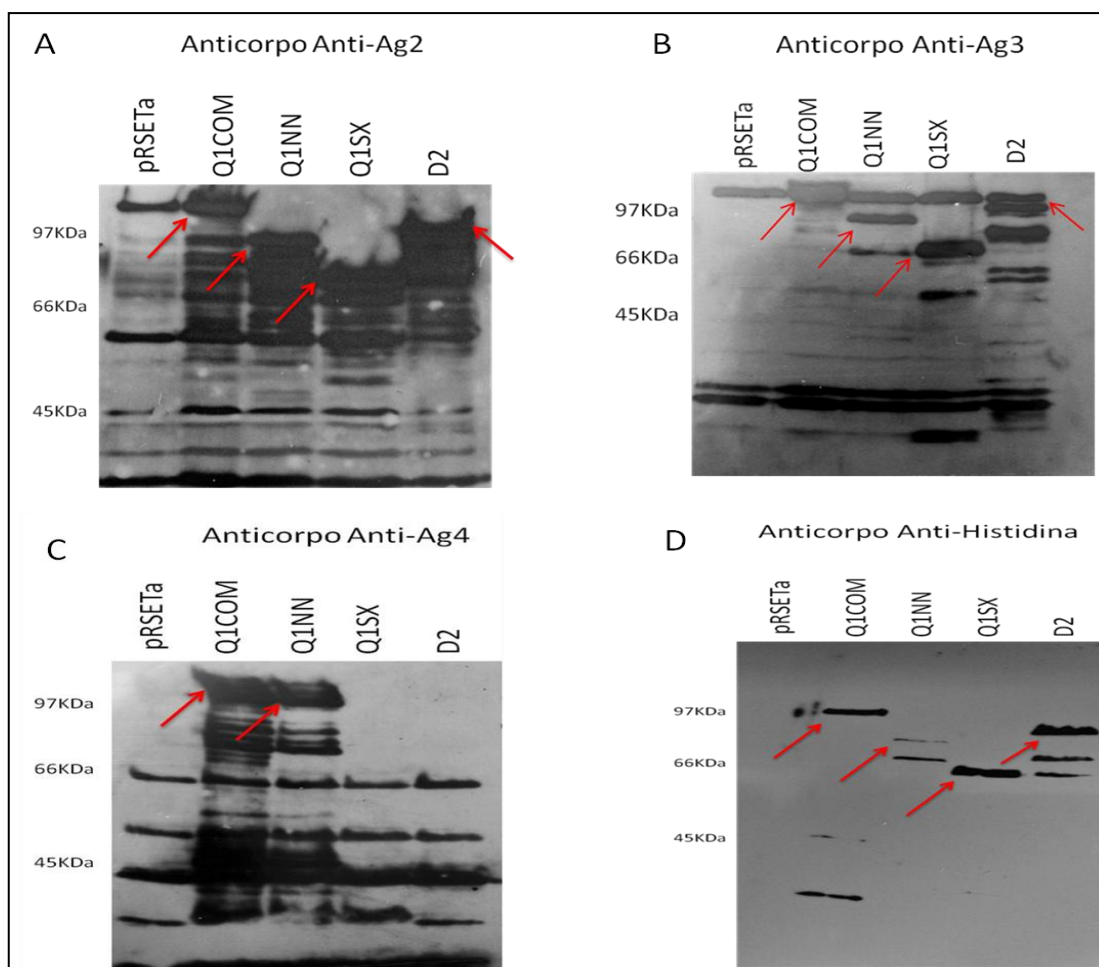


Figura 20. Western Blot representativo do reconhecimento das construções quiméricas derivadas do gene Q1: As construções foram reconhecidas nos seus tamanhos preditos o pRSET apenas como controle, 102KDa, 99KDa, 60KDa e 97kDa e, respectivamente como demonstram as setas, em relação a Q1NN o seu tamanho, em alguns casos não condizem com o esperado podendo ter havido vazamento dos poços no momento da corrida. Os anticorpos foram diluídos de 1:3000 para estas reações. A) reconhecimento das proteínas pelo Anti-Ag2, B) reconhecimento das proteínas pelo Anti-Ag3, C) reconhecimento das proteínas pelo Anti-Ag4 e D) reconhecimento das proteínas pelo Anti-Histidina.

5.4.2 Reconhecimento das proteínas quiméricas Q2 e suas truncagens

Em seguida as proteínas quiméricas derivadas do gene Q2 (Q2COM, Q2NN e Q2SX) foram avaliadas com o primeiro anticorpo, Anti-Ag2, mostrando o

reconhecimento nos tamanhos preditos indicados pelas setas em vermelho (Figura 21A). Na sequência, a Figura 21B mostra as proteínas reconhecidas pelo Anti-Ag3, enquanto a figura 21C mostra o reconhecimento pelo Anti-Ag4 apenas das proteínas Q2COM e Q2NN. Como no caso das proteínas derivadas do gene Q1, as proteínas Q2SX e a D2 não contém o Ag4. A figura 21D mostra o reconhecimento das diferentes proteínas pelo anticorpo Anti-Histidina.

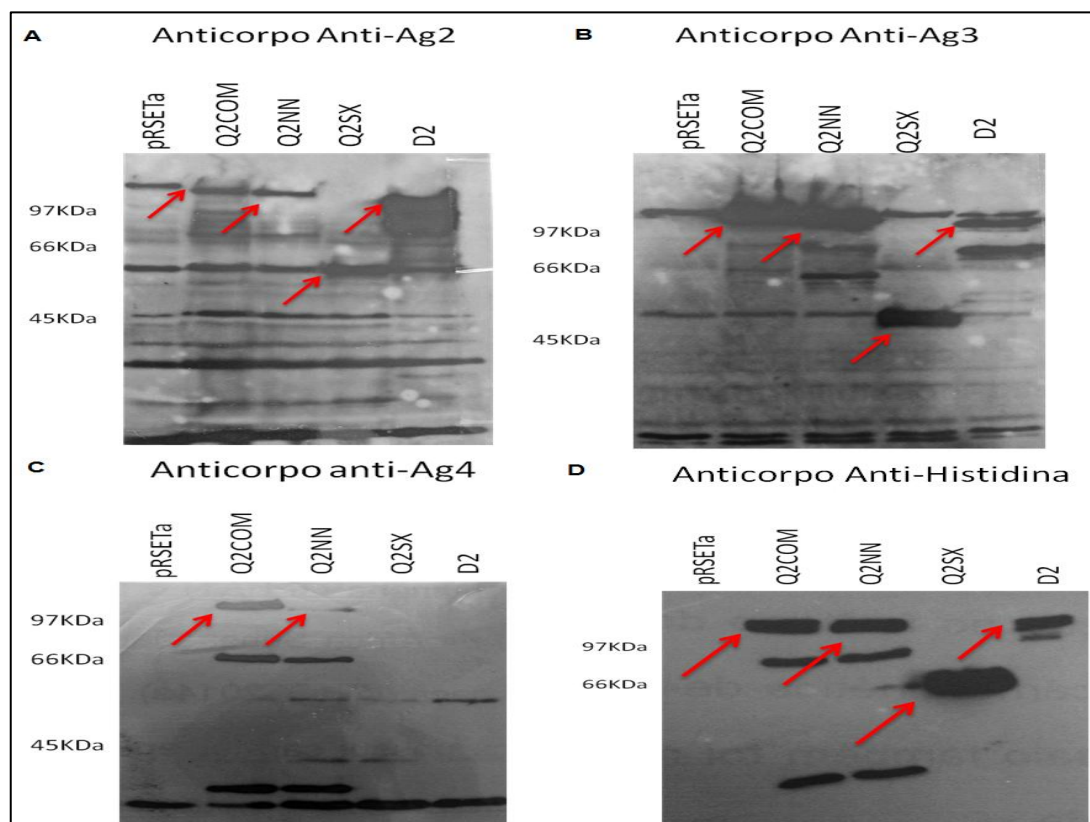


Figura 21. Western Blot representativo do reconhecimento das construções quiméricas derivadas do gene Q2: As construções foram reconhecidas nos seus tamanhos preditos de 87KDa, 83KDa, 45KDa e 97kDa respectivamente como demonstram as setas. Os anticorpos foram diluídos de 1:3000 para estas reações. A) reconhecimento das proteínas pelo Anti-Ag2, B) reconhecimento das proteínas pelo Anti-Ag3, C) reconhecimento das proteínas pelo Anti-Ag4 e D) reconhecimento das proteínas pelo Anti-Histidina.

5.4.3 Reconhecimento das proteínas quiméricas Q3 e suas truncagens

Dando continuidade, as proteínas quiméricas derivadas do gene Q3 (Q3COM, Q3NN e Q3SX, Q3MM e Q3ME) foram avaliadas com o anticorpo Anti-Ag2. Como mostrado na Figura 22A, não houve o reconhecimento da proteína Q3SX, pois ela de fato não possui este antígeno. Quando avaliadas na presença do Anti-Ag3 não houve o reconhecimento das proteínas Q3MM e Q3ME que não tem o Ag3, como mostra a figura 22B. Em relação ao reconhecimento pelo anti-Ag4, não foi possível a avaliação, pois ele se mostrou impuro no reconhecimento dessas proteínas. E por fim foi avaliado o reconhecimento através do anticorpo anti-histidina na figura 22C. No caso do reconhecimento pela anti-histidina, algumas proteínas não se apresentaram devida ao tempo de exposição ou as truncagens degradaram a histidina.

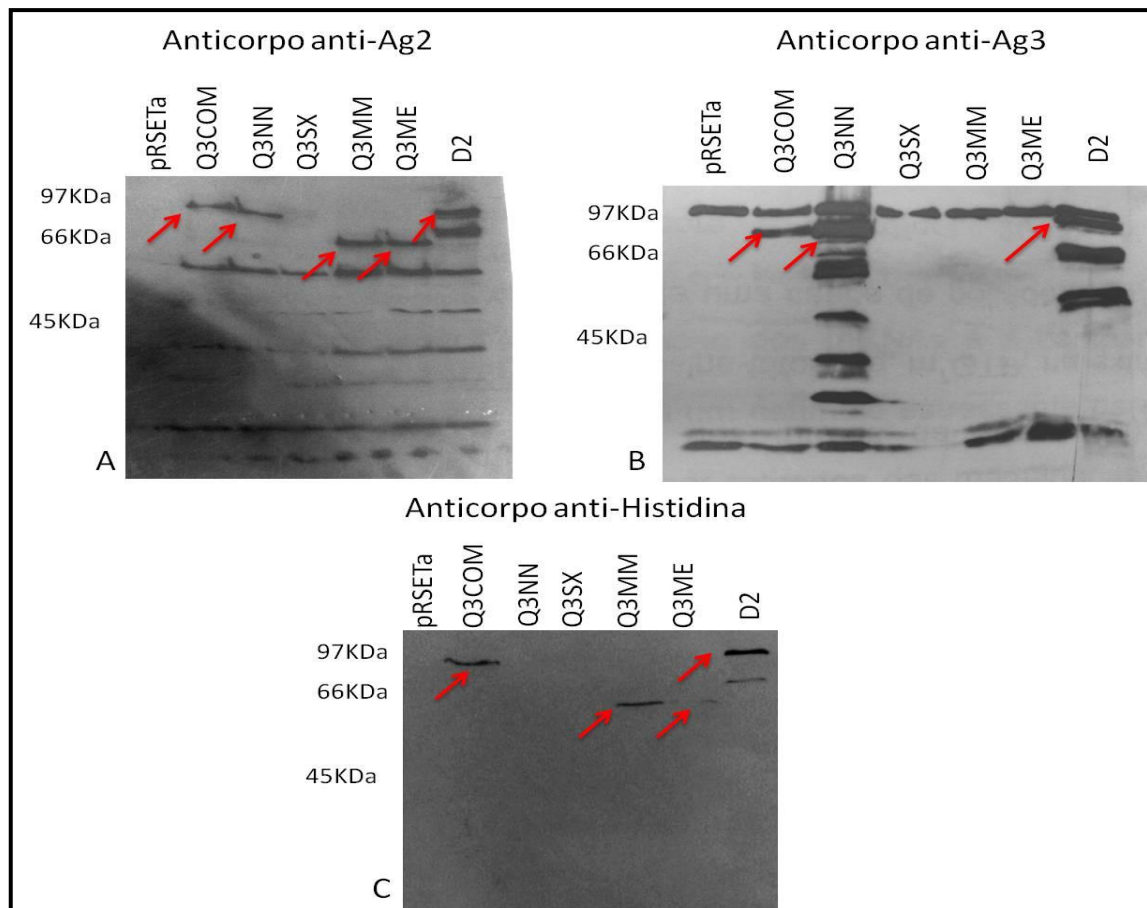


Figura 22. Western Blot representativo do reconhecimento das construções quiméricas derivadas do gene Q3: As construções foram reconhecidas nos seus tamanhos preditos de 84KDa, 81KDa, 53KDa, 80kDa, 63kDa e 97kDa respectivamente como demonstram as setas. Os anticorpos foram diluídos de 1:3000 para estas reações. A) reconhecimento das proteínas pelo Anti-Ag2, B) reconhecimento das proteínas pelo Anti-Ag3, C) reconhecimento das proteínas pelo Anti-Histidina.

5.4.4 Reconhecimento das proteínas quiméricas Q4 e suas truncagens

Finalizando, as proteínas quiméricas (Q4COM, Q4NN e Q4SX, Q4ME e Q4SS) foram avaliadas com o primeiro anticorpo o Anti-Ag2, como mostrado na Figura 23A, não havendo o reconhecimento da proteína Q4SX, pois ela não possui o Ag2. Quando avaliadas na presença do Anti-Ag3 não houve o reconhecimento da proteína Q4ME que não tem o Ag3, como mostra a figura 23B.

Em relação ao reconhecimento pelo anti-Ag4, não foi possível a avaliação, pois ele se mostrou impuro no reconhecimento dessas proteínas. E por fim foi avaliado o reconhecimento através da Anti-Histidina na figura 23C.

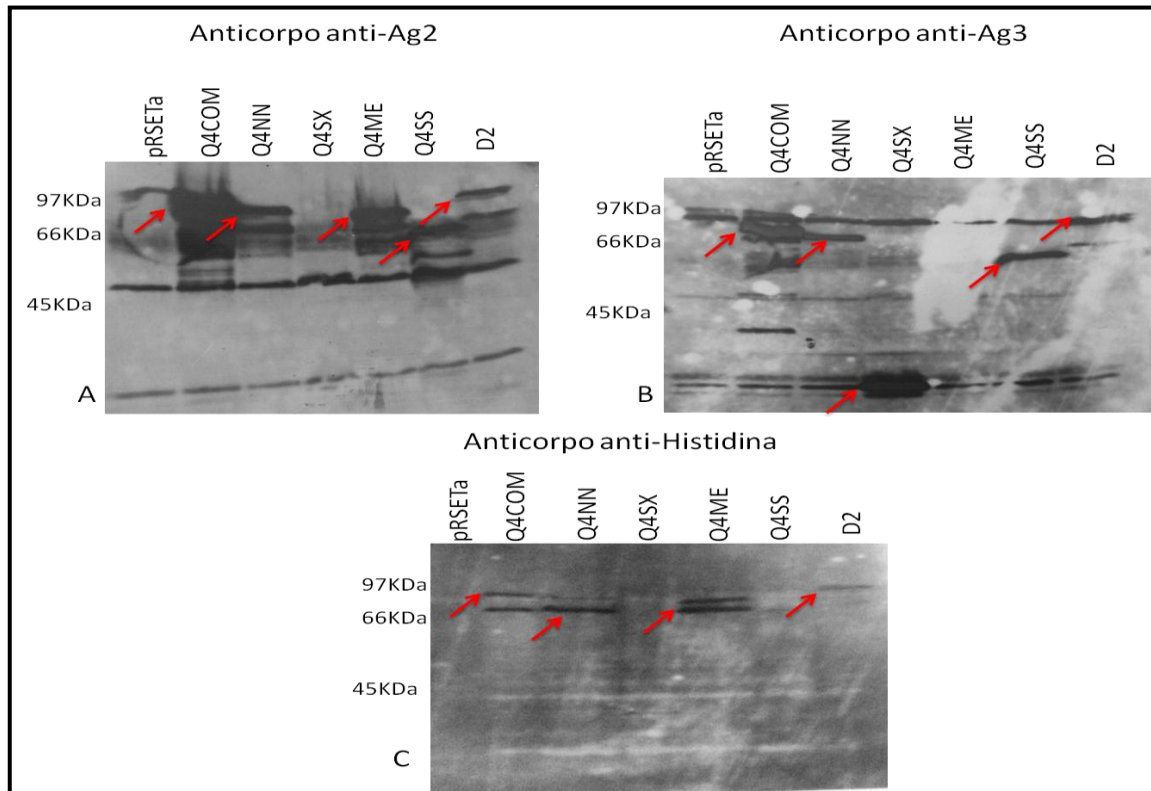


Figura 23. Western Blot representativo do reconhecimento das construções quiméricas derivadas do gene Q4: As construções foram reconhecidas nos seus tamanhos preditos de 84KDa, 81KDa, 32KDa, 80kDa, 63kDa e 97kDa respectivamente como demonstram as setas. Os anticorpos foram diluídos de 1:3000 para estas reações. A) reconhecimento das proteínas pelo Anti-Ag2, B) reconhecimento das proteínas pelo Anti-Ag3, C) reconhecimento das proteínas pelo Anti-Histidina.

6. DISCUSSÃO

O diagnóstico sorológico apresenta um papel crítico na confirmação da Leishmaniose Visceral, uma vez que o diagnóstico precoce e rápido constitui uma importante ferramenta para o combate e controle dessa doença (Faria *et al*, 2015, 2012; Srivastava *et al.*, 2012). Vários antígenos de *Leishmania* têm sido caracterizados e tecnologias recombinantes têm sido utilizadas para o desenvolvimento de antígenos recombinantes, como exemplo, temos as proteínas relacionadas à cinesina, a rK39, a rK26 com sensibilidade e especificidade de 100% nos estudos realizados por Sundar *et. al* 2007 e Mohapatra *et. al* 2010, além da rK9 com 95% de sensibilidade e 100% de especificidade (Mohapatra *et. al* 2010).

Neste sentido, o desenvolvimento de proteínas recombinantes que reúnam vários determinantes antigênicos numa única molécula (proteína quimérica) pode resultar em uma excelente proposta já que facilita a padronização dos ensaios de diagnóstico. Boarino *et. al* 2005, conseguiu produzir uma proteína quimérica, resultante da fusão da K9, da K26 e da subunidade de K39, de forma recombinante confirmando a existência de relatos de que uma única molécula contendo vários antígenos permite uma melhor distribuição dos determinantes antigênicos na placa de ELISA, quando comparados com a utilização de múltiplas moléculas em um mesmo ensaio (Houghton *et al.*, 2000; da Silveira *et al.*, 2001; Aguirre *et al.*, 2006; Camussone *et al.*, 2009). Além desta distribuição, a produção de uma única molécula, composta por diferentes epítomos antigênicos, torna o custo final da produção de um ensaio menos dispendioso e oneroso em

comparação aos sistemas produzidos a partir de duas ou mais proteínas recombinantes individuais.

Em estudos prévios realizados pelo nosso grupo, as construções quiméricas originalmente testadas não foram desenhadas com condições ótimas para expressão em bactérias, e de fato sua expressão se mostrou pouco eficiente e susceptível a proteólise (Tavares, 2012). Observando esta dificuldade de expressão, esse estudo se propôs a construir proteínas quiméricas formadas por sequências derivadas de quatro peptídeos pré-selecionados (Ag1, Ag2, Ag3 e Ag4) reunidos em genes quiméricos sintetizados por processos químicos. Esta é uma etapa muito importante para o aprimoramento de testes sorológicos, pois a produção do antígeno em escala industrial precisa ser eficiente (reduzindo os custos e padronização na produção). O modelo de expressão em *E. coli* é o mais comumente utilizado para a produção industrial de proteínas recombinantes para diversas aplicações. Estes organismos apresenta crescimento rápido e em altas densidades em meio de crescimento relativamente barato, são fáceis de transformar e podem produzir grandes quantidades de produtos recombinantes (Terpe 2006).

A análise da eficiência de expressão dessas proteínas em sistema procariótico seguiu três etapas: a) estudo através de bioinformática para reduzir e selecionar as regiões antigênicas (através da predição de epitopo), b) truncagem das regiões antigênicas através de subclonagem, e por fim, c) análise do reconhecimento antigênico por *Western-Blot*. Foi possível construir e avaliar a expressão de quatro genes quiméricos (Q1, Q2, Q3 e Q4), que diferem apenas na ordem de posicionamento das regiões dos antígenos selecionados, ao longo de suas sequências. Nossos ensaios apontaram que o principal fator envolvido na

otimização da expressão de proteínas recombinantes em procariotos é o tamanho final da proteína (Figura 19), pois quando reduzimos o tamanho final da quimera, independentes do antígeno que foi retirado, a eficiência da expressão é aumentada, com exceção do antígeno Q3SX, cuja expressão não foi detectada nos ensaios de *Western-Blot* e precisaria ser reavaliado. Em um estudo recente onde foi possível construir, expressar e avaliar duas proteínas recombinantes multiepitopos de *Leishmania*, com método de expressão semelhante ao que é utilizado no presente estudo, a expressão de proteínas de aproximadamente 22kDa e 35kDa se mostrou bastante eficiente e não apresentou grau de degradação (Faria *et al*, 2015). Fonseca *et al*, 2014, também construíram três antígenos quiméricos de *Leishmania* com aproximadamente 40 kDa, e que também não apresentaram alto grau de degradação.

Outro fator observado, é que independentemente da combinação entre as regiões, todas as proteínas quiméricas apresentaram uma degradação significativa. É possível acreditar que esse alto grau de degradação ocorra devido aos inúmeros motivos repetitivos presentes nessas construções, como relatado em outras situações de expressão de proteínas recombinantes equivalentes (Jana e Deb, 2005; Sorensen e Mortensen, 2005; Rosano e Ceccarelli, 2009).

A utilização de estratégias de truncagem internas foi uma abordagem suplementar para se avaliar o efeito de possíveis conformações secundárias e terciárias que pudessem interferir na expressão e na antigenicidade das construções. Diante dos resultados, aparentemente não houve alterações significativas na expressão das construções após o processo de truncagem. Entretanto, quando as construções foram submetidas aos ensaios de *Western-Blot* as proteínas Q2SX, Q1SX e Q4SX respectivamente se mostraram mais

eficientes no reconhecimento do anticorpo. Contudo, para se inferir um aumento de antigenicidade, proveniente das truncagens, seriam necessários mais estudos através de teste de ELISA, para se medir a capacidade de detecção de LV utilizando um painel de soros humanos e caninos.

Em relação ao processo de otimização da expressão em procariotos pelo método de desenho gênico através de bioinformática (GENDESIGN), apesar de não ter alcançado o desempenho almejado, se mostrou um processo eficiente para otimização da expressão e crucial para avaliação individual das regiões, decorrentes da inserção de sítios de restrição que propiciam os processos de subclonagem. Com relação a adição do peptídeo pSS-gIII na extremidade N-terminal das proteína para se otimizar sua expressão, esta estratégia mostrou-se eficaz, pois foi visto através dos ensaios de *Western-Blot* com o Anti-Histidina que quando ele é retirado, sua expressão era diminuído.

Por fim, ainda são necessárias maiores intervenções na construção da proteína quimérica para diagnóstico, a fim de alcançar as condições de expressão adequadas para produção em larga escala, e que tenha o efeito somatório do potencial antigênico das regiões pré-selecionadas.

7. Conclusões

O grande tamanho das construções afetou no processo de clonagem nos vetores de expressão, dificultando na liberação dos insertos de modo mais direto sem intervenção de outras enzimas;

As formas de truncagens puderam mostrar que o tamanho dos fragmentos realmente interfere na expressão e que o peptídeo de otimização colocado na região N-Terminal das sequências melhorou um pouco a expressão protéica;

De todas as construções geradas as melhores foram Q2SX, Q1SX e Q4SX, indicando que a ordem em que os diferentes fragmentos antigênicos se apresentam não interfere na expressão das respectivas proteínas quimérica.

O resultado obtido para a Q2SX corrobora com resultados prévios onde foi possível avaliar que a ordem em que essa proteína se apresenta é eficiente no diagnóstico da LV.

8. Referências Bibliográficas

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., e Pillai, S. (2008). *IMUNOLOGIA CELULAR E MOLECULAR* 6th ed. (ELSEVIER Ltd).
- Aguirre, S., Silber, A. M., Brito, M. E. F., Ribone, M. E., Lagier, C. M., e Marcipar, I. S. (2006). Design, construction, and evaluation of a specific chimeric antigen to diagnose chagasic infection. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 3768–3774.
- Ahuja SS, Reddick RL, Sato N, Montalbo E, KostECKI V, Zhao W, Dolan MJ, Melby PC, Ahuja SK (1999) Dendritic cell (DC)-based anti-infective strategies: DCs engineered to secrete IL-12 are a potent vaccine in a murine model of an intracellular infection. *The Journal of Immunology*, 163(7):3890–3897.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Boer M (2012) Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *Plos one* 7(5).
- Alves WA e Bevilacqua PD (2004). Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997]. *Cadernos de saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública* 20: 259–265.
- Assis, T. S. M. de, Braga, A. S. da C., Pedras, M. J., Barral, A. M. P., Siqueira, I. C. de, Costa, C. H. N., Costa, D. L., Holanda, T. A., Soares, V. Y. R., e Biá, M., et al. (2008). Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 17, 107–116.
- Bañuls, A.-L., Hide, M., e Prugnolle, F. (2007). Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in Parasitology* 64, 1–109.
- Basano, S. D. A., e Camargo, L. M. A. (2004). Leishmaniose tegumentar americana: histórico , epidemiologia e perspectivas de controle *American cutaneous leishmaniasis* : 7, 328–337.
- Bates PA (2007) Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology* 37:1097– 1106.
- Besteiro, S., Williams, R. a M., Coombs, G. H., e Mottram, J. C. (2007). Protein turnover and differentiation in Leishmania. *International Journal for Parasitology* 37, 1063–1075.
- Bhaskar, Kumari N, Goya N (2012) Cloning, characterization and sub-cellular localization of gamma subunit of T-complex protein-1 (chaperonin) from Leishmania donovani. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 429:70–74.
- Boelaert M, El-Safi S, Hailu A, Mukhtar M, Rijal S, Sundar S, Wasunna M, Aseffa A, Mbui J, Menten J, et al, (2008) Diagnostic tests for kala-azar: a multicentre study of the freeze-dried DAT, rK39 strip test and KAtex in east Africa and the Indian subcontinent . *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 102:32–40.
- Borja-Cabrera GP, Correia Pontes NN, da Silva VO, Paraguai de Souza E, Santos WR, Gomes EM, Luz KG, Palatnik M, Palatnik de Sousa CB (2002) Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amarante, RN). *Vaccine*, 20(27-28):3277–3284.

- Brasil. (2011). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em saúde. Departament de Epidemiologia. Leishmaniose Visceral Recomendações Clínicas para redução da letalidade 1º ed. Brasília.
- Brasil. (2014). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em saúde. Departamento de Vigilância Epidemiologia. Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral 1º ed. Brasília, 5ª reimpressão.
- Brotherton MC, Racine G, Foucher AL, Drummelsmith J, Papadopoulou B, Ouellette M (2010) Analysis of Stage-Specific Expression of Basic Proteins in *Leishmania infantum*. *Journal of Proteome Research* 9:3842–3853.
- Bruno, LT. (2014). Ethical and epidemiological dilemmas in the treatment of dogs for visceral leishmaniasis in Latin America. *Biomedica*. Jan-Mar;34(1):7-12.
- Cañavate C, Herrero M, Nieto J, Cruz I, Chicharro C, Aparicio P, Mulugeta A, Argaw D, Blackstock AJ, Alvar J, Bern C (2011) Evaluation of Two rK39 Dipstick Tests, Direct Agglutination Test, and Indirect Fluorescent Antibody Test for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in a New Epidemic Site in Highland Ethiopia. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 84(1):102–106
- Camussone, C., Gonzalez, V., Belluzo, M. S., Pujato, N., Ribone, M. E., Lagier, C. M., e Marcipar, I. S. (2009). Comparison of recombinant *Trypanosoma cruzi* peptide mixtures versus multiepitope chimeric proteins as sensitizing antigens for immunodiagnosis. *Clinical and Vaccine Immunology*: CVI 16, 899–905.
- Carvalho BM, Maximo M, Costa WA, Santana ALF, Costa SM, Rego TANC, Pereira DP, Rangel EF (2013) Leishmaniasis transmission in an ecotourism area: potential vectors in Ilha Grande, Rio de Janeiro State, Brazil. *Parasites & Vectors*, 6:325
- Centres for disease Control and prevention- parasites leishmaniasis (2012).
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J e Boelaert M (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature reviews. Microbiology* 5:873–882.
- Coler RN, Goto Y, Bogatzki L, Raman V, Reed SG (2007) Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral leishmaniasis by elicitation of CD4 + Tcells. *Infection and Immunity*, 75(9):4648–4654.
- Costa-Silva MF, Gomesb LI, Martins-Filhoa OA, Rodrigues-Silva R, Freire JM, Quaresmad PF, Pascoal-Xavier MA, Mendesf TAO, Serakides R, Zauli DAG et al (2014) Gene expression profile of cytokines and chemokines in skin lesions from Brazilian Indians with localized cutaneous leishmaniasis. *Molecular Immunology* 57:74– 85.
- Croft, S. L., e Olliaro, P. (2011). Leishmaniasis chemotherapy--challenges and opportunities. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 17, 1478–1483.
- Dantas-torres, F., e Brandão-Filho, S. P. (2006). Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco Geographical expansion of visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39, 352–356.
- Dawit G, Girma Z, Simenew K. (2013) A Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of Leishmaniasis. *J Bacteriol Parasitol* 4:166
- De Oliveira CI e Brodskyn CI. (2012) The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. *Front Immunol* 3:145

- Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 27, 305–318.
- Dourado, Z. F., Silva, H. D., e Silveira-, E. D. P. (2007). Panorama Histórico do Diagnóstico Laboratorial da Leishmaniose Visceral até o Surgimento dos Testes Imunocromatográficos (rK39). *Revista de Patologia Tropical* 36, 205–214.
- Drumond KO, Costa FAL. (2011) Forty years of visceral leishmaniasis in the State of Piauí: a review. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.* Fev;53(1):3-11.
- El-On, J. (2009). Current status and perspectives of the immunotherapy of leishmaniasis. *The Israel Medical Association journal* 11, 623–628.
- Evans KJ, Kedzierski L (2012) Development of Vaccines against Visceral Leishmaniasis. *Journal of Tropical Medicine*, Article ID 892817.
- Faria AR, de Castro Veloso L, Coura-Vital W, Reis AB, Damasceno LM, Gazzinelli RT, Andrade HM.(2015). Novel Recombinant Multiepitope Proteins for the Diagnosis of Asymptomatic *Leishmania infantum*-Infected Dogs. *PLoS Negl Trop Dis.* Jan 8;9(1):e3429
- Fernandes ACS, Soares DC, Saraiva EM, Meyerfernandes JR, Souto-Pradón T (2013) Different secreted phosphatase activities in *Leishmania amazonenses*. *FEMS Microbiology Letters* 340(2):117–128.
- Fernandes ACS, Soares DC, Saraiva EM, Meyerfernandes JR, Souto-Pradón T (2013) Different secreted phosphatase activities in *Leishmania amazonenses*. *FEMS Microbiology Letters* 340(2):117–128.
- Fonseca AM, Faria AR, Rodrigues FT, Nagem RA, Magalhães RD, Cunha JL, Bartholomeu DC, de Andrade HM. (2014). Evaluation of three recombinant *Leishmania infantum* antigens in human and canine visceral leishmaniasis diagnosis. *Acta Trop.* Sep;137:25-30
- Fraga DB, da Silva ED, Pacheco LV, Borja LS, de Oliveira IQ, Coura-Vital W, Monteiro GR, Oliveira GG, Jerônimo SM, Reis AB, Veras OS. (2014). A multicentric evaluation of the recombinant *Leishmania infantum* antigen-based immunochromatographic assay for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Parasit Vectors.* Mar 31;7:136
- Ghosh A, Labrecque S, Matlashewski G, (2001) Protection against *Leishmania donovani* infection by DNA vaccination: increased DNA vaccination efficiency through inhibiting the cellular p53 response. *Vaccine*, 19(23-24):3169–3178.
- Ghosh A, Zhang WW, Matlashewski G (2001) Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. *Vaccine*, 20(1-2):59–66.
- Giorgobiani E et al (2011) Epidemiologic aspects of an emerging focus of visceral leishmaniasis in Tbilisi, Georgia. *PLoS Negl Trop Dis* 5(12):e1415
- Gomes, Y. M., Paiva Cavalcanti, M., Lira, R. A., Abath, F. G. C., e Alves, L. C. (2008). Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Veterinary Journal (London, England : 1997)* 175, 45–52.
- Goto H e Lauletta Lindoso JA. (2012) Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am* 26:293–307.
- Goto Y, Howard RF, Bhatia A, Trigo J, Nakatani M, Netto EM, Reed SG (2009) Distinct antigen recognition pattern during zoonotic visceral leishmaniasis in humans and dogs. *Vet Parasitol*, 160(3-4):215–220.
- Henriquez FL, Campbell SA, Roberts CW, Mullen AB, Burchmore R, Carter KC (2010) Vaccination with recombinant *Leishmania*

- donovanigammaglutamylcysteine synthetase fusion protein protects against *L. donovani* infection. *Journal of Parasitology*, 96(5):929–936.
- Houghton, R. L., Benson, D. R., Reynolds, L., McNeill, P., Sleath, P., Lodes, M., Skeiky, Y. a, Badaro, R., Krettli, a U., e Reed, S. G. (2000). Multiepitope synthetic peptide and recombinant protein for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in patients with treated or untreated Chagas' disease. *The Journal of Infectious Diseases* 181, 325–330.
- Ikeda-Garcia FA et al. (2007) Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Vet. Parasitol.* 143:254–259.
- Jana, S., e Deb, J. K. (2005). Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67, 289–298.
- Kamhawi S (2006) Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol.* 22(9):439-45
- Kato, H., Gomez, E. a, Cáceres, A. G., Uezato, H., Mimori, T., e Hashiguchi, Y. (2010). Molecular epidemiology for vector research on leishmaniasis. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 7, 814–826.
- Kaye P, Scott P (2011) Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*, 9(8):604-15.
- Kaye P, Scott P (2011) Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*, 9(8):604-15.
- Kaye PM, Aebischer T (2011) Visceral leishmaniasis: immunology and prospects for a vaccine. *Clinical Microbiology and Infection*, 17:1462–1470.
- Kedzierski L (2011) Leishmaniasis. *Human vaccines* 7:11:1204-1214.
- Kedzierski L, (2010) “Leishmaniasis vaccine: where are we today?” *Journal of Global Infectious Diseases*, 2(2):177– 185
- Kuhls, K., Alam, M. Z., Cupolillo, E., Ferreira, G. E. M., Mauricio, I. L., Oddone, R., Feliciangeli, M. D., Wirth, T., Miles, M. a, e Schönián, G. (2011). Comparative microsatellite typing of new world *leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5, e1155.
- Lainson R (2010) The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Rev Pan-Amaz Saude*, 1(2):13-32.
- Leblois, R., Kuhls, K., François, O., Schönián, G., e Wirth, T. (2011). Guns, germs and dogs: On the origin of *Leishmania chagasi*. *Infection, genetics and evolution* : *Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 11, 1091–1095.
- Lukes, J., Mauricio, I. L., Schönián, G., Dujardin, J.-C., Soteriadou, K., Dedet, J.-P., Kuhls, K., Tintaya, K. W. Q., Jirků, M., Chocholová, E., et al. (2007). Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 9375–9380.
- Magalhães FB (2008) Identificação e avaliação de novos antígenos recombinantes para o diagnóstico da Leishmaniose visceral humana e canina. Tese de Doutorado.
- Marques-da-Silva EA, Coelho EAF, Gomes DC, Vilela MC, Masioli CZ, Tavares CA, Fernandes AP, Afonso LC, Rezende SA (2005) Intramuscular immunization with p36 (LACK) DNA vaccine induces IFN- γ production but

- does not protect BALB/c mice against *Leishmania chagasi* intravenous challenge. *Parasitology Research*, 98(1):67–74.
- McGwire BS, Satoskar AR. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment (Sir William Osler Medicine Master Class). *Q J Med*.2014;107:7–14.
- Melby PC, Yang J, Zhao W, Perez LE, Cheng J (2001) *Leishmania donovani* p36 (LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity*, 69(8):4719–4725.
- Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G. (2008). Canine leishmaniosis- new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol.*24(8):371-377.
- Modabber F (2010) Leishmaniasis vaccines: past, present and future, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(1):S58–S61.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG (2005) Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366:1561–1577.
- Nascimento, MB (2014) Mapeamento de motivos antigênicos e caracterização de novas proteínas de *L. infantum* com potencial para uso diagnóstico contra a Leishmaniose Visceral. Tese de Doutorado.
- Neves, D. P. (2011). *Parasitologia Humana* 12th ed. (Atheneu).
- Nozzi M, Del Torto M, Chiarelli F, Breda L. (2014). Leishmaniasis and autoimmune diseases in pediatric age. *Cell Immunol*. Nov-Dec;292(1-2):9-13.
- Oliveira GGS, Magalhães FB, Teixeira MC, Pereira AM, Pinheiro CGM, Santos LR, Nascimento MB, Bedor CNG, Albuquerque AL, dos-Santos WLC, et al. (2011) Characterization of novel *Leishmania infantum* recombinant proteins encoded by genes from five families with distinct capacities for serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85:1025–1034.
- P. Bhattachary, N. Ali, (2013) Involvement and interactions of different immune cells and their cytokines in human visceral leishmaniasis
- Paul, DR; (2014). Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clinical Epidemiology* 147-154
- Paraguassu-chaves, C. (2001). *Geografia Médica ou da Saúde - Espaço e Doença na Amazônia Ocidental* 1° ed. (Porto Velho).
- Pessôa, S. B., e Martins, A. V. (1982). *Parasitologia Médica* 11° ed. (Guanabara Kooban).
- Piscopo, T. V., e Mallia Azzopardi, C. (2007). Leishmaniasis. *Postgraduate Medical Journal* 83, 649–657.
- Quinnell RJ, Carson C, Reithinger R, Garcez LM, Courtenay O. (2013). Evaluation of rK39 rapid diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis: longitudinal study and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*.7(1):e1992.
- Ramiro MJ, Zárate JJ, Hanke T, Rodriguez D, Rodriguez JR, Esteban M, Lucientes J, Castillo JA, Larraga V (2003) Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous primeboost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine*, 21(19-20):2474–2484.
- Ramos I, Alonso A, Marcen JM, Peris A, Castillo JA, Colmenares M, Larraga V (2008) Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response. *Vaccine*, 26(3):333–344.

- Ready PD. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annu Rev Entomol.* 2013;58:227–250.
- Rosano, G. L., and Ceccarelli, E. a (2009). Rare codon content affects the solubility of recombinant proteins in a codon bias-adjusted *Escherichia coli* strain. *Microbial Cell Factories* 8, 41.
- Rougeron V, Meeûs T, Ouraga SK, Hide M, Bañuls AL (2010) “Everything You Always Wanted to Know about Sex (but Were Afraid to Ask)” in *Leishmania* after Two Decades of Laboratory and Field Analyses. *PLoS Pathogens* 6(8)
- Saridomichelakis MN (2009) Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications *Vet Dermatol.* 20(5-6):471-89.
- Schmidt, G., Roberts, L., e Janovy, Lj. (2009). *Foundations of Parasitology*. 8th ed.
- Schönian, G., Kuhls, K., e Mauricio, I. L. (2011). Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitology* 138, 405–425.
- Sharma, U., e Singh, S. (2008). Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *Journal of Vector Borne Diseases* 45, 255–272.
- Singh, R. K., Pandey, H. P., e Sundar, S. (2006). Visceral leishmaniasis (kala-azar): challenges ahead. *The Indian Journal of Medical Research* 123, 331–344.
- Sorensen, H. P., e Mortensen, K. K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 115, 113–128.
- Srividya G, Kulshrestha A, Singh R, Salotra P (2012) Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. *Parasitology research*, 110(3):1065–78.
- Stanley, A., e Enqwerda, C. (2007). Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunology and Cell Biology* 85, 138–147.
- Streit JA, Recker TJ, Donelson JE, Wilson ME (2000) BCG expressing LCR1 of *Leishmania chagasi* induces protective immunity in susceptible mice. *Experimental Parasitology*, 94(1):33–41.
- Sundar, S, Srivastava, P., Dayama, A., Mehrotra, S., e. (2011). Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 105, 1–6.
- Tavares, DHC; (2012). Desenvolvimento de Proteínas Quiméricas de *Leishmania chagasi* Utilizando Regiões Antigênicas de Proteínas Recombinantes Previamente Seleccionadas. Dissertação de Mestrado
- Trigo J, Abbehusen M, Netto EMI, Nakatani M, Pedral-Sampaio G, de Jesus RS, Goto Y, Guderian J, Howard RF, Reed SG (2010) Treatment of canine visceral leishmaniasis by the vaccine Leish-111f + MPL-SE. *Vaccine*, 28(19): 3333–3340.
- Tsigankov P, Gherardini PF, Helmer-Citterich M, Spä GF, Zilberstein D (2013) Phosphoproteomic Analysis of Differentiating *Leishmania* Parasites Reveals a Unique Stage-Specific Phosphorylation Motif. *J. Proteome Res.*
- Tuon FF, Amato Neto V, Amato VS (2008) *Leishmania*: origin, evolution and future since the Precambrian. *FEMS Immunol Med Microbiol* 54:158–166.
- WHO (2013) Post-kala-azar dermal leishmaniasis: a manual for case management and control: report of a WHO consultative meeting, Kolkata, India, 2–3 July 2012.

9. Curriculum Lattes atualizado (período de vínculo ao programa)

Atividades Científicas

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

Resumo em Congresso Internacional

NASCIMENTO, M. B. ; **SANTOS, W. J. T.** ; CASTRO NETO, A. L. ; DHALIA, R. ; OLIVEIRA, G. G. S. ; CARVALHO, L. P. ; MAGALHAES, F. B. ; MELO NETO, O. P. . Evaluation of the antigenicity of repetitive domains of two novel *Leishmania infantum* proteins. In: XXX REUNIÃO ANUAL DA SBPz e XLI REUNIÃO ANUAL DA PESQUISA BÁSICA EM DOENÇA DE CHAGAS, 2014, Caxambu. XXX REUNIÃO ANUAL DA SBPz e XLI REUNIÃO ANUAL DA PESQUISA BÁSICA EM DOENÇA DE CHAGAS, 2014.

Resumo em congressos Nacionais

SANTOS, W. J. T. ; MELO NETO, O. P. ; MAGALHAES, F. B. ; NASCIMENTO, M. B. . PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS COM POTENCIAL EQUIVALENTE PARA DIAGNÓSTICO DAS FORMAS HUMANA E CANINA DA LEISHMANIOSE VISCERAL. In: III Jornada de Pós Graduação em Genética, 2013, Recife. III Jornada de Pós Graduação em Genética, 2013.

SANTOS, W. J. T. ; MELO NETO, O. P. ; MAGALHAES, F. B. ; NASCIMENTO, M. B. . PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS COM POTENCIAL EQUIVALENTE PARA DIAGNÓSTICO DAS FORMAS HUMANA E CANINA DA LEISHMANIOSE VISCERAL. In: 22ª Reunião Anual de Iniciação Científica, 2014, Recife. 22ª Reunião Anual de Iniciação Científica, 2014.

SANTOS, W. J. T. ; MELO NETO, O. P. ; MAGALHAES, F. B. ; NASCIMENTO, M. B. . PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS COM POTENCIAL EQUIVALENTE PARA DIAGNÓSTICO DAS FORMAS HUMANA E CANINA DA LEISHMANIOSE VISCERAL. In: II Jornada Científica da Fiocruz, 2014, Recife. II Jornada Científica da Fiocruz, 2014.

Apresentação de Palestras

Palestra Intitulada "Biologia Molecular suas técnicas e aplicações" proferida na Faculdade ASCES em Agosto de 2013.

Palestra intitulada "Impacto do envolvimento com a pesquisa na formação e desenvolvimento profissional" proferida na Faculdade ASCES em Novembro de 2014.