

ANNA CLÁUDIA ALVES DE SOUZA

**APRIMORAMENTO DO DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA POR ELISA USANDO O ANTÍGENO NTPDase-2 DE *Leishmania*
(*Leishmania*) *infantum chagasi* E PADRONIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO POR
IMUNOCROMATOGRÁFIA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica Aplicada, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S729a
2016
Souza, Anna Cláudia Alves de, 1990-
 Aprimoramento do diagnóstico de Leishmaniose visceral
 canina por Elisa usando o antígeno NTPDase-2 de Leishmania
 (Leishmania) infantum chagasi e padronização do diagnóstico
 por imunocromatografia / Anna Cláudia Alves de Souza. –
 Viçosa, MG, 2016.

vi,113f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Juliana Lopes Rangel Fietto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Imunologia veterinária. 2. Leishmaniose visceral. 3. Cão
- Doenças - Diagnóstico. 4. Proteínas recombinantes.
5. NTPDase. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de
Pós-graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22. ed. 636.0896079

ANNA CLÁUDIA ALVES DE SOUZA

**APRIMORAMENTO DO DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA POR ELISA USANDO O ANTÍGENO NTPDase-2 DE *Leishmania*
(*Leishmania*) *infantum chagasi* E PADRONIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO POR
IMUNOCROMATOGRÁFIA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós- Graduação em
Bioquímica Aplicada, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

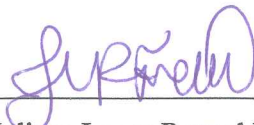
APROVADA: 23 de Fevereiro de 2016.



Leandro Licursi de Oliveira



Yaro Lucio dos Santos



Juliana Lopes Rangel Fietto
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por Sua constante presença em minha vida e pelas infinitas bênçãos que recebi;

Aos meus pais, José Aldon Alves de Souza e Gicelda Aparecida Oliveira Souza, meus grandes incentivadores, agradeço pelo amor, apoio, educação e exemplos de vida;

Ao meu irmão, Thiago Oliveira de Souza, pela amizade, carinho e, sobretudo, pelo companheirismo;

Ao meu namorado, Greyson Capobiango Evangelista, pelo amor, carinho, compreensão e dedicação;

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, por me fornecer as ferramentas adequadas para o meu aprendizado e crescimento profissional;

À minha Orientadora, Professora Juliana Lopes Rangel Fietto, pela confiança e pelo exemplo de dedicação e competência, por ser uma grande incentivadora;

Aos amigos do Laboratório LIMA, por tornarem os dias de trabalho mais prazerosos. Em especial, ao Yaro e à Isabela, pelo auxílio e pelo companheirismo;

Aos funcionários do Biagro, em especial, ao Sr. Valdir pela simpatia e por sua disposição em ajudar;

Aos membros da banca, pela disposição de participar deste trabalho;

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho, minha sincera gratidão.

SUMÁRIO

RESUMO	V
ABSTRACT	VI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 LEISHMANIOSE	4
2.2 LEISHMANIOSE CANINA	8
2.3 DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE CANINA	10
2.3.1 TESTES PARASITOLÓGICOS	11
2.3.2 MÉTODO DE DETECÇÃO DO DNA DO PARASITO	12
2.3.3 IMUNODIAGNÓSTICO	13
2.4 ECTO-NUCLEOSÍDIO TRIFOSFATO DIFOSFOHIDROLASE	17
3. OBJETIVO GERAL	24
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4. METODOLOGIA	25
4.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	25
4.1.1 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	25
4.1.2 PRÉ-PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	25
4.1.3 PURIFICAÇÃO MANUAL	26
4.1.4 PURIFICAÇÃO AUTOMATIZADA (FPLC)	27
4.2 RENATURAÇÃO PROTEICA	28
4.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA	28
4.4 ENSAIO IMUNOADSORVENTE LIGADO À ENZIMA INDIRETO (ELISA)	29

4.5 CONJUGAÇÃO DE PROTEÍNA A E ANTI-IGG DE CÃO COM OURO COLOIDAL	30
4.6 DOT BLOT	31
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 PADRONIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC) POR ELISA USANDO A PROTEÍNA RECOMBINANTE NTPDASE-2 DE <i>LEISHMANIA INFANTUM CHAGASI</i>	33
5.1.1 PURIFICAÇÃO EM SISTEMA MANUAL (<i>BATCH</i>) E AUTOMATIZADO (FPLC)	33
5.1.2 VERIFICAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA CONFORMAÇÃO DO ANTÍGENO NO DIAGNÓSTICO POR ELISA	40
5.1.3 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS ANTÍGENOS PRODUZIDOS PARA USO NO IMUNODIAGNÓSTICO POR ELISA	43
5.1.4 COMPARAÇÃO ENTRE AS PURIFICAÇÕES QUANTO AO GRAU DE PUREZA	45
5.1.5 ESTABILIDADE DA PROTEÍNA NTPDASE-2 PURIFICADA	80
5.2 PADRONIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC) POR IMUNOCROMATOGRAFIA USANDO O ANTÍGENO NTPDASE-2 DE <i>LEISHMANIA INFANTUM CHAGASI</i>	85
5.2.1 CONJUGAÇÃO DA PROTEÍNA A E ANTI-IGG DE CÃO COM OURO COLOIDAL 40 NM	85
5.2.2 PADRONIZAÇÃO DA LINHA CONTROLE DA IMUNOCROMATOGRAFIA	86
5.2.3 PADRONIZAÇÃO DA LINHA TESTE DA IMUNOCROMATOGRAFIA	95
6. CONCLUSÃO	102
7. REFERÊNCIAS	104

RESUMO

SOUZA, Anna Cláudia Alves de, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2016. **Aprimoramento do Diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina por ELISA Usando o Antígeno NTPDase-2 de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e Padronização do Diagnóstico Por Imunocromatografia.** Orientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto. Coorientadores: Abelardo Silva Júnior, Gustavo Costa Bressan e Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo.

A leishmaniose visceral canina (LVC), causada pela *Leishmania infantum chagasi* é foco de diversos estudos, devido à relevância do cão como reservatório. No Brasil, a eutanásia de cães infectados é usada como controle da doença, orientada pelas técnicas de RIFI e ELISA. Porém estas técnicas apresentam limitações, que justificam o aprimoramento do diagnóstico. Em um trabalho prévio do nosso grupo, a proteína recombinante NTPDase-2 de *L. infantum chagasi* foi usada como antígeno em ensaios de ELISA, mostrando bom potencial para esta aplicação. O objetivo deste trabalho foi aprimorar o diagnóstico por ELISA. Para isto, foi feita a purificação manual e automatizada (FPLC). As purificações manuais forneceram maior grau de pureza e o processo em FPLC forneceu maior rendimento. Assim, várias purificações foram testadas, a fim de obter alto grau de pureza em sistema automatizado. Novos ELISAs foram realizados usando diferentes quantidades de antígeno (0,1 – 0,5 µg), diferentes diluições do soro de cães positivos e negativos (1:40; 1:80 e 1:160) e diferentes substratos de desenvolvimento de cor (TMB e OPD) para revelação. A influência da conformação do antígeno foi avaliada usando-o em condição nativa ou desnaturada. Na padronização do ELISA, 0,1 µg de antígeno e diluição do soro 1:160 foram as melhores condições. O uso de TMB e OPD não geraram diferenças significativas. Além disto, o antígeno renaturado também não levou à diferença significativa, indicando que o reconhecimento antígeno x anticorpo independente da conformação do antígeno. Quanto às purificações em FPLC, a melhor foi obtida usando 0,5 pellet bacteriano referente a 400 mL de indução, que forneceu grau de pureza de 96,6%. Além disso, foram feitos testes preliminares para a padronização deste antígeno em testes imunocromatográficos. Foram padronizadas as conjugações da Proteína A e anti-IgG de cão a ouro coloidal de 40 nm. Para a linha controle, foi padronizada a concentração 2,5 µg/µL de IgG de cão na membrana de nitrocelulose e diluição do conjugado de 5x. Nossos dados confirmam que a NTPDase-2 tem potencial para o diagnóstico da LVC e que é possível melhorar os níveis de detecção de anticorpos variando as condições do ensaio. Além disto, foi possível iniciar a padronização de um teste imunocromatográfico que poderá futuramente trazer nova alternativa para o diagnóstico da LVC.

ABSTRACT

SOUZA, Anna Cláudia Alves de, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2016. **Improvement of Diagnosis Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) by ELISA using antigen NTPDase-2 of *Leishmania infantum chagasi* and Diagnostic Standards for Immunochromatography.** Adviser: Juliana Lopes Rangel Fietto. Co-advisers: Abelardo Silva Júnior, Gustavo Costa Bressan and Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo.

Canine visceral leishmaniasis (CVL), caused by *Leishmania infantum chagasi* is focus of many studies because the relevance of the dog as reservoir. In Brazil, euthanasia of infected dogs is used as the control the disease, and the diagnosis is guided by ELISA and IFA techniques. However, these techniques are limited, justifying the improvements of diagnosis. In a previous study from our research group, NTPDase-2 recombinant protein of *L. infantum chagasi* was used as antigen in ELISA assays, showing potential for this application. The objective of this study was improve the diagnosis by ELISA. For this purpose, manual and automated (FPLC) purification were performed. The manual purification offered higher purity and the process in FPLC provided higher yield. Thus, several purifications were tested, in order to obtain high level of purity in FPLC. New ELISAs were performed varying the antigen amounts (0.1 to 0.5 µg), dilutions of the serum of positive and negative dogs (1:40, 1:80 and 1: 160) and substrates system OPD and TMB. To evaluate the influence of antigen conformation, native or denatured condition were tested. The standardization of the ELISA, shown best results when 0.1 µg antigen and serum dilution 1: 160 were used. TMB and OPD did not shown significant differences. Furthermore, the refolded protein was not more effective than the denatured protein, indicating that recognition of the antigen: antibody is preferably not dependent of antigen conformation. The purification on FPLC, the better was obtained using 0.5 bacterial pellet was related to the 400 ml of induction, which provided a high purity (96.6%). In addition, preliminary tests to standardize immunochromatographic test were made using the dot blot. Conjugations of Protein A and anti-dog IgG to colloidal gold 40 nm were standardized. For the control line has been standardized concentration 2.5 µg/µl of dog IgG on the nitrocellulose membrane and conjugate dilution 5 times. Our data confirm that NTPDase-2 antigen has potential to be used on the diagnosis of CVL and it is possible to improve the detection of antibodies levels, varying the conditions of the assay. Furthermore, it was possible to start the standardization of immunochromatographic test, which can eventually bring new alternative for the diagnosis of CVL.

1. Introdução

Leishmanioses compreendem um conjunto de enfermidades causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, e possuem amplo espectro de manifestações clínicas, desde lesões cutâneas simples até infecções sistêmicas fatais.

Estes parasitos possuem um ciclo de vida heteróxico, transitando entre o vetor invertebrado flebotomíneo e um hospedeiro mamífero. As formas flageladas e móveis de *Leishmania spp.* são chamadas promastigotas e são encontradas no inseto vetor flebotomíneo, onde diferenciam até a forma infecciosa, metacíclica. Estas podem ser transmitidas para hospedeiros mamíferos através da picada do flebotomíneo fêmea. A forma metacíclica infecta células fagocíticas e diferencia-se para forma amastigota, as quais vivem como parasitos intracelulares principalmente em macrófagos em diferentes órgãos, tais como o baço, nódulos linfáticos, medula óssea e fígado. Um flebotomíneo não infectado se contamina ao fazer o repasto sanguíneo ingerindo macrófagos infectados. As formas amastigotas diferenciam-se em promastigotas no hospedeiro invertebrado, podendo ser inoculados novamente em um novo hospedeiro vertebrado.

Leishmania chagasi é hoje considerada espécie sinônima de *L. infantum*, e será citada neste trabalho como *L. infantum chagasi*, a fim de discriminar esta espécie causadora de leishmaniose visceral no Novo Mundo de *L. infantum*, principal agente etiológico do Velho Mundo.

A Organização Mundial de Saúde estima a ocorrência de cerca de 0,2 a 0,4 milhão de casos de leishmaniose visceral (LV) e 0,7 a 1,2 milhão de casos de leishmaniose cutânea (LC) por ano, sendo presente em 98 países. Mais de 90% dos casos mundiais de Leishmaniose Visceral ocorrem em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil.

O cão é considerado um importante reservatório do parasito e dada sua importância como animal doméstico, constitui o principal elo para a transmissão da LV em áreas urbanas. No Brasil, parte da estratégia de controle da leishmaniose visceral é baseada na prática da eutanásia de animais soropositivos. No entanto, este sacrifício em massa não se comprovou eficaz no controle da doença, devido a atrasos entre a sorologia e a eutanásia e à baixa sensibilidade dos testes sorológicos para detectar os animais infectados assintomáticos.

O teste de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) são os testes de diagnóstico recomendados pelo Ministério da Saúde, e se baseiam na detecção de anticorpos séricos específicos (IgG). A técnica RIFI utiliza o parasito íntegro como antígeno, e o título do anticorpo é revelado pelo uso de anticorpos conjugados às moléculas fluorescentes. No Brasil é considerado soropositivo o cão com título 1:40. No ELISA, o soro diluído é colocado em microplacas revestidas com antígeno de *Leishmania*, sendo o resultado expresso pela quantificação por espectroscopia de uma reação colorimétrica, podem ser usados diferentes antígenos, que definem a especificidade e sensibilidade da técnica. No entanto, essas técnicas usam parasitos mortos fixados ou mistura de antígenos complexa, advindos de formas não infecciosas de *Leishmania*, fazendo com que estas técnicas apresentem importantes limitações de especificidade e sensibilidade, que justificam a necessidade de desenvolvimento e aprimoramento do diagnóstico.

Outra alternativa de diagnóstico são os testes imunocromatográficos, esses são rápidos, fáceis de utilizar e interpretar, estáveis em temperaturas variáveis e apresentam baixo custo. Desta forma são considerados ideais para o rastreio de um grande número de amostras em programas de controle epidemiológicos, onde possibilitariam a redução nos atrasos entre a sorologia e a eutanásia, fator fundamental para aumentar a eficácia da estratégia baseada na eutanásia de cães infectados. Alguns testes de diagnóstico para leishmaniose baseados em imunocromatografia já estão disponíveis comercialmente, no entanto, eles não possuem sensibilidade e especificidade adequadas para uso em larga escala, sendo necessário o desenvolvimento de novos testes imunocromatográficos mais sensíveis e específicos, que possam ser usados em programas de controle epidemiológicos.

As E-NTPDases são enzimas, que hidrolisam nucleotídeos extracelulares. Diversos patógenos apresentam atividade ectonucleotidásica em sua superfície, entre eles estão os parasitos do gênero *Leishmania*. Trabalhos recentes tem sugerido uma correlação entre a capacidade de hidrólise de nucleotídeos extracelulares e processos de virulência, adesão celular e sobrevivência intracelular em tripanosomatídeos.

Os nucleotídeos extracelulares são moléculas sinalizadoras em diversos eventos, incluindo a regulação da resposta imune de mamíferos, atuando sobre receptores purinérgicos e pirimidinérgicos. Esses nucleotídeos extracelulares podem ser hidrolisados por ectonucleotidases dos parasitos, o que pode interferir na modulação da

resposta imune do hospedeiro, uma vez que a concentração de nucleotídeos e seus derivados no micro-ambiente de interação parasito-célula hospedeira influenciam as respostas dependentes de ATP, ADP e adenosina, tais como agregação plaquetária dependente de ADP e resposta inflamatória dependente de ATP.

Nosso grupo de pesquisa avaliou a aplicabilidade de uma E-NTPDase de *L. infantum chagasi* (E-NTPDase-2) como antígeno em imunodiagnóstico por ELISA e encontraram altos valores de sensibilidade (100%) e especificidade (99%) para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em soroteca padronizada. No entanto, o aumento do número de amostras testadas levou à diminuição da sensibilidade, o que justifica o aprimoramento do diagnóstico.

O presente estudo tem por objetivo a expressão e purificação da proteína E-NTPDase-2 de *Leishmania infantum chagasi* e aprimoramento do seu uso como antígeno no diagnóstico para leishmaniose visceral canina por ELISA e uso do dot blot para padronização das etapas iniciais da imunocromatografia de fluxo lateral.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Leishmaniose

Protozoários do gênero *Leishmania* são parasitas intracelulares obrigatórios que infectam principalmente macrófagos de mamíferos, e são os agentes causadores de um amplo espectro de doenças, coletivamente conhecidas como Leishmanioses. Estas doenças têm características clínicas distintas que vão desde lesões cutâneas autocuráveis até infecção sistêmica fatal (Kedzierski, 2010; Pace, 2014; Gradoni, 2015). Este grupo de infecções é a segunda em mortalidade entre as doenças parasitárias, ficando atrás apenas da malária, e em termos de anos de vida perdidos por incapacidade (Disability Adjusted Life of Years – DALY) é a terceira causa mais comum de morbidade, após a malária e a esquistossomose, sendo que crianças com menos de 15 anos sofrem a maior parte da carga da doença (Savoia, 2015).

Estes parasitos mantêm seu ciclo de vida transitando entre o vetor invertebrado flebotomíneo e um hospedeiro mamífero (Figura 1). A ingestão de células infectadas, durante o repasto sanguíneo, infecta o flebotomíneo. A forma amastigota presente no sangue do hospedeiro é transferida para o intestino médio do flebotomíneo, onde se diferenciam na forma promastigotas pró-cíclicas (etapas 1 e 2 - Figura 1) (Harhay et al., 2011). A forma promastigota pró-cíclica de *Leishmania spp.* é flagelada e móvel e progride através de várias formas distintas de diferenciação morfológica, até chegar à forma infecciosa, metacíclica, que migra para a válvula faríngea do flebotomíneo (etapas 3 e 4 – figura 1). Esta forma infecciosa pode ser transmitida pela picada do flebotomíneo fêmea ao realizar, novamente, o repasto sanguíneo. As formas promastigotas metacíclicas infectam células do sistema fagocítico mononuclear e se diferenciam em formas arredondadas denominadas amastigotas (etapa 5 – figura 1). Amastigotas não possuem flagelo e vivem como parasitos intracelulares obrigatórios em uma variedade de células de mamíferos, principalmente dentro de fagócitos profissionais, em diversos órgãos, entre eles o baço, os nódulos linfáticos, medula óssea e fígado (Harhay et al., 2011, Kaye et al., 2011 e Palatnik-de-Sousa et al., 2011). Amastigotas desenvolvem-se e multiplicam-se dentro do fagócito, até que são liberados por lise celular, podendo infectar outros macrófagos (etapas 6, 7 e 8 – Figura 1) (Pace, 2014).

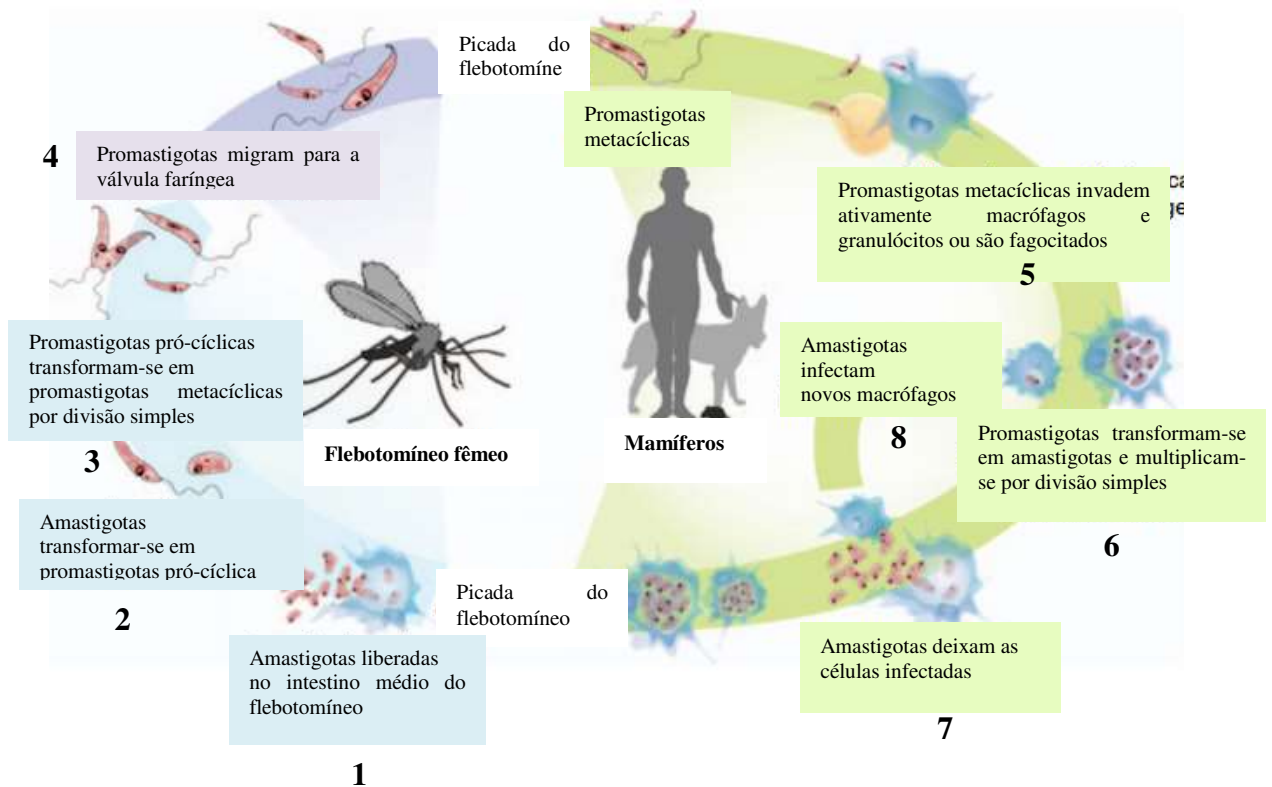


Figura 1: Ciclo de vida de *Leishmania*. Durante o repasto sanguíneo, as células infectadas do hospedeiro mamífero, infectam o flebotomíneo (Etapa 1). No flebotomíneos, as amastigotas transformam-se em promastigotas pró-cíclicas, que se desenvolvem no intestino médio do vetor e migram para a probóscide, onde são injetados por fêmeas nos hospedeiros mamíferos durante uma refeição de sangue (etapa 2, 3 e 4). No local da picada, as promastigotas são fagocitadas por macrófagos e outros tipos de células fagocíticas (etapa 5). As promastigotas, em seguida, transformam-se dentro destas células em amastigotas, se multiplicam por divisão simples e avançam para infectar outras células mononucleares fagocíticas (etapas 6, 7 e 8). Fatores relacionados com as espécies do parasito e a resposta imune do hospedeiro determinam se a infecção se tornará sintomática e se a doença irá se manifestar como leishmaniose cutânea ou visceral. Fonte: Adaptado de Harhay et al., 2011.

As leishmanioses são classificadas de acordo com as manifestações clínicas em leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose muco-cutânea (LM), leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose dérmica pós calazar (PKDL) (Pace, 2014). A LC pode ser assintomática ou apresentar lesões cutâneas cuja aparência e extensão dependem da espécie de *Leishmania* envolvida, de fatores genéticos e resposta imune do hospedeiro (Harhay et al., 2011). As lesões ocorrem, geralmente, em áreas expostas e acessíveis ao flebotomíneo, como rosto, pescoços e membros. LC manifesta-se inicialmente como

pápula indolor e progride para úlcera, que pode estar associada com linfadenite ou linfadenopatia (Aara et al., 2013; Blanco et al., 2013). Além disso, as lesões cutâneas podem disseminar e manifestar como múltiplas lesões não-ulceradas ou infiltradas, que podem ser muito extensas e de gravidade variável (leishmaniose cutânea difusa - LCD) (Paniz et al., 2013).

A LM caracteriza-se pela disseminação linfática ou hematogênica do parasito *Leishmania* a partir de lesões cutâneas, pode ocorrer concomitante com a LC ou tardiamente, e podem resultar na infecção da mucosa do trato respiratório superior e da via oral (Kedzierski, 2011; Pace, 2014). Manifesta-se como nódulos e infiltrados da cartilagem nasal, levando ao bloqueio das narinas, destruição do septo nasal e colapso nasal (Guerra et al., 2011; Pace, 2014). A boca, faringe e o lábio superior podem estar envolvidos, resultando na destruição tecidual e desfiguração (Amato et al., 2009). A LV é potencialmente letal em humanos se não tratada (Palatnik-de-Sousa et al., 2011). Os sintomas incluem mal-estar, febre, anemia, perda de peso, distensão abdominal e fraqueza. A disseminação do parasito induz o acúmulo de células fagocíticas mononucleares dentro dos órgãos infectados e hiperplasia secundária das células reticuloendoteliais, que se manifestam clinicamente como hepatoesplenomegalia, palidez e progressiva supressão da resposta imune celular (Palatnik-de-Sousa et al., 2011; Pace, 2014). A PKDL pode ocorrer após meses ou anos do tratamento da LV, durante o tratamento da LV ou mesmo na ausência de qualquer evidência de visceralização e se manifesta como uma erupção cutânea na face, tronco e membros, cuja severidade é variável. PKDL ocorre como resultado da reação imunológica contra o parasito *Leishmania*, que são persistentes no interior da pele e proporciona um reservatório para a transmissão da doença (Pace, 2014).

As manifestações clínicas da doença são dependentes tanto das espécies do parasito quanto da resposta imune do hospedeiro (Harhay et al., 2011; Kaye et al., 2011; Pace, 2014). No Velho Mundo, as três principais espécies que causam LC são *Leishmania tropica*, *Leishmania major* e *Leishmania aethiopica*. LV é causada por *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* (Hajjarian et al., 2013 e Kaye et al., 2011). No Novo Mundo, as espécies *L. infantum chagasi*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania pifanol* e *Leishmania amazonensis* causam LC e a espécie *L. infantum chagasi* causa LV (Kaye et al., 2011). *L. infantum* é sinônimo de *L. chagasi* na América Central e América do Sul, sendo denominado *L. infantum chagasi* (Solano-Gallego et al., 2009).

A tabela 1 correlaciona os tipos de leishmaniose e as principais espécies de *Leishmania* associada.

Tabela 1: Principais espécies de *Leishmania* patogênicas para humanos. Fonte: Adaptado de Kaye et al., 2011.

Principais manifestações clínicas	Espécies
Velho Mundo, subgênero <i>Leishmania</i>	
Leishmaniose Visceral	<i>L. donovani</i> e <i>L. infantum</i>
Leishmaniose Cutânea	<i>L. major</i> , <i>L. tropica</i> e <i>L. aethiopica</i>
Leishmaniose Cutânea Difusa	<i>L. aethiopica</i>
Novo Mundo, subgênero <i>Leishmania</i>	
Leishmaniose Visceral	<i>L. infantum chagasi</i>
Leishmaniose Cutânea	<i>L. infantum chagasi</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>L. pifanol</i> e <i>L. amazonensis</i>
Leishmaniose Cutânea Difusa	<i>L. mexicana</i> e <i>L. amazonensis</i>
Novo Mundo, subgênero <i>Viannia</i>	
Leishmaniose Cutânea	<i>L.eishmania braziliensis</i> , <i>Leishmania guyanensis</i> , <i>Leishmania panamensis</i> e <i>L.eishmania peruviana</i>
Leishmaniose Cutâneo-Mucosa	<i>L. braziliensis</i> e <i>L. panamensis</i>

A resposta imune contra este parasito é mediada tanto pela imunidade inata (macrófagos e neutrófilos) quanto pela imunidade adaptativa (células B, células T e células dendríticas) (Kedzierski, 2011). Um dos maiores desafios enfrentados pelas formas promastigotas metacíclicas depois que entram no hospedeiro mamífero é se estabelecer intracelularmente em macrófagos sem acionar suas defesas antimicrobianas inatas, o que é facilitado pelos neutrófilos, que englobam as promastigotas em vacúolos não leishmanicidas. Quando estes neutrófilos morrem, os parasitos são liberados e podem ser pré-condicionados para a sobrevivência em outras células mielóides (Kaye et al., 2011).

Alvar et al. (2012) estimam a ocorrência de cerca de 0,2 a 0,4 milhão de casos de LV e 0,7 a 1,2 milhão de casos de LC por ano, afetando 98 países. Com taxa de

letalidade geral de 10% para LV, chega-se a uma estimativa preliminar de 20.000 a 40.000 mortes por leishmaniose por ano. Mais de 90% dos casos mundiais de Leishmaniose Visceral ocorrem em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil; já a leishmaniose cutânea é mais amplamente distribuída, com cerca de um terço dos casos ocorrendo em cada uma das três regiões epidemiológicas: Américas, a bacia do Mediterrâneo e do Oriente Médio até a Ásia Central (Alvar et al., 2012; Kedzierski, 2011). A grande maioria dos casos (90%) ocorre no Afeganistão, Oriente Médio e América do Sul (Kedzierski, 2011). Em 2012, 96,5% dos casos de LV reportados na América Latina ocorreram no Brasil (PAHO/WHO, 2014). Ainda assim, a carga parasitária da doença é subestimada devido à falta de notificação pelos serviços vigilância epidemiológica e falta de métodos de diagnóstico adequados (Pace, 2014).

Publicações recentes relatam uma expansão da Leishmaniose Visceral para áreas que antes eram consideradas como não endêmicas, tais como Europa e América do Norte (Petersen et al., 2009 e Ready, 2010). Esta expansão está relacionada a vários fatores, tais como mudança climática, desmatamento das florestas tropicais, mudança no uso da terra, urbanização, crescimento da população humana e migração, expansão geográfica do vetor e fragmentação do seu habitat, movimentação de animais e a perda de biodiversidade (Kedzierski, 2011; Colwell et al., 2011).

As leishmanioses são doenças dinâmicas e as circunstâncias de transmissão são continuamente variáveis de acordo com mudanças do meio ambiente, tais como aquecimento global, desmatamento e urbanização e os efeitos de tais alterações em espécies selvagens, fatores demográficos e fatores comportamentais humanos (Gramiccia, 2011 e Palatnik-de-Sousa et al., 2011). Certamente, as medidas de controle não têm sido suficientes para impedir a propagação da leishmaniose visceral e mudanças globais estão acelerando este processo. O impacto real dessas mudanças globais sobre a epidemiologia das leishmanioses pode ser imprevisível (Colwell et al., 2011).

2.2 Leishmaniose Canina

Animais são infectados por diferentes espécies de *Leishmania*, mas os cães são considerados os principais reservatórios de *L. infantum chagasi*, uma vez que a infecção por este parasito é frequente na população canina, sendo de longa duração e muitas

vezes assintomática e apresentam alta carga parasitária na pele e no sangue, que aumenta a possibilidade de transmissão. Além disso, os cães possuem uma estreita relação com os seres humanos e os parasitos isolados dos cães são indistinguíveis dos parasitos de humanos. Os principais vetores alimentam-se frequentemente dos cães e são infecciosos para o vetor (Pinheiro et al., 2009; Quinnell et al., 2009; Gramiccia, 2011; Maia et al., 2011; Gradoni, 2015). A Leishmaniose canina é endêmica em mais de 70 países (Solano-Gallego et al., 2011).

Infecções em gatos e cavalos também são relatadas em áreas onde a leishmaniose visceral canina (LVC) é diagnosticada, mas nestes animais são menos frequentes (Gramiccia, 2011).

Além de representar um risco zoonótico para as populações humanas em áreas endêmicas, os cães podem sofrer de uma doença grave, caracterizada por uma vasta gama de sinais clínicos que se manifestam apenas alguns meses após a exposição à infecção (alterações na pele, perda de peso e linfadenomegalia generalizada) com risco de morte (Manzillo et al., 2013; Otranto et al., 2013).

Entretanto, a prevalência da infecção pode ser consideravelmente mais elevada do que a doença clínica aparente, em algumas áreas mais de 80% dos casos de leishmaniose canina são assintomáticos (Otranto et al., 2013; Gradoni, 2015). Os cães assintomáticos parecem controlar o parasito, no entanto, esta condição pode não ser estável, de modo que as doenças de imunossupressão ou intercorrentes podem permitir que as infecções latentes se tornem progressivas, mesmo após anos da exposição (Gradoni, 2015). Tanto os cães infectados quanto os doentes podem ser fontes de infecção para os vetores flebotomíneos, mas a infecciosidade é mais elevada em cães com sinais clínicos aparentes (Courtenay et al., 2014).

Entre as espécies de *Leishmania* que infectam cães, a mais importante é a *L. infantum chagasi* (Solano-Gallego et al., 2009). Há uma forte associação entre a espécie de vetor flebotomíneo e a espécie de *Leishmania* transmitida, devido à atividade de enzimas específicas e ligantes presentes no intestino do inseto que permitem apenas que a espécie específica permaneça ligada à parede intestinal e replique sem ser excretada pelo intestino (Volf et al., 2008).

A eutanásia dos cães infectados tem sido uma das principais intervenções implementadas para controlar a LV (Pinheiro et al., 2009; Peixoto et al., 2015). No

entanto, este sacrifício em massa não comprovou ser eficaz em programas de controle (por exemplo, no Brasil) (OMS 2010). Esta ineficácia tem sido atribuída a atrasos entre o resultado da sorologia e do abate e a baixa sensibilidade dos testes sorológicos para identificar os cães infectados. Além do sacrifício dos cães infectados, a OMS (2010) sugere como estratégias para o controle da leishmaniose o tratamento dos pacientes humanos e o uso de inseticidas para controle vetorial nas casas em áreas endêmicas. Por sua gravidade potencial em cães e sua natureza zoonótica, a prevenção desta infecção é não só desejável, mas também uma obrigação para a saúde humana e do cão (Otranto et al., 2013).

2.3 Diagnóstico de Leishmaniose Canina

Segundo o Ministério da Saúde (2014), o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é complexo, devido à ampla variedade de sinais clínicos semelhantes aos observados em outras doenças infecciosas, as alterações histopatológicas inespecíficas e a inexistência de um teste de diagnóstico 100% sensível e específico.

Os métodos para o diagnóstico da LVC compreendem os parasitológicos, os sorológicos e os moleculares, cada um apresenta seus pontos positivos, mas também possuem aspectos negativos. O diagnóstico preciso, muitas vezes, requer uma abordagem integrada composta por diagnóstico clínico-patológico e exames laboratoriais específicos (Solano-Gallego et al., 2009). Particularmente em relação aos métodos laboratoriais, a falta de um padrão-ouro para pacientes humanos ou animais é uma limitação para o controle da doença, uma vez que não é possível a obtenção de dados epidemiológicos precisos. Além disso, resultados falso-negativos contribuem para a manutenção dos reservatórios, e, como consequência, a manutenção dos ciclos parasitológicos em seu ambiente (De Paiva-Cavalcanti et al., 2015). No Brasil, o Ministério da Saúde (2014) classifica como positivo para LVC, o cão que apresentar manifestações clínicas compatíveis com a doença, cujo teste sorológico seja positivo ou cujo exame parasitológico seja positivo (Portaria Interministerial nº 1.426, 2008).

Testes de diagnósticos ideais devem ser fáceis de executar e interpretar, rápidos, sensíveis, específicos e capazes de determinar com exatidão a carga parasitária em hospedeiros e vetores (Talmi-Frank, 2010). Assim, é fundamental a escolha de um teste de diagnóstico preciso e reprodutível, capaz de dar suporte às estratégias de controle e

vigilância da LVC, evitando a transmissão da doença, pela redução de reservatórios do parasito, e o abate desnecessários de cães (Pilatti et al., 2009; Peixoto et al., 2015).

2.3.1 Testes Parasitológicos

Os exames microscópicos de esfregaços corados possuem alta especificidade, por possibilitarem a visualização do parasito, mas a sensibilidade é muito variável e são métodos invasivos (Faria et al., 2012). As formas amastigotas podem ser observadas em esfregaços de tecidos de nódulos linfáticos, medula óssea ou baço, corados com corantes de rotina, tais como Giemsa ou Wright, Leishman, Panóptico (Maia et al., 2008; Ministério da Saúde, 2014). Além disso, o Ministério da Saúde (2014) determina que uma lâmina deva ser examinada por pelo menos 200 campos antes de ser considerada como negativa (Ministério da Saúde, 2014). A sensibilidade deste método varia de 93,1 – 98,7% para o baço, 52 -85% para medula óssea e 52 -58% para nódulos linfáticos (revisado por Srivastava et al., 2011).

A identificação definitiva dos parasitos dentro do macrófago do tecido pode ser difícil e um método de coloração por imunohistoquímica pode ser utilizado para detectar a presença de *Leishmania* no tecido (Solano-Gallego et al., 2009). Uma característica da imunohistoquímica distinta dos outros testes de diagnóstico é a sua capacidade para identificar um antígeno “*in situ*” em tecidos normais ou infectados (Alves et al., 2013). Abordagens de imunohistoquímica, tais como imunoperoxidase e imunofluorescência direta podem ser usadas como ferramentas adicionais para confirmar o diagnóstico, particularmente em órgãos que não tem carga parasitária elevada. Esta técnica é um complemento útil para confirmar o diagnóstico da leishmaniose canina quando os parasitos não são identificáveis e o padrão histológico indica claramente a doença (Maia et al., 2008).

Outros métodos parasitológicos baseiam-se na cultura *in vitro* de fragmentos de tecidos e inoculação em animais de laboratório (Faria et al., 2012). Este método é mais usado atualmente para fins de pesquisa devido ao longo tempo para a realização da técnica, que pode levar até um mês para fornecer o resultado (Solano-Gallego et al., 2011; Mohammadiha et al., 2013). Além disso, é uma técnica laboriosa e apresenta alto custo (Solano-Gallego et al., 2009; Solano-Gallego et al., 2011; Srivastava et al., 2011).

Os métodos parasitológicos apresentam limitações relativas à baixa sensibilidade, particularmente em cães assintomáticos, e são métodos bastante invasivos (Otranto et al., 2013 e Faria et al., 2012). Além disso, a precisão do exame microscópico é influenciada pela experiência do técnico de laboratório e pela qualidade dos reagentes usados (WHO, 2010).

2.3.2 Método de detecção do DNA do parasito

A detecção do DNA específico do parasito por PCR permite um diagnóstico preciso e específico. Essa técnica pode ser realizada com DNA extraído a partir de tecidos, sangue ou fluidos biológicos, sem a necessidade de realização de procedimentos de isolamento prévio, que são especialmente trabalhosos (Solano-Gallego et al., 2009). A técnica mostrou-se mais sensível e específica usando DNA extraído a partir da medula óssea, linfonodo, baço ou pele, no entanto, a coleta dessas amostras é invasiva (Maia et al., 2008; Solano-Gallego et al., 2011). O uso de amostras não invasivas apresenta grande importância, já que são mais simples, indolores e facilmente permitidas pelos donos dos cães, neste contexto, uma abordagem interessante é o processo de swab conjuntival, um método para coleta de amostras que utiliza um cotonete estéril para coletar amostras em conjuntivas do cão (Pilatti et al., 2009).

Muitos ensaios utilizando várias sequências alvo diferentes com DNA genômico ou do cinetoplasto (kDNA) tem sido desenvolvidos para leishmaniose canina (Solano-Gallego et al., 2009). Os ensaios baseados em kDNA parecem ser mais sensíveis para a detecção direta nos tecidos infectados (Miró et al., 2008).

Solcà e colaboradores (2014) utilizaram diferentes tecidos para detectar kDNA de *L. infantum chagasi* em 51 cães sintomáticos de uma área endêmica para LVC, analisado por PCR em tempo real (qPCR) e obtiveram sensibilidade igual a 95,8% em aspirado de baço, 79,2% nos gânglios linfáticos, 77,3% na pele, 75% no sangue, 50% na medula óssea, 37,5% em swab conjuntival do olho esquerdo e 29,2% em swab conjuntival no olho direito. Não foi possível calcular a especificidade do qPCR para o baço, uma vez que apenas uma amostra testada foi negativa neste tecido, para os demais tecidos a especificidade foi 66,7% para nódulos linfáticos e aspirados de medula óssea, 63% para swab conjuntival, 42,1% para fragmentos de pele e 14,8% para o sangue.

O método de PCR em tempo real também pode ser utilizado, apresentando a vantagem de detectar cargas parasitárias mais baixas quando comparado com o PCR

convencional e permitir monitorar continuamente a amplificação do DNA do parasito, fornecendo a quantificação parasitária das amostras (Maia et al., 2008; Solano-Gallego et al., 2009).

As desvantagens destas ferramentas moleculares são os possíveis falso-positivos devido à contaminação de DNA, apresentam custos elevados e requerem profissionais treinados para sua execução (Solano-Gallego et al., 2011; Otranto, 2013). Segundo a OMS (2010), essa técnica pode, no futuro, ser ainda mais específica, mas ainda são necessárias a padronização e a avaliação da precisão do diagnóstico.

2.3.3 Imunodiagnóstico

O imunodiagnóstico da leishmaniose canina pode ser feito pela detecção de anticorpos séricos específicos (IgG) usando técnicas sorológicas, tais como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), o ensaio imunoenzimático (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) e a imunocromatografia (Solano-Gallego et al., 2011). No Brasil, RIFI e ELISA são os métodos de diagnóstico da LVC indicados pelo Ministério da Saúde (2014), sendo que os resultados desses testes são usados como critério para a eutanásia de cães soropositivos em programas de controle da leishmaniose visceral.

Na reação de imunofluorescência (RIFI), diluições em série do soro são colocadas sobre lâminas revestidas com a forma promastigota íntegra do parasito (Maia et al., 2008; Paltrinieri et al., 2010). A ligação dos anticorpos específicos e a concentração relativa (título do anticorpo) são reveladas pelo uso de anticorpos fluorescentes (Paltrinieri et al., 2010). No Brasil, o resultado considerado soropositivo é aquele que possua título igual ou superior ao ponto de corte, que é a diluição 1:40 (Ministério da Saúde, 2014). A avaliação da intensidade de fluorescência por microscopia é propensa à interpretação subjetiva, o que requer alto nível de habilidade, e equipamento especializado de alto custo, o que o torna inviável para uso no campo (Maia et al., 2008; Paltrinieri et al., 2010; Elmahallawy et al., 2014). Além disso, a especificidade e sensibilidade desta técnica em áreas endêmicas são variáveis (Peixoto et al., 2015). Em uma revisão sistemática sobre o diagnóstico sorológico da LVC, Peixoto et al. (2015) encontrou a variação de sensibilidade no teste de RIFI, entre 22,2 – 100,0% e especificidade entre 50,0 – 100,0%.

No ensaio imunoenzimático (ELISA), o soro diluído é colocado em microplacas revestidas com antígeno de *Leishmania*. Quando o resultado é soropositivo, uma reação colorimétrica é quantificada por espectrofotometria, determinando o nível de anticorpo, portanto, não se trata de uma avaliação subjetiva (Paltrinieri et al., 2010). Podem ser utilizados diferentes tipos de antígeno, que podem ser classificados em quatro grupos distintos de acordo com sua natureza: total ou extratos solúveis de promastigotas, total ou extratos solúveis de amastigotas, proteínas recombinantes ou proteínas purificadas, sendo que a sensibilidade da técnica depende do antígeno utilizado (Solano-Gallego et al. 2009; Solano-Gallego et al., 2014). Na revisão sistemática sobre o diagnóstico sorológico da LVC, Peixoto et al. (2015) encontrou uma ampla variação de sensibilidade no teste de ELISA usando antígenos brutos, entre 8,0 – 100,0% e especificidade entre 60,0 – 100,0%. Essa heterogeneidade observada pode ser atribuída às variações nos antígenos utilizados e nas particularidades de execução dos ensaios (Peixoto et al., 2015).

Tem sido relatados problemas com a ocorrência de resultados falsos positivos nos ensaios sorológicos, devido à reatividade cruzada em cães com leishmaniose tegumentar, doença de Chagas, erliquiose, rickettsiose e toxoplasmose (revisado por Gomes et al., 2008; De Paiva-Cavalcanti et al., 2015). Outra desvantagem refere-se à falta de padronização da técnica, gerando resultados diferentes de acordo com o procedimento utilizado no laboratório em questão (Gomes et al., 2008; Solano-Gallego et al., 2011).

Um alto nível de anticorpos é conclusivo para o diagnóstico de leishmaniose canina. No entanto, a presença de baixos níveis de anticorpos não é necessariamente indicativo da doença, sendo necessários outros métodos para confirmar ou excluir esta possibilidade, por exemplo, citologia, histopatologia e PCR (Miró et al., 2008). Os testes sorológicos apresentam limitações como taxas não detectáveis de anticorpos, ausência de correlação entre os níveis de anticorpos e a fase da doença, a existência de reações cruzadas com outras espécies, o que pode resultar em uma baixa especificidade do método e o tempo variável de soroconversão (Masmoudi et al., 2013; Otranto et al., 2013).

Estas dificuldades ilustram a necessidade de uma melhor compreensão e padronização de procedimentos. Os níveis adequados de sensibilidade e especificidade são particularmente desejáveis a fim de evitar reações falsas positivas e falsas negativas,

que podem levar, respectivamente, à transmissão de doenças e eutanásia desnecessária de cães saudáveis (Gomes et al., 2008; Pilatti et al., 2009; Peixoto et al., 2015).

Juntamente com o ELISA e o RIFI, os testes imunocromatográficos estão entre as técnicas de diagnóstico mais usadas em estudos clínicos e pesquisas sobre a infecção canina por *L. infantum chagasi* (Solano-Gallego et al., 2014). Atualmente, o formato mais popular dos testes imunocromatográficos é baseado no imunoensaio de fluxo lateral. Neste teste a amostra é adicionada em uma posição específica de aplicação da amostra em uma membrana de celulose, e migra através desta região para a membrana do conjugado, onde as partículas foram imobilizadas (Xu et al., 2009; O'Farrell, 2009). O ouro coloidal é a partícula conjugada mais usada, mas podem ser usadas partículas de látex ou nanopartículas fluorescentes ou quimiofluorescentes (Posthuma-Trumpie et al., 2009).

Esta partícula corante é conjugada com um componente biológico específico do ensaio, podendo ser um antígeno ou anticorpo. A amostra faz com que o conjugado seco torne-se móvel novamente, e o analito na amostra interage com o conjugado, desta forma, ambos migram para a próxima membrana, que é a membrana de reação. Nesta membrana de reação está imobilizado outro componente biológico específico do ensaio, que pode ser proteínas, anticorpos ou antígenos, que foram estabelecidos em bandas específicas na membrana, onde serão capturados o analito e o conjugado, à medida que migram através da linha de captura. O excesso de reagente move-se além das linhas de captura, sendo aprisionados na membrana absorvente. Os resultados são interpretados na membrana de reação, pela presença ou ausência de linhas de conjugado capturado, sendo que a leitura é feita a olho nú ou por um leitor (O'Farrell, 2009). A configuração típica do imunoensaio de fluxo lateral é mostrada na figura 2:

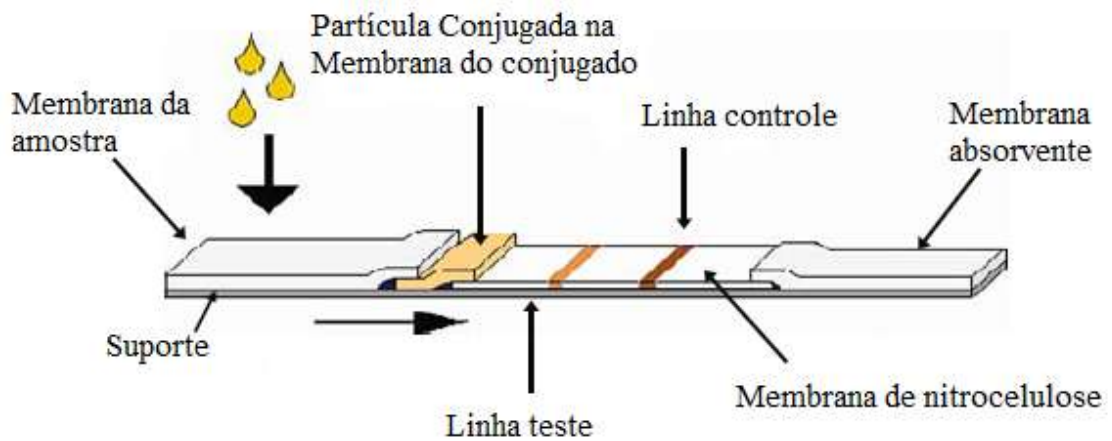


Figura 2: Configuração típica de uma tira de imunocromatografia de fluxo lateral. A amostra é adicionada à membrana de amostra, e migra para a membrana do conjugado, onde as partículas do conjugado foram imobilizadas. A amostra interage com o conjugado e ambos migram para a membrana de reação. Nesta membrana de reação estão imobilizados componentes biológicos específicos do ensaio, que formam a linha teste e a linha controle, onde serão capturados o analito e o conjugado. O excesso de reagente move-se além das linhas de captura, sendo aprisionados na membrana absorvente. Os resultados são interpretados na membrana de reação, pela presença ou ausência de linhas de conjugado capturado. Fonte: Adaptado de O'Farrell, 2009.

Testes de fluxo lateral, são utilizados para a detecção qualitativa ou semi-quantitativa de muitas substâncias, incluindo antígenos e anticorpos. Após 10 a 15 minutos, uma ou duas linhas tornar-se visível: um para um resultado positivo e dois para um resultado negativo. Uma linha, a linha de controle, será, portanto, sempre visível, independentemente da presença do analito alvo, para confirmar o desenvolvimento correto do teste (Bazin et al., 2010).

Os testes imunocromatográficos possuem formato de fácil utilização e interpretação, curto tempo de ensaio e estabilidade em longo prazo por uma vasta gama de temperaturas. Além disso, são de baixo custo, uma vez que não necessitam de profissionais treinados ou equipamentos especializados, e, portanto, são adequados para a utilização local (Fu et al., 2011). Essas características os tornam ideais para o rastreamento de um grande número de amostras (Sheedy et al., 2011).

O principal fator que interfere na sensibilidade e especificidade do teste de imunocromatografia é a natureza dos imunorreagentes, sendo que os demais parâmetros podem ser otimizados (Bandla et al., 2011). Entre os parâmetros que devem ser otimizados, destaca-se a natureza das membranas do teste, que interfere tanto na força de capilaridade da membrana quanto na facilidade de ligação e imobilização dos

reagentes. O material, o tamanho e a concentração do corante também devem ser avaliados, afim de que sejam estáveis em solução coloidal, o que pode ser influenciado pela composição, força e pH do tampão utilizado. Outro fator que requer atenção é a posição da linha de teste, quanto mais distante a linha teste estiver do local de aplicação da amostra, maior o tempo de interação entre a amostra e o agente de captura imobilizado na linha teste, pois a velocidade de migração da amostra diminui com a distância (Posthuma-Trumpie et al., 2009).

Existe grande interesse em validar testes imunocromatográficos para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina, devido à necessidade de ferramentas de diagnóstico rápido e confiável para a detecção dos cães infectados precocemente, permitindo assim, intervenções eficazes de controle (Silva et al., 2013). Em ambiente operacional, este teste possibilitaria o diagnóstico *in situ* e em larga escala, o que poderia diminuir os atrasos entre a sorologia e o abate, que é um fator relevante para aumentar a eficácia da estratégia baseada na eutanásia dos cães infectados (Grimaldi et al., 2012; Quinnell et al., 2013). Além disso, poderia ser usado também em clínicas veterinárias, fornecendo diagnóstico rápido (Romero et al., 2010; Quinnell et al., 2013).

Testes de diagnóstico para leishmaniose baseados em imunocromatografia vêm sendo desenvolvidos para humanos e cão, no entanto, vários estudos mostram que a sensibilidade e a especificidade destes testes são variáveis, apresentando uma menor sensibilidade em cães assintomáticos (Romero et al., 2010; Solano-Gallego et al., 2014). Portanto, fazem-se necessários novos testes, mais sensíveis e específicos, que possam ser usados em programas de controle epidemiológicos (Quinnell et al., 2013; Solano-Gallego et al., 2014).

2.4 Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase

As Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolases ou E-NTPDases são um conjunto de enzimas, predominante em eucariotos, que hidrolisam nucleotídeos extracelulares (Zimmerman et al., 2012 e Sansom, 2012). Estão presentes em mamíferos, plantas, leveduras, protozoários e em pelo menos uma bactéria. Em mamíferos existem oito isoformas dessas enzimas, NTPDase 1-8 (Bigonnesse et al., 2004). Podem estar presentes na forma solúvel ou serem proteínas integrais de membranas com uma ou duas porções transmembrana (Zimmerman, 2008).

Através do controle da concentração de nucleotídeos extracelulares elas podem controlar e modular a disponibilidade de ligantes dos receptores de adenosina e de nucleotídeos e assim, modular inúmeras funções fisiológicas (Zimmerman, 2012). Por exemplo, pela hidrólise do ATP a ADP, as E-NTPDases podem terminar a ação do ATP nos receptores específicos de ATP e iniciar a ativação de receptores específicos de ADP. Os receptores de adenina são igualmente abundantes e por causa da atividade ubíqua das ecto-nucleotidases, as funções do ATP e do ADP são muitas vezes difíceis de diferenciar (Zimmerman, 2008).

As E-NTPDases estão contidas em um grupo de enzimas denominado ecto-nucleotidases, juntamente com as ecto-5'-nucleotidases (eN), ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases (E-NPPs) e fosfatases alcalinas (APs). As E-NTPDases são nucleotídeo específicas e hidrolisam nucleosídeos trifosfatados e difosfatados, tendo os nucleosídeos monofosfatados como produto final da hidrólise. Elas representam as principais enzimas de hidrólise de nucleotídeos envolvidas na sinalização purinérgica, mas não hidrolisam dinucleosídeos polifosfatados, ADP ribose, NAD⁺ ou AMP. Os outros grupos de ecto-nucleotidases hidrolisam nucleotídeos em diferentes pontos de clivagem (Zimmerman et al., 2012). A figura 3 mostra um resumo da ação das ectonucleotidases em nucleotídeos.

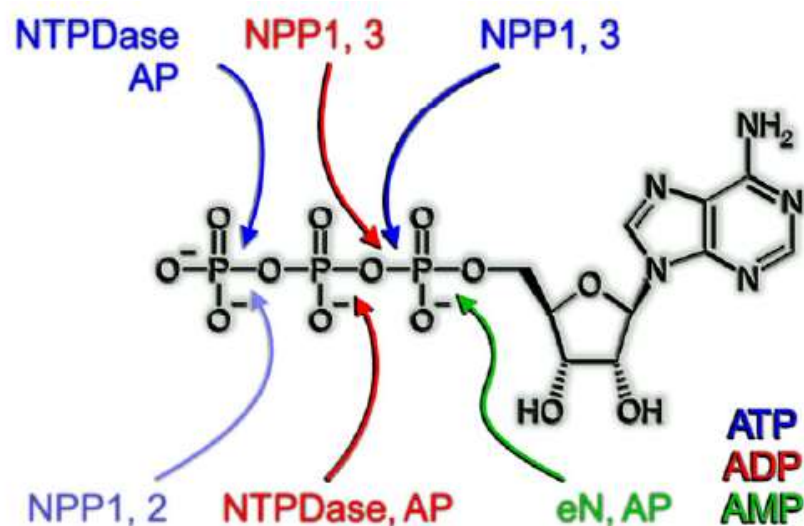


Figura 3: Sítios de clivagem com enzimas específicas dos tipos individuais de ecto-nucleotidases. Enzimas mostradas em azul, vermelho e verde usam ATP, ADP e AMP, respectivamente, como substratos. Fonte: Zimmerman et al., 2012.

Nucleotídeos extracelulares atuam como moléculas sinalizadoras em diversos eventos, atuando sobre receptores purinérgicos e pirimidinérgicos (Bours et al., 2006). Purino receptores são proteínas ancoradas à membrana celular que reconhecem purinas e pirimidinas e, ao se ligarem ao receptor, desencadeiam uma série de reações, alterando o comportamento celular. Estes receptores já foram identificados em praticamente todos os órgãos e tecidos, como músculos, pulmão, coração, baço, testículos, bexiga, intestino, fígado, células do sistema imune e outras (Ribeiro et al., 1979; Burnstock, 1980; Burnstock, 2007). Estão envolvidos com a neurotransmissão no sistema nervoso central (Abbracchio et al., 2006), a contratilidade do músculo liso (Ralevic et al., 1998), o desenvolvimento embrionário (Masse et al., 2012), a manutenção da homeostase dos processos oculares (Guzman-Aranguez et al., 2013), o controle da vasodilatação coronária (Mercier et al., 2012), o tônus vascular e angiogênese (Burnstock et al., 2014; Erlinge et al., 2008; Lohman et al., 2012), bem como a ativação plaquetária e trombose (Burnstock et al., 2014; Erlinge et al., 2008).

No sistema imune, os purinos receptores são expressos em diversos tipos de células, como neutrófilos, monócitos, macrófagos, linfócitos, células natural “killer” e células dendríticas (Bours et al., 2006). Alguns trabalhos demonstraram o efeito da ativação destes receptores em células do sistema imune e a sua importância na modulação da resposta, por intermédio do controle de liberação de citocinas e quimiocinas. Por exemplo, foi demonstrado purino receptores importantes para o mecanismo de quimiotaxia dos macrófagos, que desencadeiam a migração destes macrófagos (Kronlage et al., 2010). Além disso, o ATP está envolvido no desenvolvimento da infecção, sendo associado à liberação de histamina através dos mastócitos, estimulando a produção de prostaglandinas e citocinas pelas células imunes (Burnstock, 2007; Junger et al., 2011). Já o ADP, atua na propagação da atividade plaquetária, induzindo mudanças nas formas celulares e inibindo a adenilado ciclase (Kim, 2011).

Diversos patógenos apresentam uma atividade ectonucleotidásica em sua superfície, sendo que estes expressam NTPDases ou possuem genes que podem codificar possíveis NTPDases. Como por exemplo, *Toxoplasma gondii*, *Neosporum caninum*, *Schistosoma mansoni*, *Sarcocytis neurona*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmanias sp* (Sansom et al., 2008). Devido à incapacidade de síntese de anéis de purinas, parasitos como *Leishmania* obtém nucleosídeos extracelulares para alimentar a via de salvação de purinas, sendo que estes

nucleotídeos são obtidos pela ação de enzimas, dentre elas as NTPDases, demonstrando a importância destas enzimas para estes parasitos (Marr et al., 1978; Bours et al., 2006; Leite et al., 2012).

Muitos patógenos podem modular a resposta imune do hospedeiro, através da hidrólise de nucleotídeos, alterando a concentração de nucleotídeos e seus subprodutos no micro-ambiente de interação parasito-célula hospedeira, levando a um controle indireto da resposta imune do hospedeiro através da sinalização purinérgica (Figura 4) (Kumar, 2009; Mei et al., 2010; Kumar, 2013; Fuentes et al., 2015; Pimentel, et al., 2016). NTPDases podem atuar na regulação da sinalização purinérgica, e este controle pode ser efetuado por ectonucleotidases do próprio organismo (por exemplo, NTPDase-1 da família de proteínas CD39 de mamíferos) ou pelo controle da sinalização purinérgica não própria, quando ectonucleotidases de um organismo distinto controlam a sinalização. Assim, é sugerido que a expressão e atividade de NTPDases sobre a superfície de parasitos ou segregada por eles pode influenciar a sinalização purinérgica do hospedeiro, mas favorecendo a infecção (Pimentel et al., 2016).

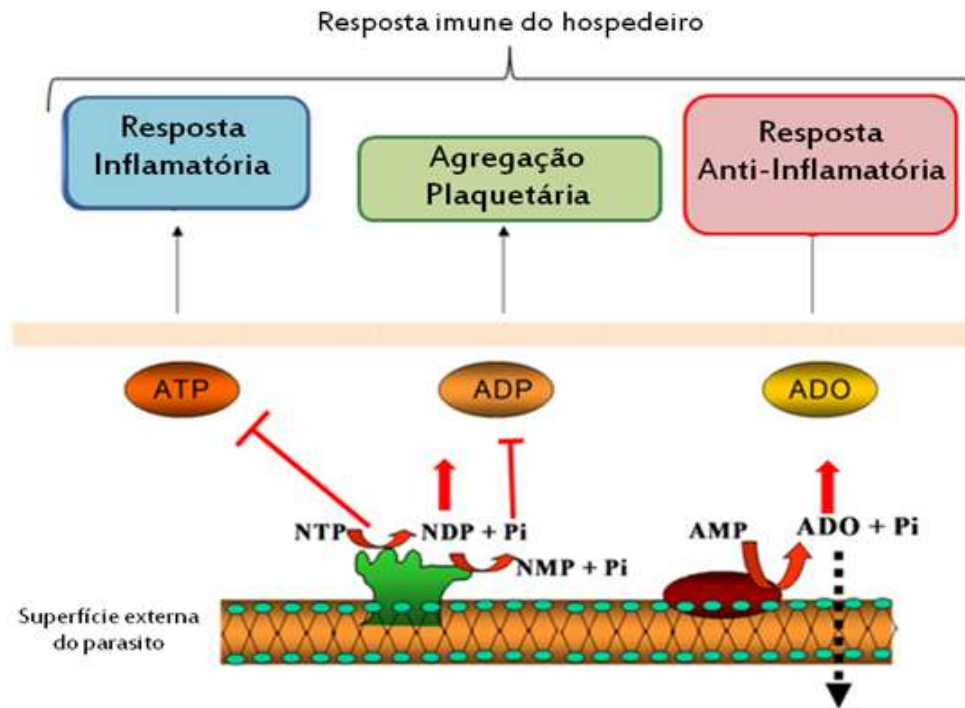


Figura 4: Modelo esquemático da ação das ecto-nucleotidases na modulação da resposta a nucleotídeos extracelulares no hospedeiro. As NTPDases (verde) e a 5'-nucleotidase (vermelho) da superfície do parasito modulam a concentração de nucleotídeos e seus derivados no micro-ambiente de interação parasito-célula hospedeira influenciando as respostas dependentes de ATP, ADP e adenosina. Setas vermelhas indicam aumento da produção com consequente ativação da sinalização e linhas com barras vermelhas indicam inibição da resposta por degradação do sinalizador. A seta tracejada indica a captação de purinas. (Adaptação de uma figura produzida por Juliana Lopes Rangel Fietto).

Trabalhos recentes têm sugerido uma correlação entre a capacidade de hidrólise de ATP extracelular e processos de virulência, adesão celular e sobrevivência intracelular de patógenos (Fietto et al., 2004; Maioli et al., 2004; Marques-da-Silva et al., 2008; Santos et al., 2009; Figueiredo et al., 2012; Leite et al., 2012; Sansom, 2012; Serafim et al., 2012; DeSouza et al., 2013; Riedmaier et al., 2014). Em um trabalho feito com diferentes espécies de *Leishmania* foi demonstrado que as espécies mais infectivas apresentam maior capacidade de hidrólise de nucleotídeos e em outro trabalho com diferentes isolados de uma mesma espécie com capacidade infectiva distintas foi encontrada capacidade de hidrólise de nucleotídeos distinta (Marques-da-Silva et al., 2008; Leite et al., 2012). Além disso, já foi comprovado para *L. amazonensis*, que os nucleosídeos controlam a metaciclo-gênese, sendo que a adição de um antagonista do receptor de adenosina na cultura *in vitro* aumentou significativamente a metaciclo-gênese, enquanto que flebotomíneos infectados com *L.*

infantum chagasi e alimentados com uma mistura de açúcar e adenosina tiveram a metaciclobose inibida (Serafim et al., 2012).

Em *Leishmania* foram identificadas duas isoformas de NTPDases: NTPDase-1 e NTPDase-2, sendo que a isoforma 1 é de aproximadamente 70 kDa e a isoforma 2 apresenta aproximadamente 40 kDa (Fietto et al., 2004; Vasconcellos et al, 2014).

Vasconcellos e colaboradores (2014) estudaram a proteína recombinante NTPDase-2 de *L. infantum chagasi*, expressa em sistema bacteriano e demonstraram que esta enzima é uma nucleotidase genuína da família CD39, cuja capacidade de hidrólise de nucleotídeos tri e difosfatados (ATP, ADP, GTP, GDP, UTP, UDP mas não hidrolisam AMP), é dependente de cátions divalentes (Mg^{2+} ou Ca^{2+}). A atividade nucleotidásica desta proteína recombinante foi semelhante à atividade de promastigotas vivos e foi constatada a presença desta proteína em cães naturalmente infectados. Além disso, mostraram que a expressão da NTPDase-2 é na superfície celular do parasito e o bloqueio desta proteína em ensaios *in vitro*, levou à diminuição nos índices de infecção e adesão ao macrófago, não afetando a proliferação do parasito no interior dos macrófagos. Estes dados sugerem a existência de um local de ligação, como um receptor desconhecido para NTPDase-2 nos macrófagos que poderia reconhecer esta proteína e facilitar a adesão e infecção. Esses dados concordam com os resultados anteriores observados em *T. cruzi* (Mariotini-Moura et al, 2014).

DeSouza et al., (2013) avaliou a aplicabilidade da proteína recombinante E-NTPDase-2 de *L. infantum chagasi* como antígeno por ensaio de ELISA e encontrou altos valores de sensibilidade (100%) e especificidade (99%) para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, apresentando baixo índice de reações cruzadas com antígenos de *Trypanosoma cruzi*. Sendo assim, as E-NTPDases são promissoras como novos antígenos para testes de diagnóstico de leishmaniose, podendo ser aplicadas a outras abordagens diagnósticas, tal como ensaios de imunocromatografia rápida de fluxo lateral. No entanto, este trabalho apresenta um número limitado de amostras de soros de cães, provenientes de banco de soros controlado como positivos ou negativos. Além disso, esse resultado foi obtido para amostras de Caratinga – MG, região endêmica para Leishmaniose visceral humana, causada pelo agente *L. infantum chagasi*. Em amostras de soro de cão provenientes de Governador Valadares – MG, região endêmica para Leishmaniose cutânea humana, causada pelo agente *Leishmania braziliensis*, a sensibilidade diminuiu para 91,67% e a especificidade se manteve em

100% (DeSouza, 2012). DeSouza sugere que esta diferença na sensibilidade pode ser explicada pela espécie de agente infectante, uma vez que a NTPDases-2 destas diferentes espécies apresentam 79,29% de identidade. No entanto é necessário mais estudos nessa área, a fim de obter um diagnóstico mais eficiente.

O presente estudo tem por objetivo o aprimoramento do diagnóstico por ELISA usando o antígeno NTPDase-2 de *Leishmania infantum chagasi* e estudo dos primeiros passos para o desenvolvimento do kit de diagnóstico rápido por imunocromatografia de fluxo lateral com base neste antígeno.

3. Objetivo Geral

Expressão em sistema bacteriano e purificação da proteína recombinante NTPDase-2 de *Leishmania infantum chagasi* e avaliação do seu uso como antígeno no diagnóstico para leishmaniose visceral canina por ELISA e padronização do teste de imunocromatografia de fluxo lateral, usando dot blot, com vistas ao aprimoramento do imunodiagnóstico de Leishmaniose canina.

3.1 Objetivos Específicos

- Expressar em sistema bacteriano e purificar a proteína recombinante NTPDase-2 de *L. infantum chagasi*;
- Purificar a proteína NTPDase-2 em sistema manual (*batch*) e automatizado em Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC);
- Avaliar a influência da conformação do antígeno no diagnóstico por ELISA;
- Avaliar a qualidade dos antígenos produzidos para uso no imunodiagnóstico por ELISA;
- Comparar as purificações quanto à pureza e rendimento;
- Analisar a estabilidade da proteína purificada;
- Conjuguar proteína A e Anti-IgG de cão com ouro coloidal 40nm;
- Avaliar o uso da proteína A e do Anti-IgG de cão conjugados para reconhecimento geral de anticorpos em membrana de nitrocelulose para imunocromatografia;
- Avaliar o uso do antígeno para o reconhecimento de anticorpos específicos do soro dos cães em membrana de nitrocelulose para imunocromatografia;
- Padronizar a concentração de antígeno e conjugado na membrana de nitrocelulose.

4. Metodologia

4.1 Expressão e purificação das proteínas recombinantes

4.1.1 Expressão das proteínas recombinantes

A produção e purificação da proteína recombinante em sistema procarioto foi realizada segundo DeSouza et al., 2013. As células transformadas foram cultivadas em meio SOC ou em meio Luria Bertani (LB), com 5 µg/mL de ampicilina, overnight a 37° C sob agitação. Para expressão foram usados 5 mL de pré-inóculo para cada 100 mL de meio de cultivo. O pré-inóculo foi adicionado aos meios de cultivo a 37° C, sob agitação até atingir a fase log (D.O. no comprimento de onda 600 nm, entre 0,6 e 0,8). A expressão das proteínas foi induzida com 0,2 mM de isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Sigma I-1284) por 60 minutos, nas mesmas condições de temperatura e agitação. Posteriormente, a cultura foi centrifugada a 5000 × g por 20 minutos e o sedimento celular foi armazenado em ultrafreezer a -80° C, em pellets correspondentes a 400 mL de cultura induzida.

4.1.2 Pré-purificação das proteínas recombinantes

Foram feitas várias pré-purificações, denominadas como pré-purificação A, B, C e D. Na pré-purificação A, foram usados 2 pellets referentes a 400 mL de meio de indução, que foram suspensos em 4 mL de tampão de lise (TRIS 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM) contendo os inibidores de protease (pepstatina A 1 µg/mL, aprotinina 2 µg/mL e leupeptina 2 µg/mL) e lisozima 1 mg/mL, mantidos no gelo por 30 minutos. Em seguida, o material foi sonificado (Misonix - ultrasonic Liquid Processor) (6 ciclos de 10 segundos com amplitude de 20 %) e centrifugado (12.000 × g por 15 minutos a 4° C). O pellet foi suspenso em 20 mL de tampão de lavagem (TRIS 50 mM, NaCl 500 mM, β-mercaptoetanol 10 mM, ureia 2 M), sonificado (6 ciclos de 10 segundos e amplitude de 20 %), centrifugado (12.000 × g por 10 minutos a 4° C) e o sobrenadante foi descartado. Essa lavagem foi realizada duas vezes. Após a lavagem, o pellet foi suspenso em 20 mL de tampão de solubilização (TRIS 100 mM, NaCl 500 mM, ureia 8 M, β-mercaptoetanol 10 mM), incubado por 20 minutos a 55 °C, sonificado (6 ciclos de 10 segundos e amplitude de 20 %), centrifugado (12.000 × g por 20 minutos a 4 °C) e armazenado a -20° C até a etapa de purificação.

A pré-purificação B, segue os passos da pré-purificação A, no entanto, o tampão de solubilização não continha β-mercaptoetanol 10 mM (TRIS 100 mM, NaCl 500 mM,

ureia 8 M). Além disso, após a solubilização, o material foi sonicado (6 ciclos de 10 segundos e amplitude de 20 %), centrifugado (12.000 x g por 20 minutos a 4 °C), dividido em alíquotas de 2 mL, centrifugado (18.000 x g por 25 minutos a 4° C) e filtrado em membrana de 0,45 µm. Esse material foi armazenado a -20° C até a etapa de purificação. Na pré-purificação B foram usados diferentes quantidades de pellets referentes a 400 mL de meio de indução (0,5; 1; 2 ou 12 pellets).

A pré-purificação C também foi baseada na pré-purificação A, no entanto, o tampão de solubilização não contém β-mercaptoetanol 10 mM (TRIS 100 mM, NaCl 500 mM, ureia 8 M) e a centrifugação após a etapa de solubilização foi substituída por ultracentrifugação (197.000 x g por 30 minutos a 4° C) (Ultracentrífuga Beckman Coulter Corporation – Rotor SW41 Ti). A pré-purificação D também foi baseada na pré-purificação A, no entanto, o tampão de solubilização não continha β-mercaptoetanol 10 mM (TRIS 100 mM, NaCl 500 mM, ureia 8 M) e após o processo foi adicionada uma etapa de ultracentrifugação (197.000 x g por 30 minutos a 4° C). Nas pré-purificações C e D foram usados 1 pellets referentes a 400 mL de meio de indução.

4.1.3 Purificação Manual

A purificação manual da rNTPDase-2 foi feita por *batch*, e processados pela pré-purificação A. A purificação foi feita em quatro falcons de 15 mL, contendo 2 mL de resina de agarose Ni-NTA (HIS-Select™ Nickel Affinity Gel-SIGMA) em cada falcon. A resina foi equilibrada com o mesmo tampão em que a amostra se encontra, pela adição de 6 mL de tampão de solubilização a resina, seguida pela centrifugação (4200 x g por 6 minutos a 4° C). Este processo foi repetido uma vez.

Para a purificação por *batch*, 10 mL dos corpos de inclusão solubilizados foram adicionados aos 2 mL de resina em cada um dos falcons de 15 mL e incubados no gelo por 90 minutos, sob agitação. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (4200 x g por 6 minutos a 4° C) e o sobrenadante foi coletado, sendo denominado como volume não ligado (VNL). A resina foi lavada com 6 mL do tampão de lavagem (50 mM TRIS pH 8.0, 100 mM NaCl, 10 mM imidazol e 8 M ureia). As proteínas foram eluídas com 1 mL do tampão de eluição (50 mM de TRIS pH 8.0, 100 mM NaCl e 250mM de imidazol).

4.1.4 Purificação Automatizada (FPLC)

As purificações automatizadas foram realizadas em Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) em sistema Akta Purifier, UPC 100 (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ) e utilizaram colunas de afinidade HisTrap FF crude (1 mL) e HisPrep FF 16/10 (20 mL) (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Amostras obtidas pelos processos de pré-purificação B, C e D foram aplicadas no FPLC utilizando o tampão de lavagem A (TRIS 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM, ureia 8 M, pH 8,3), e eluídas em tampão de eluição B (TRIS 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 300 mM, ureia 8 M, pH 8,3).

Diferentes programas foram utilizados no FPLC, denominados como programa A, B, C ou D. No programa A, a amostra foi aplicada no equipamento e foi feita a lavagem para retirada das proteínas não ligadas (VNL) com tampão de lavagem A, com 10 mM de imidazol, até que a absorbância a 280 nm da amostra eluída tenha atingido 30 mAu. Em seguida, o tampão A foi substituído pelo tampão de eluição B, com 300 mM de imidazol. Foram testados diferentes quantidades de pellets pelo programa de purificação A, 12 pellets, 2 pellets, 1 pellet e 0,5 pellet, referentes a 400 mL de indução.

No programa de purificação B, após a aplicação da amostra, foi feita a lavagem para retirada das proteínas não ligadas (VNL) com tampão de lavagem A, contendo 10 mM de imidazol, até a absorbância a 280 nm da amostra eluída atingir 30 mAu. Em seguida, foi feito o gradiente de tampão de eluição B, sendo que a composição deste tampão foi aumentada gradativamente.

No programa de purificação C foi usado steps de 20% no tampão de eluição. Para isto, foi feita a lavagem com tampão A, contendo 10 mM de imidazol, e em seguida, foi feita a eluição com tampão B, sendo que os primeiros 30 mL da eluição foi feito usando 20% de tampão de eluição B e 80% de tampão de lavagem. Após a passagem de 30 mL (um volume e meio de coluna), a composição do tampão de eluição foi alterada para 40% de tampão B e 60% de tampão A, seguindo assim até atingir 100% de tampão de eluição.

No programa de purificação D, foi feita a lavagem com tampão A, assim como nos demais. A eluição foi feita usando dois passos de eluição, sendo que os primeiros 30 mL da eluição foi feito usando 20% de tampão B e 80% do tampão de lavagem A, e em

seguida, foi usado 100% de tampão de eluição B. Nos programas de purificação B, C e D foi usado 1 pellet referente a 400 mL de indução para cada programa.

Além das variações nos programas de purificação, foi testado também aumentar a molaridade de imidazol do tampão de lavagem de 10 mM para 70 mM, usando o programa de purificação A. Foi feito também a substituição da coluna de purificação HisPrep FF 16/10 (20 mL) pela coluna HisTrap FF crude (1 mL), usando o programa de purificação A.

Após a purificação as alíquotas mais concentradas foram reunidas em uma única alíquota. A quantificação proteica foi feita pelo método de Bradford (Bradford, 1976), o perfil proteico foi analisado por SDS-PAGE 12% (Sambrook et al., 1989) e por eletroforese capilar (Agilent 2100 Bioanalyzer). A eletroforese capilar também forneceu o grau de pureza das amostras.

4.2 Renaturação Proteica

Foram utilizadas duas metodologias para a renaturação da NTPDase-2 obtida por FPLC, segundo Bastos (2014), denominadas renaturação 1 e 2. Na renaturação 1, a proteína foi diluída 5x, 10x, 20x, 30x, 40x e 50x em tampão 1 [50 mM HEPES pH 7,2, 50 mM TRIS pH 7,2, 116 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM L-glutathiona oxidada (GSSG) e 2 mM L-glutathiona reduzida (GSH)]. Após a diluição, as amostras foram incubadas a 4° C por 24 e 48 horas, sem agitação.

Na renaturação 2, a proteína foi diluída 5x, 10x, 20x, 30x, 40x e 50x em tampão 2 [50 mM HEPES pH 7,2, 50 mM TRIS pH 7,2, 116 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM L-glutathiona oxidada (GSSG), 2 mM L-glutathiona reduzida (GSH), 2 mM cloreto de cálcio e 1 M L-arginina]. Após a diluição, as amostras foram incubadas a 4° C por 24 e 48 horas, sem agitação. Em seguida, as amostras foram dialisadas em tampão sem glutathiona, em um volume 400 vezes maior que o volume da amostra, por 8 horas.

4.3 Atividade Enzimática

Para avaliar se a renaturação foi eficiente foi realizada a medida de atividade enzimática (nucleotidásica) da NTPDase-2, usando o reagente colorimétrico verde malaquita (Ekman et al., 1993). Para isto, 0,1 µg de enzima foram adicionadas em 16 µL de tampão [250 mM HEPES pH 7,2, 250 mM TRIS pH 7,2, 580 mM NaCl, 25 mM KCl, 25 mM MgCl₂]. A concentração proteica obtida após a purificação foi 0,96

mg/mL, dado obtido por eletroforese capilar, desta forma, para obter 0,1 µg de enzima, foi adicionado 0,53 µL da diluição 5x; 1,06 µL da diluição 10x; 2,13 µL da diluição 20x; 3,125 µL da diluição 30x; 4,17 µL da diluição 40x e 5,3 µL da diluição 50x. Em cada poço foi adicionado volume de água suficiente para completar 80 µL.

A reação enzimática foi iniciada pela adição de 4,8 µL de GDP 25 mM e parada pela adição de 80 µL de HCl 0,2 M, após 10 minutos de reação. Em seguida, foi adicionado 40 µL do reagente colorimétrico verde malaquita e foi medida a absorbância a 630 nm em leitora de microplaca SpectraMax[®] M5 (Molecular Devices, Vale do Silício, Califórnia, Estados Unidos). A medida da atividade enzimática foi feita através da dosagem de fosfato inorgânico liberado na hidrólise. Para a conversão de absorbância em nanomols de fosfato foi feita a curva padrão de fosfato, com Na₃PO₅ 1,5 mg/mL, relativo a 62,5 nmol de fosfato. Todas as vidrarias usadas neste experimento foram incubadas com HCl 0,2 M, overnight, a fim de eliminar traços de fosfato das vidrarias.

4.4 Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima Indireto (ELISA)

O potencial de diagnóstico da proteína recombinante produzida foi avaliado pelo imunoenensaio ELISA de acordo com DeSouza et al., 2013. Os experimentos foram feitos em placas de 96 poços (96 well Costar[®] High Binding EIA/RIA polystyrene plates-Corning Inc., 3590). Foram usadas diferentes quantidades de antígeno por poço (0,1 – 0,5 µg) diluídos em tampão contendo 0,1 M de tampão carbonato/bicarbonato pH 9.6. Os tampões de renaturação também foi usado nesta etapa, tampão 1 [50 mM HEPES pH 7,2, 50 mM TRIS pH 7,2, 116 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM L-glutaciona oxidada (GSSG) e 2 mM L-glutaciona reduzida (GSH)] e tampão 2 sem arginina [50 mM HEPES pH 7,2, 50 mM TRIS pH 7,2, 116 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM L-glutaciona oxidada (GSSG), 2 mM L-glutaciona reduzida (GSH) e 2 mM cloreto de cálcio]. Essa diluição foi adicionada nos poço e incubadas a 4 °C, overnight. O volume usado para cada poço na placa de ELISA foi fixado em 100 µL, logo, as concentrações de antígeno testadas foram 0,001 – 0,005 µg/µL.

O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito incubando a placa com BSA 3% em PBS pH 7,6, por 60 minutos. Em seguida, foram adicionadas diferentes diluições de soros de cães positivos e negativos (1:40, 1:80 e 1:160), diluído em BSA 1% em PBS e incubados por 60 minutos a 37° C. A placa foi lavada com 200 µL de Tween 20[®] 0,05% em PBS por quatro vezes. Após as lavagens, foi adicionado o anticorpo secundário

anti-IgG de cão conjugado com peroxidase (Bethyl Laboratories, INC, Montgomery-TX, USA) diluído 1:5000 em BSA 1% em PBS e foi incubado por 60 minutos a 37° C. Foram feitas quatro lavagens como citado acima. A revelação foi realizada pela adição de 100 µL dos substratos OPD (3,75 mM de o-fenilenodiamina e 0,01% H₂O₂), em tampão citrato-fosfato (0,1 M ácido cítrico, 0,2 M fosfato de sódio pH 5,0), ou 100 µL do substrato TMB (Sigma, T0440) por 30 minutos. A reação foi interrompida usando 50 µL de ácido sulfúrico 0,5M.

A leitura de absorvância foi feita a 492 nm em leitora automatizada SpectraMax® M5 (Molecular Devices, Vale do Silício, Califórnia, Estados Unidos), cujo intervalo fotométrico é 0 – 4 ODs, com resolução de 0,001 OD.

4.5 Conjugação de Proteína A e Anti-IgG de cão com ouro coloidal

Proteína A comercial (Sigma - P6031) e Anti-IgG de cão comercial (Sigma - SAB3700101) foram conjugadas por adsorção física a partículas de ouro coloidal (40nm colloidal gold – DCN, USA) sob variações de pH e concentração das proteínas, a fim de determinar a melhor condição para conjugação do colóide ouro - proteína A e ouro – Anti-IgG. Foram testadas seis diferentes concentrações de proteínas (0,012 – 0,002 µg/µL) em 7 valores de pH (6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 e 9,0) (Protocolo cedido pela DCN Conjugation Services). Para isto, 500 µL de ouro coloidal foi adicionado em seis tubos de 1,5 mL, para cada valor de pH citado acima. O pH das amostras foram ajustados com K₂CO₃ 0,2 M. A concentração proteica inicial da Proteína A foi 1,0 mg/mL, sendo assim foram usados os volumes 6 µL, 5 µL, 4 µL, 3 µL, 2 µL e 1 µL, a fim de obter as concentrações 0,012 µg/µL, 0,010 µg/µL, 0,008 µg/µL, 0,006 µg/µL, 0,004 µg/µL e 0,002 µg/µL. Para anti-IgG de cão, a concentração inicial foi 5,0 µg/µL, logo os volumes usando foram 1,2 µL, 1 µL, 0,8 µL, 0,6 µL, 0,4 µL e 0,2 µL, para atingir as mesmas concentrações.

Foi adicionado 100 µL de NaCl 10% em cada tubo e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. As condições de concentração e pH para otimizar a conjugação foi realizada pela leitura a 540 nm, onde foram selecionadas as condições que forneceram absorvâncias entre 0,521 – 0,525.

Para a conjugação, o pH da solução de ouro coloidal foi ajustado para o pH selecionado anteriormente com 0,2 M K₂CO₃, sendo que a Proteína A foi selecionado o pH igual a 7,0 e para a Anti-IgG o pH selecionado foi igual a 8,0. Foram usados 11 mL de solução de ouro coloidal para cada conjugação. Em seguida, foi adicionado 132 µL

de Proteína A e 13,2 µL de Anti-IgG de cão, a fim de obter as concentrações de proteína A e Anti-IgG de cão selecionadas na otimização. As amostras foram incubadas por 15 minutos sob leve agitação. As superfícies residuais das partículas coloidais de ouro foram bloqueadas pela adição de 1,1 mL de tampão de bloqueio (borato 50mM, 10% BSA, pH 9,0). A solução foi incubada à temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, a solução foi centrifugada a 14000 x g a 4°C por 25 minutos, ou até o sobrenadante ficar claro. O sobrenadante foi removido e o pellet ressuspendido em tampão de diluição (borato 50mM, 1% BSA, pH 9,0). Em seguida, o conteúdo de todos os tubos foi recolhido para fazer um pool e recolher o volume total de ouro coloidal conjugado que foi estocado de 2 a 8° C. A avaliação da conjugação foi feita pela leitura da densidade ótica à 540 nm, que deve ser entre 0,521 – 0,525, absorvância característica de moléculas conjugadas a ouro.

4.6 Dot Blot

Foram feitas três metodologias usando dot blot. A primeira foi feita para padronizar a linha controle da imunocromatografia, denominada dot blot A. Para isto 1 µL de IgG de cão comercial 5 mg/mL, foi diluída em BSA 1% em PBS e adicionada à membrana de nitrocelulose. Em seguida, a membrana de nitrocelulose foi colocada em estufa a 37° C para a secagem. Para bloquear os sítios inespecíficos, a membrana foi embebida em 50 mL de BSA 3% e Tween 20[®] 0,05% em PBS, overnight à 4° C. Após a secagem a 37° C, foram feitas três lavagens colocando a membrana em 30 mL de Tween 20[®] 0,05% em PBS por 5 minutos em cada lavagem. A membrana foi colocada a 37° C novamente, e após a secagem adicionou-se 1 µL dos conjugados: proteína A conjugada com ouro coloidal 40 nm, Anti-IgG de cão conjugada com ouro coloidal, proteína A conjugada com ouro coloidal 40 nm comercial ou proteína A conjugada com ouro coloidal 10 nm comercial. Todos os conjugados foram diluídos 5x e 10x em 0,15 M NaCl, 0,01 NaH₂PO₄, 0,5% BSA e 0,05% Tween 20[®].

A segunda metodologia, denominada dot blot B, foi feita para avaliar o reconhecimento geral de anticorpos em banco de soros pelas moléculas conjugadas a ouro coloidal. Foram colocadas 1 µL de diferentes diluições de soro (1:40, 1:60; 1:80 e 1:160) na membrana de nitrocelulose e então, após a secagem a 37° C, foi feito o bloqueio usando 50 mL de BSA 3% e Tween 20[®] 0,05% em PBS, overnight à 4° C. A membrana foi seca novamente a 37° C, e foram feitas três lavagens com 30 mL de Tween 20[®] 0,05% em PBS, seguido de outra secagem, e adicionou-se 1 µL dos conjugados diluídos 5x e 10x.

A terceira metodologia, denominada dot blot C, foi usada para padronizar a linha teste da imunocromatografia. O antígeno NTPDase-2 foi utilizado para reconhecer anticorpos específicos no soro do cão. A concentração e o grau de pureza do antígeno usado foram variáveis, de acordo com o obtido na purificação, segundo o item 4.1. Foi adicionado na membrana de nitrocelulose 1 μL do antígeno na membrana de nitrocelulose em diferentes concentrações (5,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; 0,3125 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Em um dos experimentos testados, foram adicionado 5 μL do antígeno na membrana de nitrocelulose, com concentração igual a 5,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Após a secagem a 37° C, foi feito o bloqueio como foi citado acima. Foram feitas três lavagens e secagem a 37° C. Então, foram adicionados 1 μL dos soros de cães positivos e negativos para leishmaniose visceral canina, em diferentes diluições 1:40, 1:80 e 1 :160. Após uma nova secagem a 37° C, seguida por mais três lavagens iguais às citadas acima e mais uma secagem a 37° C, foram adicionados 1 μL dos conjugados diluídos 5x e 10x.

4.7 Análise Estatística

As análises estatísticas foram feitas usando o programa Prisma 6.0 (Prism Software, Irvine, CA, USA). As análises estatísticas da tabela 5 foram realizadas por análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltipla de Dunnett. Em todos os casos, diferenças foram consideradas significativas quando p-valor < 0,05.

5. Resultados e Discussão

5.1 Padronização do Diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina (LVC) por ELISA Usando a Proteína Recombinante NTPDase-2 de *Leishmania infantum chagasi*

Foi utilizado no presente estudo, a proteína NTPDase-2 de *L. infantum chagasi*, clonada e expressa em *Escherichia coli*. O sistema de expressão em *E. coli* tem sido a opção escolhida por indústrias de biotecnologia para a produção em larga escala de muitas proteínas recombinantes, particularmente as não glicosiladas, devido ao rápido crescimento do micro-organismo, alto rendimento do produto, baixo custo e facilidade de manipulação genética (Valdez-Cruz et al., 2010; Baeshen et al., 2015).

No entanto, uma grande desvantagem deste sistema é o acúmulo de proteínas heterólogas mal dobradas como agregados insolúveis, principalmente sob a forma de corpos de inclusão (Baeshen et al., 2015). Uma das estratégias para purificar proteínas recombinantes contidas nesses corpos de inclusão, é a utilização de tampões com alta concentração de agentes caotrópicos, como a ureia (6 – 8 M), (Hwang et al., 2014). Essa solubilização é promovida pelo rompimento de interações hidrofóbicas das proteínas. Sendo assim, a rNTPDase-2 de *L. infantum chagasi* foi expressa em corpos de inclusão e solubilizada em tampões contendo ureia 8 M. As células transformadas foram cultivadas de meio SOC ou LB, induzidas com IPTG e recolhidas em pellets referentes a 400 mL de meio de cultivo após centrifugação.

5.1.1 Purificação em Sistema Manual (*batch*) e Automatizado (FPLC)

Foram feitas duas formas de purificação, a fim de compará-los quanto à pureza e rendimento. Na purificação da rNTPDase-2 em sistema manual (*batch*) foram processados 2 pellets referentes a 400 mL de meio de indução em meio SOC. Estes 2 pellets foram submetidos a pré-purificação A, que rendeu cerca de 20 mL, e em seguida, a amostra foi submetida a purificação manual.

A proteína recombinante possui cauda de Hexa-Histidina na porção carboxi-terminal, que se liga ao níquel presente na resina, durante o tempo de incubação da amostra com a resina. Em seguida, as amostras foram centrifugadas, e o sobrenadante corresponde ao volume não ligado (VNL), que foi descartado. A resina foi lavada com

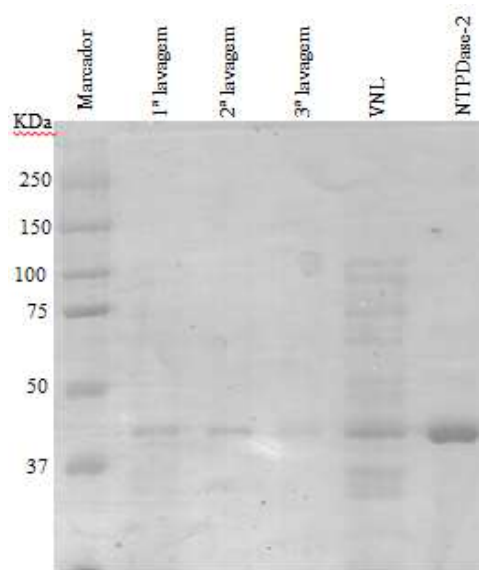
tampão de lavagem, a fim de retirar possíveis contaminantes. E então, foi feita a eluição da proteína de interesse com tampão de eluição (250 mM de imidazol), que promoveu o desligamento da proteína da resina de níquel.

A eletroforese em SDS-PAGE revelou a presença de uma única banda com alto grau de enriquecimento em relação a possíveis contaminantes, que pode ser observado na sexta canaleta (Figura 5A). Também foi possível observar uma perda da proteína de interesse no VNL e nas três lavagens (Figura 5A).

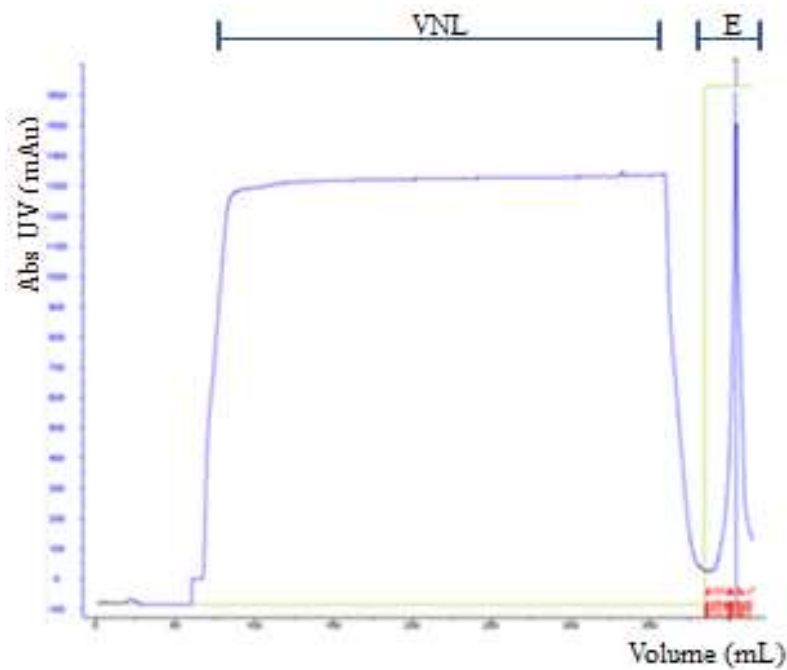
A purificação em sistema automatizado foi feita por Fast Protein Liquid Chromatography – FPLC e utilizou-se a coluna HIS PREP de 20 mL. O material foi previamente submetido à pré-purificação B, seguida pela purificação em FPLC usando o programa de purificação A. Foram usados 12 pellets de indução em meio SOC (referentes a 400 mL cada). Assim como na purificação manual, a cauda de Hexa-Histidina presente na proteína recombinante se liga ao níquel presente na coluna. A purificação por FPLC permite a injeção de grandes volumes de corpos de inclusão solubilizados, sendo assim, injetou-se no equipamento cerca de 280 mL de amostra pré-purificada. Os tampões utilizados continham ureia 8 M, essencial para solubilização dos corpos de inclusão. Sem a ureia não há exposição da cauda de Hexa-Histidina, o que impossibilita a purificação em coluna de afinidade (Vasconcellos, 2010; DeSouza, 2012).

O grande volume aplicado no FPLC permitiu concentrar a proteína de interesse na coluna antes da eluição, o que pode ser evidenciado pela extensão do volume não ligado (VNL) no cromatograma de purificação, seguido pelo pico único referente à proteína (Figura 5B). Assim como na purificação manual, a análise da purificação automatizada em FPLC por eletroforese em SDS-PAGE revelou a presença de uma única banda com alto grau de enriquecimento em relação a possíveis contaminantes (Figura 5C).

A)



B)



C)

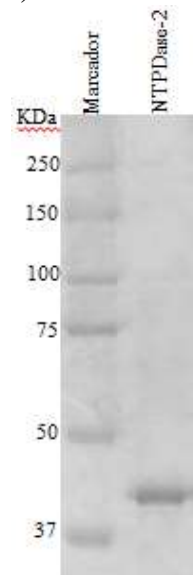


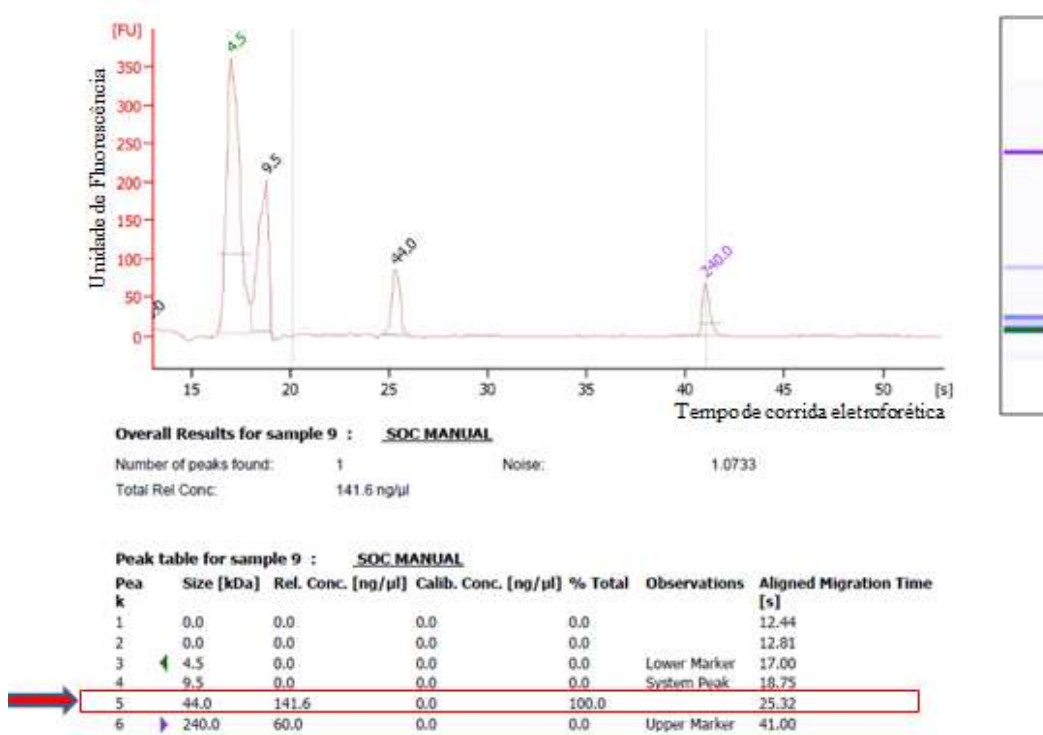
Figura 5: Perfil proteico das purificações em sistema manual (batch) e automatizado (FPLC).

A) SDS-PAGE 12% corado com Comassie blue. A primeira canaleta refere-se ao marcador de peso molecular. A segunda, terceira e quarta canaletas referem-se às lavagens. A quinta canaleta é o volume não ligado (VNL) e a sexta canaleta representa a NTPDase-2 purificada, entre as bandas de 50 e 37 kDa do marcador. B) Cromatograma de purificação induzido em meio SOC em FPLC da proteína NTPDase-2, usando 12 pellets (400 mL cada) em coluna HisPrep FF 16/10 (20 mL). O eixo y representa a absorvância a 280 nm, para quantificação proteica, medida em mAu e o eixo x representa o volume, em mL. A linha verde refere-se à concentração de imidazol no processo de purificação. VNL = Volume Não Ligado; E = eluição da NTPDase-2. C) SDS-PAGE 12% corado com Comassie blue, a banda referente à proteína de interesse apresenta-se entre as bandas de 50 e 37 kDa do marcador. A proteína de interesse possui 43 kDa.

As amostras obtidas pelos dois processos foram submetidas à eletroforese capilar (Figura 6). Para a purificação em sistema manual, a concentração obtida foi 141,6 ng/ μ L e 100,0% de pureza (Figura 6A). Já a purificação em FPLC possibilitou a obtenção de alíquotas mais concentradas das proteínas purificadas (876,9 ng/ μ L), uma vez que neste sistema é possível a aplicação de grandes volumes, sendo usados 12 pellets (400 mL cada) induzidos em meio SOC, enquanto na purificação manual foram usados apenas 2 pellets (400 mL cada) induzidos em meio SOC. No entanto, o grau de pureza diminuiu para 76,4% (Figura 6B).

A eletroforese é definida como uma técnica de separação baseada na diferença de migração de compostos iônicos ou ionizáveis na presença de um campo elétrico. Ao longo dos anos, a eletroforese foi sendo aperfeiçoada, a fim de se obter uma maior eficiência e diminuição dos efeitos térmicos provenientes da aplicação de um campo elétrico (Tagliaro et al., 1998). Com esta finalidade, o avanço instrumental das técnicas de eletroforese permitiu a introdução de colunas capilares no sistema eletroforético, e esta foi denominada Eletroforese Capilar (CE, do inglês Capillary Electrophoresis) (Spudeit et al., 2012). Os dois principais parâmetros analisados pela eletroforese capilar em gel para dimensionamento e quantificação de proteínas são o tempo de migração e a intensidade de fluorescência. O tempo de migração relaciona-se com o tamanho das proteínas, sendo que proteínas maiores movem-se de forma mais lenta devido ao efeito de peneiramento do gel no interior dos canais do chip. A intensidade de fluorescência, por sua vez, está relacionada com a concentração destas proteínas, que são coradas indiretamente por um corante fluorescente que se intercala com proteína-SDS-micelas. Este corante é parte do gel de peneiramento, que é colocada no chip e reage com as proteínas durante a separação (Agilent Technologies; 2010). Com esta técnica foi possível quantificar especificamente a NTPDase-2 e analisar a proporção desta proteína em relação às outras presentes na amostra (Figura 6).

A)



B)

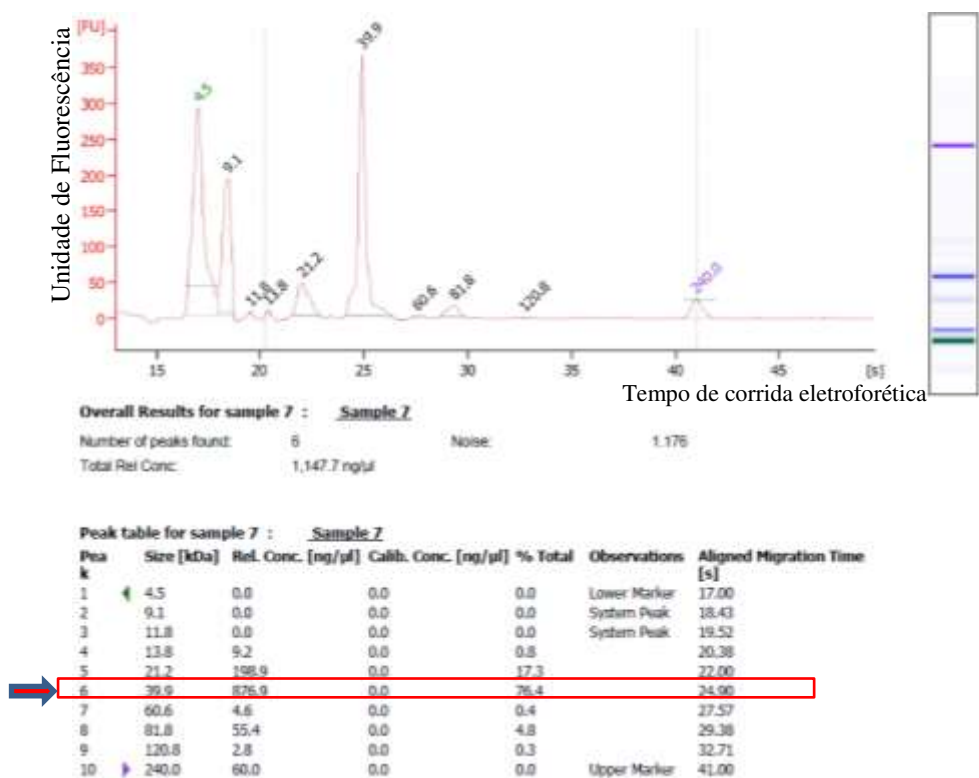


Figura 6: Avaliação por eletroforese capilar da pureza da NTPDase-2 purificada em meio SOC. A) Amostra obtida por purificação manual por *batch*, referente à 2 pellets de 400 mL induzido em meio SOC. A NTPDase-2 apresenta-se em 44,0 kDa, com concentração igual a 141,6 ng/μL e 100% de pureza (box vermelho, seta). B) Amostra obtida por FPLC, referente à 12 pellets de 400 mL induzido em meio SOC. A banda referente à proteína NTPDase-2 apresenta-se em 39,9 kDa, com concentração igual 876,9 ng/μL e grau de pureza 76,4% (box vermelho, seta).

A eletroforese capilar faz uso de padrões externos e internos. O padrão externo é o ladder, que são proteínas específicas que são analisadas no chip antes das medições das amostras reais. Todas as proteínas do ladder possuem tamanhos e concentrações conhecidos. O padrão interno trata-se de uma proteína de tamanho e concentração conhecida que faz parte do tampão de amostra, e é adicionada a cada uma das amostras numa razão definida, esta também é chamada de marcador superior. Um marcador inferior também é adicionado às amostras, mas este não se trata de uma proteína, mas de um corante fluorescente. Estes marcadores são utilizados para fins de alinhamento. Além disso, o software usado na eletroforese capilar faz correções no tempo de migração e a normalização dos marcadores, por meio de fatores de correção indicados pelos marcadores e pelo ladder.

O limite de detecção do Chip “Protein 230” é 15 – 2000 ng/ μ L (medida para anidrase carbônica). A eletroforese capilar é compatível com 300 mM de imidazol, 500 mM de NaCl e 50 mM de TRIS, presentes no tampão de eluição. Sabe-se também que é compatível com 6 M de ureia, e não se sabe os efeitos de 8 M de ureia, que foi usado.

O processamento por FPLC rendeu 11 mL de proteína purificada, com concentração igual a 876,9 ng/ μ L (Figura 8A) partindo de 12 pellets (400 mL cada) induzidos em meio SOC, ou seja, rendeu 9,65 mg de proteína purificada a partir de 4,8 L indução em meio SOC. Fazendo os cálculos para 1 L, tem-se 2,01 mg de proteína por litro de indução. Já a purificação manual por *batch* gerou 2 mL de proteína purificada com concentração igual a 141,6 ng/ μ L (Figura 8B), partindo de 2 pellets (400 mL cada) induzidos em meio SOC, ou seja, rendeu 0,283 mg de proteína partindo de 800 mL de indução. Extrapolando os valores para 1 litro de indução, o rendimento foi 0,354 mg de proteína por litro de indução em meio SOC.

Para comparar o grau de pureza das amostras obtidas por FPLC e pela purificação manual, foi feita uma diluição da amostra de FPLC, a fim de igualar a concentração da proteína de interesse e de seus interferentes com a amostra obtida pela purificação manual. Esta diluição foi baseada na concentração proteica obtida previamente por eletroforese capilar (876,9 ng/ μ L) e a concentração comparativa escolhida foi 141,6 ng/ μ L. Em seguida, a amostra diluída (141,6 ng/ μ L) foi submetida à eletroforese capilar, obtendo a concentração 98,4 ng/ μ L e 75,3% de pureza (Figura 7). Uma possível explicação para a diferença entre a concentração escolhida e obtida, é que a amostra foi diluída em água, o que reduziu a molaridade da ureia presente no tampão

de 8 M para 1,3 M, e isto pode ter levado à uma pequena precipitação proteica, reduzindo a concentração proteica em solução. A amostra obtida por FPLC manteve um grau de pureza menor que a amostra obtida pela purificação manual, mesmo em amostras com concentrações próximas, conclui-se então, que o menor grau de pureza refere-se ao protocolo usado.

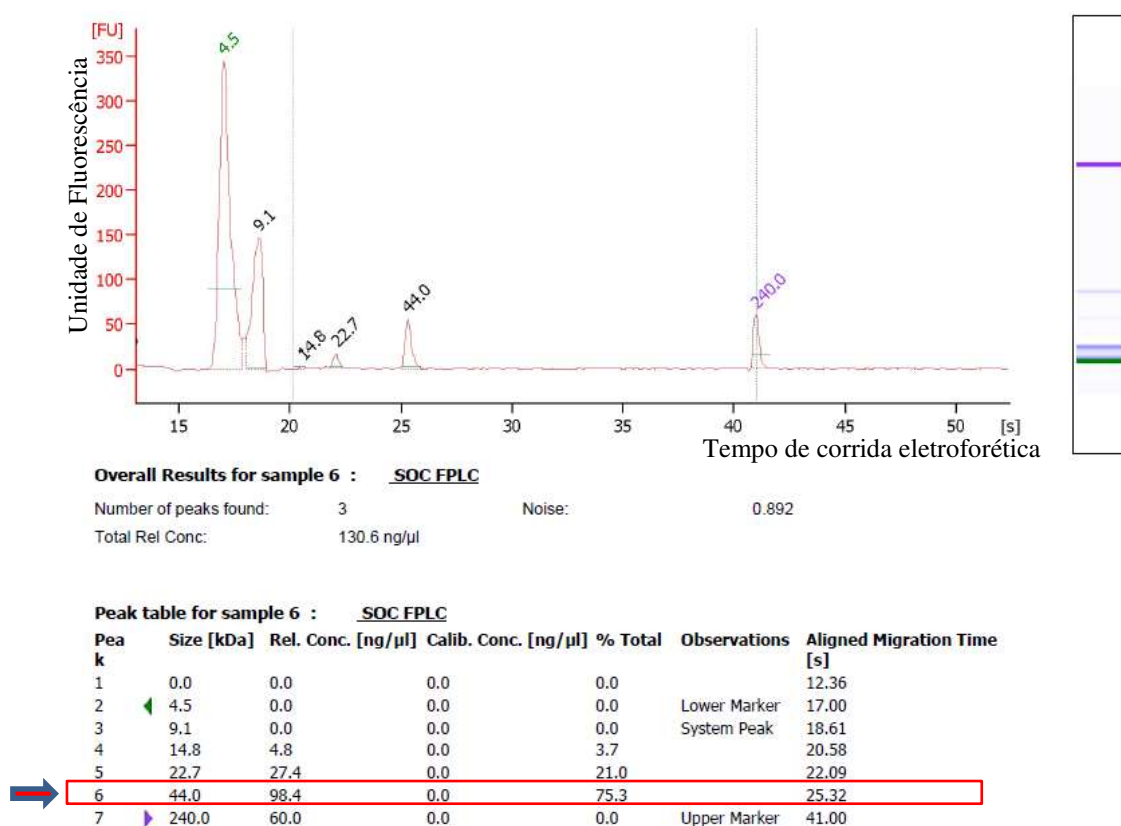


Figura 7: Eletroforese capilar da diluição da amostra obtida a partir de 12 pellets (400 mL cada) induzido em meio SOC em FPLC. Eixo y representa a unidade de fluorescência, que é uma medida relativa à concentração de proteína, medida em FU. O eixo x representa a corrida eletroforética, medida em segundos (s). A concentração da amostra obtida por FPLC foi diluída, a fim de igualar a concentração da proteína de interesse e de seus interferentes com a concentração da amostra obtida pela purificação manual a partir de 2 pellets (400 mL cada) induzidos em meio SOC. Obteve-se a concentração 98,4 ng/μL e 75,3% de pureza.

5.1.2 Verificação da Influência da Conformação do Antígeno no Diagnóstico por ELISA

Para avaliar a influência da conformação do antígeno no diagnóstico, o ELISA foi feito usando antígeno em condição nativa ou desnaturada. Os antígenos usados nesse experimento foram obtidos pela pré-purificação B e pelo programa de purificação A em FPLC, usando 12 pellets (400 mL cada) induzidos em meio SOC, com concentração 876,9 ng/ μ L e grau de pureza 76,4% (Figura 6B). Para a obtenção do antígeno em condição nativa foram usados dois protocolos para a renaturação da NTPDase-2, descrito na seção 4.2. O antígeno desnaturado foi mantido em tampão de eluição, contendo uréia 8 M.

O ELISA proposto utiliza como antígeno a proteína NTPDase-2, que pertence a um grupo de enzimas que hidrolisam nucleotídeos di e trifosfatados. Sendo assim, avaliamos se a proteína se encontrava na sua forma nativa medindo sua atividade enzimática de hidrólise de GDP (Figura 8A e 8B). O tampão 2, usado na metodologia de renaturação 2 (seção 4.2), possui arginina 1 M, que impede a atividade enzimática da NTPDase-2, portanto, foi feita uma diálise usando tampão de atividade 1x, por 8 horas, contra um volume 400x maior que o volume da amostra (Bastos, 2014). Após a diálise, foi feito um ensaio de Bradford (Bradford, 1976) para medir a concentração da proteína após esse processo, mas os valores de absorbâncias encontrados para as amostras foram iguais às absorbâncias dos brancos, evidenciando que as concentrações das amostras eram mais baixas que o limite de detecção do Bradford (0,1 – 1,4 mg/mL). Desta forma, considerou-se que a diálise não alterou a concentração da enzima. O protocolo de renaturação 1 gerou maiores valores de atividade enzimática, ou seja, a enzima ficou mais próxima da sua estrutura nativa, portanto, este foi o protocolo de renaturação mais eficaz (Figura 8A). Além disso, a renaturação por 24 horas foi mais eficiente que a renaturação por 48 horas, ambos a 4° C (Figura 8A). Quanto às diluições, 40x e 50x (concentrações iguais a 0,0219 mg/mL e 0,0175 mg/mL) foram as que renderam maior atividade enzimática, não existindo diferença estatística significativa entre essas diluições (Figura 8A e 8B). Símbolos diferentes indicam diferença estatística significativa (Figura 8A e 8B).

Murphy et al. (2003) expressou em sistema bacteriano e caracterizou uma apirase humana, hSCAN-1, e demonstrou que a concentração de proteínas é a principal variável para o sucesso do renovelamento de hSCAN-1 desnaturada nos corpos de inclusão, sendo que amostras com concentrações maiores que 0,06 mg/mL resultou em

precipitação durante a diálise e renaturação. A concentração da amostra obtida após a purificação no presente trabalho, foi 0,8769 mg/mL, logo, após as diluições as concentrações foram, respectivamente 0,175 mg/mL, 0,0877 mg/mL, 0,0438 mg/mL, 0,0292 mg/mL, 0,0219 mg/mL e 0,0175 mg/mL. Nossos resultados confirmam os dados de Murphy, uma vez que as amostras mais diluídas forneceram os maiores valores de atividade enzimática (Figura 8A).

Para a realização do ELISA foram selecionadas as seguintes metodologias de processamento do antígeno: A) antígeno na conformação nativa obtido pelo protocolo de renaturação 1, por 24 horas, diluído 50x; B) antígeno na conformação nativa obtido pelo protocolo de renaturação 2, por 24 horas, diluído 50x e C) antígeno desnaturado em uréia 8 M (Figura 8C). A concentração do antígeno utilizada foi 0,005 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, e testou-se diluindo o antígeno no tampão 1 (T1), usado na renaturação 1 e no tampão carbonato 0,1 M, pH 9,6 (T1C). O mesmo foi feito para o antígeno obtido pela renaturação 2, diluindo o antígeno em tampão 2 (T2) e em tampão carbonato 0,1 M, pH 9,6 (T2C). Foram usados dois soros caninos positivos para LVC, sendo o soro OP proveniente de Ouro Preto e o soro GV proveniente de Governador Valadares, e um soro negativo, diluídos 1:40. Avaliou-se ainda o uso de dois diferentes substratos de desenvolvimento de cor, TMB e do OPD, para revelação. O diagnóstico por ELISA usando proteínas renaturadas não se mostrou mais eficaz do que a proteína desnaturada (Figura 8C), uma vez que o antígeno renaturado não aumentou a diferença de absorbância entre os soros positivos e o soro negativo. Isto indica que o reconhecimento antígeno: anticorpo neste caso não é preferencialmente dependente da conformação do antígeno. O uso de TMB e OPD não gerou diferenças significativas, pois ambos apresentaram a mesma diferença de absorbância entre os soros positivos e o soro negativo (Figura 8C).

O valor de cut-off é definido pela média do resultado das amostras negativas mais duas vezes o desvio padrão das mesmas, e foi calculado para cada um dos pontos do gráfico 8C. Para uma amostra analisada ser considerada positiva, sua absorbância deve ser maior que o cut-off do experimento. A figura 8D mostra que as médias das absorbâncias dos soros positivos menos o cut-off fornecem valores positivos, ou seja, em todas as condições a absorbância do positivo foi maior que o cut-off calculado para cada condição.

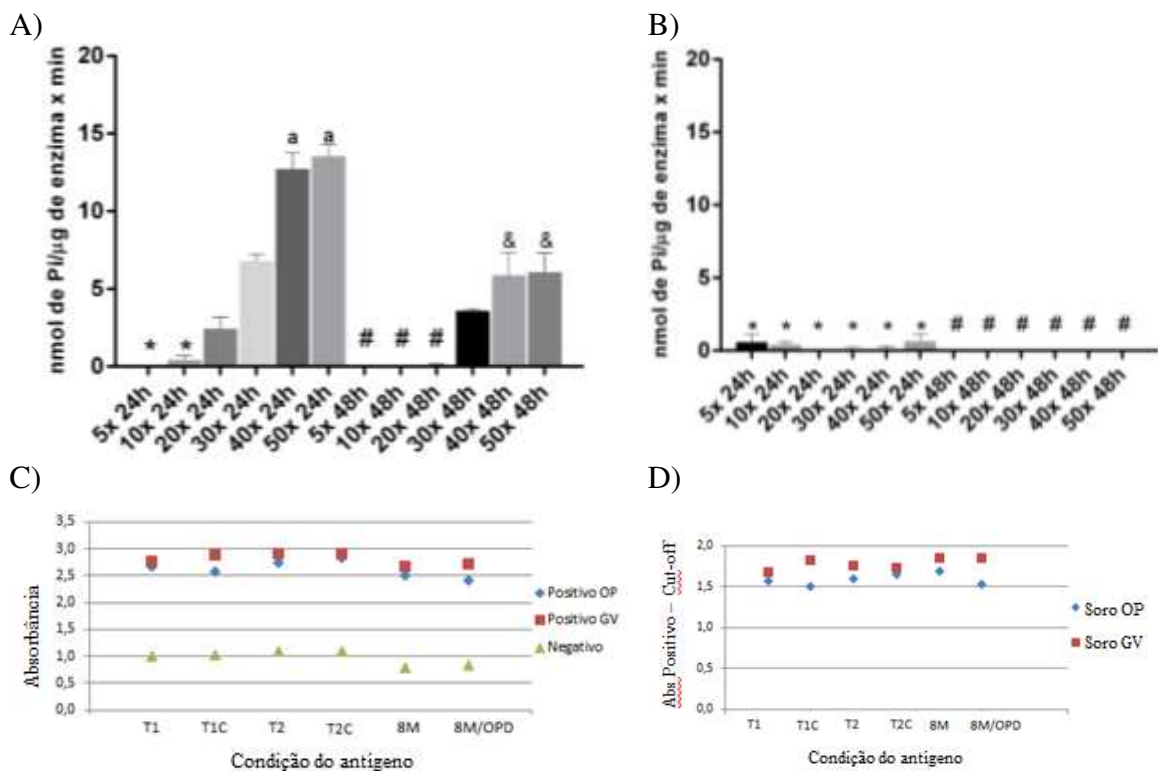


Figura 8. Avaliação da atividade enzimática da NTPDase-2 em relação ao imunodiagnóstico por ELISA. (A) Atividade nucleotídica de NTPDase-2 purificada após protocolo de renaturação 1 por 24 e 48 horas, diluída 5x, 10x, 20x, 30x, 40x e 50x e (B) após protocolo de renaturação 2 por 24 e 48 horas, diluída 5x, 10x, 20x, 30x, 40x e 50x. Símbolos diferentes indicam diferença estatística significativa, e símbolos iguais sem diferença estatística. C) ELISA utilizando antígeno na forma nativa usando protocolo de renaturação 1 e diluição do antígeno no tampão 1 (T1), usando protocolo de renaturação 1 e diluição do antígeno em tampão carbonato (T1C), usando protocolo de renaturação 2 e diluição do antígeno no tampão 2 (T2), usando protocolo de renaturação 2 e diluição do antígeno em tampão carbonato (T2C) e o antígeno desnaturado em 8 M de ureia (8M), todos revelados usando TMB como substrato para revelação da cor e o antígeno desnaturado revelado com OPD como substrato. D) Médias das absorbâncias dos soros positivos menos o cut-off.

5.1.3 Avaliação da Qualidade dos Antígenos Produzidos para Uso no Imunodiagnóstico por ELISA

Para avaliar a influência do grau de pureza do antígeno no diagnóstico por ELISA e padronizar a técnica, a proteína recombinante obtida na purificação por FPLC e manualmente por *batch* foi usada como antígeno no ELISA, avaliando diferentes quantidades de antígeno por poço (0,1 – 0,5 µg) e diferentes diluições do soro de cães positivos e negativos (1:40, 1:80 e 1:160) (Figura 10). O volume usado para cada poço na placa de ELISA foi fixado em 100 µL, logo, as concentrações de antígeno testadas foram 0,001 – 0,005 µg/µL. O leitor de placa de ELISA usado neste experimento foi o SpectraMax® M5, cuja faixa de detecção é de 10^{-6} a 10^{-12} molar de fluorescência e o intervalo fotométrico é 0 – 4 ODs, com resolução de 0,001 OD.

Usando o antígeno purificado por FPLC, com grau de pureza 76,4%, os valores de absorbância obtidos foram entre (0 – 2,5) (Figura 10A). A maior diferença entre a média do positivo e o cut-off foi dado usando 0,5 µg de antígeno por poço e diluição do soro 1:160, logo, estes valores foram padronizados para o antígeno produzido por FPLC (Figura 10B). Usando o antígeno purificado manualmente no ELISA, com grau de pureza 100,0%, os valores de absorbância gerados foram mais altos (Figura 10C), mas dentro do intervalo fotométrico do equipamento e as diferenças entre as médias do positivo e os cut-off foram maiores, o que é desejável para um diagnóstico apurado (Figura 10D). Para 0,5 µg de antígeno e diluição do soro 1:40 com antígeno purificado manualmente, obteve-se resultados próximos para o soro positivo e negativo, com diferença entre a média do positivo e o cut-off foi igual 0,1, isto indica um excesso de antígeno e anticorpos, fazendo que a resposta de absorbância por unidade de anticorpos não seja linear (Figura 10D). A maior diferença entre a média do positivo e o cut-off foi dado usando 0,1 µg de antígeno e diluição do soro 1:160, sendo esta a melhor condição entre as testadas para a purificação manual, sendo assim estes valores foram padronizados para o ELISA. Esses resultados indicam que o grau de pureza do antígeno influencia no diagnóstico, uma vez que as diferenças entre os positivos e os cut-off foram maiores para ELISA realizado com o antígeno purificado manualmente.

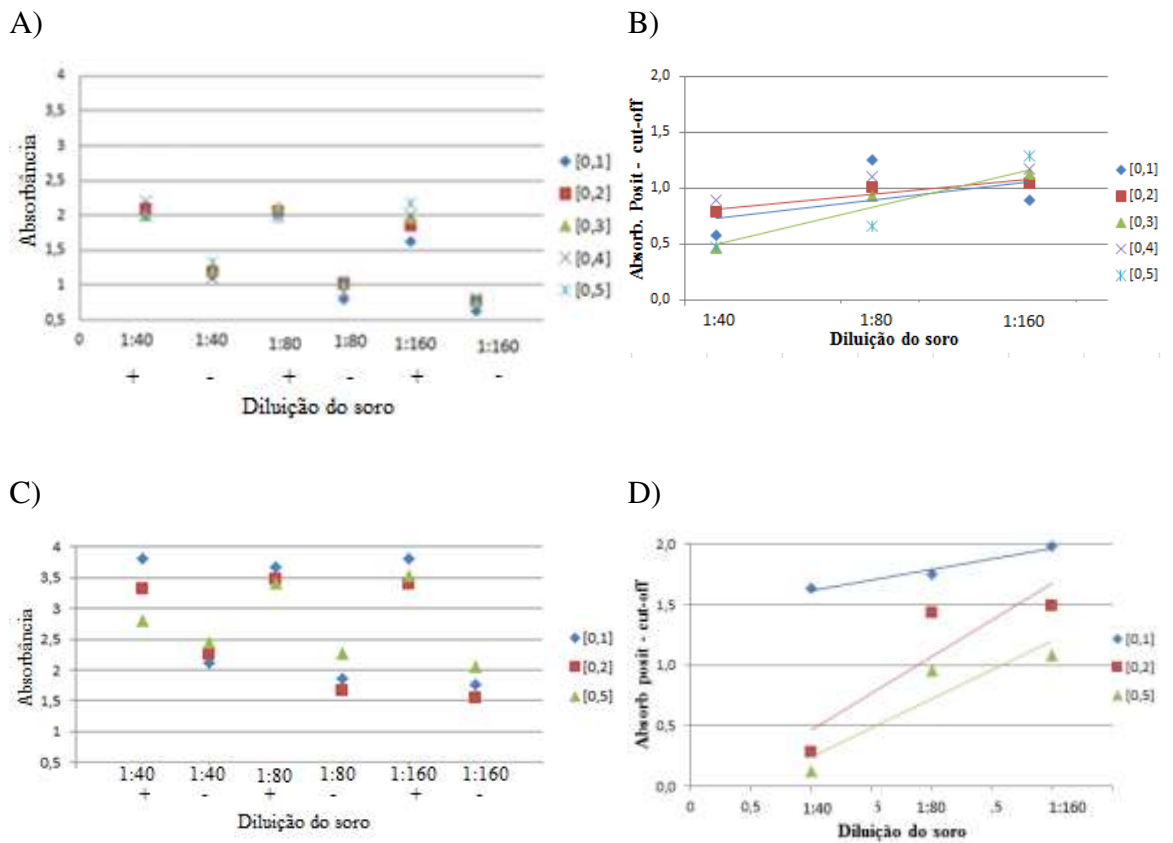


Figura 9: Padronização do ELISA. A) Antígeno obtido por FPLC, grau de pureza 76,4%. ELISA variando a quantidade de antígeno (0,1 – 0,5 μ g) e diluição do soro positivo e negativo (1:40, 1:80 e 1:160). B) Média da absorbância do positivo menos o cut-off de cada condição para a amostra do FPLC. C) Amostra obtida por purificação manual por *batch*, grau de pureza 100%. ELISA variando a quantidade de antígeno (0,1 – 0,5 μ g) e diluição do soro positivo e negativo (1:40, 1:80 e 1:160). D) Média da absorbância do positivo menos o cut-off de cada condição para a amostra purificada manualmente por *batch*.

5.1.4 Comparação entre as purificações quanto ao grau de pureza

Como foi discutido acima, o ELISA usando antígeno com maior grau de pureza, rendeu valores de absorbância mais distinto entre soros positivos e negativos, portanto, torna-se necessário padronizar um protocolo para a purificação do antígeno usando o FPLC, que possui maior rendimento. Desta forma, os mesmos protocolos para a produção do antígeno usando sistema de purificação manual (*batch*) e automatizado (FPLC), descrito no tópico 4.1, foram realizados usando o meio Luria-Bertani (LB) (Figura 10). O meio SOC é um meio mais rico em nutrientes que o meio LB, portanto, espera-se que a produção proteica em meio SOC seja maior, o que pode também aumentar a concentração de contaminantes. Além disso, o uso de meio LB poderia reduzir os custos da produção do antígeno.

Para a purificação manual o antígeno foi previamente submetido à pré-purificação A e foram usados 2 pellets de indução (400 mL). Para purificação em FPLC, o antígeno foi submetido à pré-purificação B e ao programa de purificação A usando 12 pellets de indução (400 mL cada).

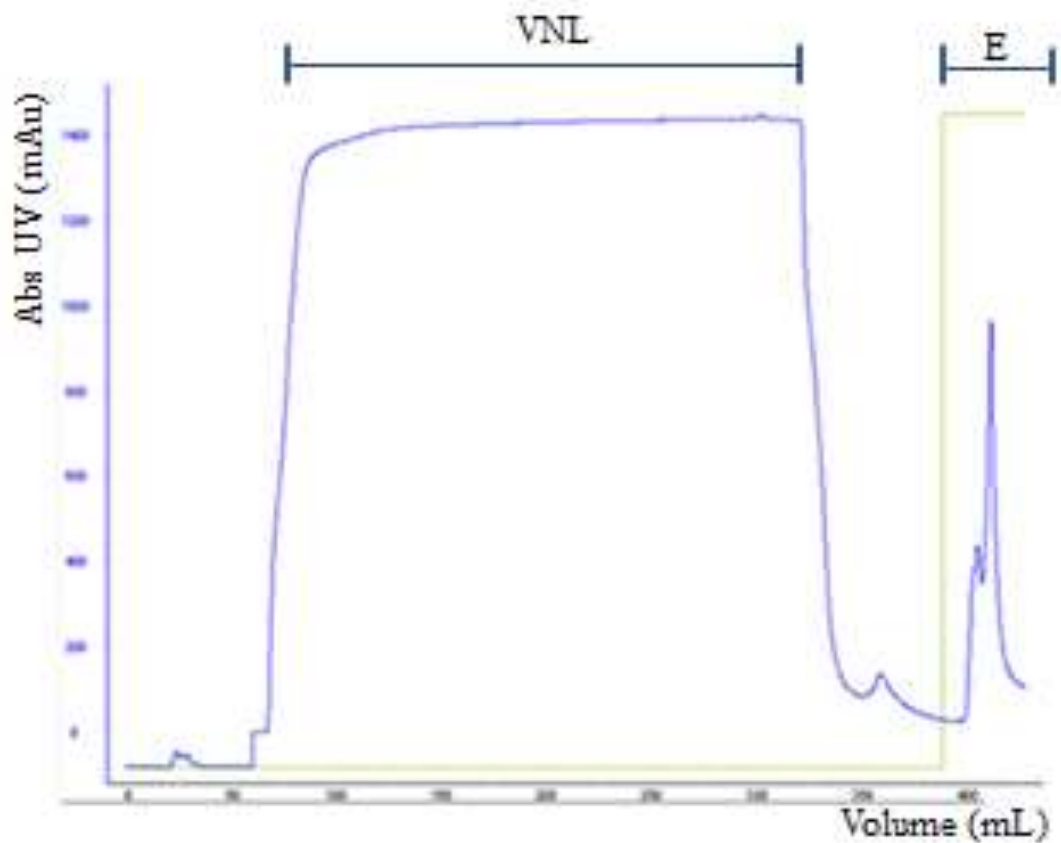
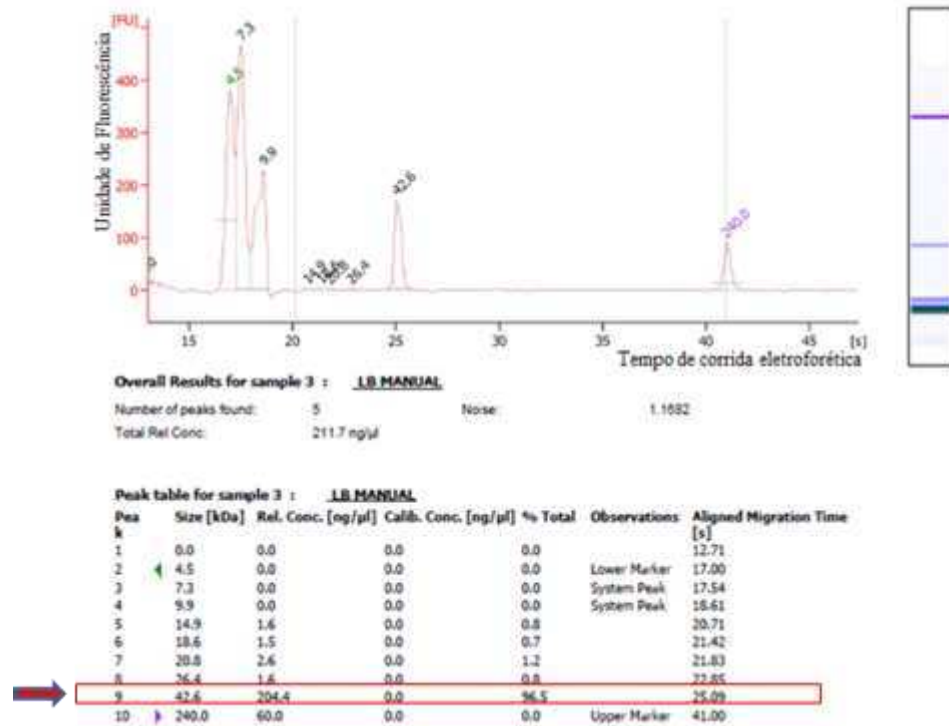


Figura 10: Cromatograma de purificação em FPLC da proteína NTPDase-2, usando 12 pellets de indução (400 mL cada) em meio LB. A purificação foi feita em coluna HisPrep FF 16/10 (20 mL) de Ni-agarose em FPLC. O eixo y representa a absorvância a 280 nm, para quantificação proteica, medida em mAu e o eixo x representa o volume, em mL. A linha verde refere-se à concentração de imidazol no processo de purificação. VNL = Volume Não Ligado; E = eluição da NTPDase-2.

A amostra purificada em sistema manual (*batch*) referente a 2 pellets de indução em meio LB foi analisado por eletroforese capilar, a proteína NTPDase-2 apresenta-se em 42,6 kDa, com concentração igual a 204,4 ng/ μ L e 96,5% de pureza (Figura 11A). A purificação manual em meio LB, assim como em meio SOC, rendeu alto grau de pureza.

A amostra purificada em FPLC, pelo programa de purificação A (seção 4.1.4) usou 12 pellets de 400 mL induzido em meio LB. A eletroforese capilar apresentou a proteína de interesse em 43,0 kDa, tendo concentração igual a 717,2 ng/ μ L e grau de pureza 83,9% (Figura 11B). O grau de pureza das amostras produzidas em meio SOC e meio LB em FPLC foram próximas, 76,4% e 83,9%, respectivamente. Ambas as amostras apresentam um contaminante próximo a 21,0 kDa. Em meio SOC esse contaminante apresenta concentração igual a 198,9 ng/ μ L e representa 17,3% da amostra, enquanto que em meio LB esse contaminante apresenta 55 ng/ μ L e representa 6,4% da amostra, no entanto, em meio LB aparecem outros contaminantes, com menores concentrações.

A)



B)

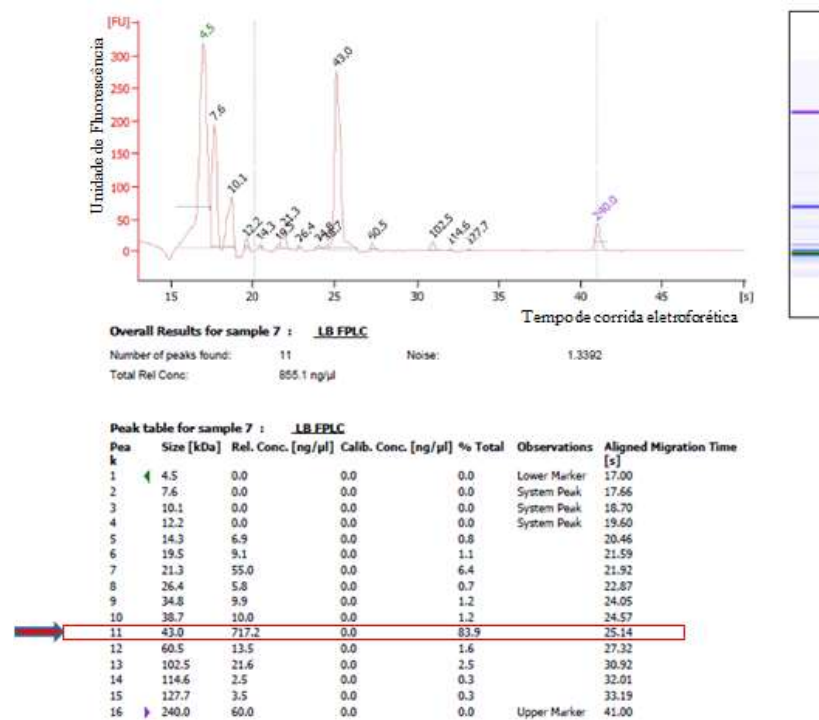
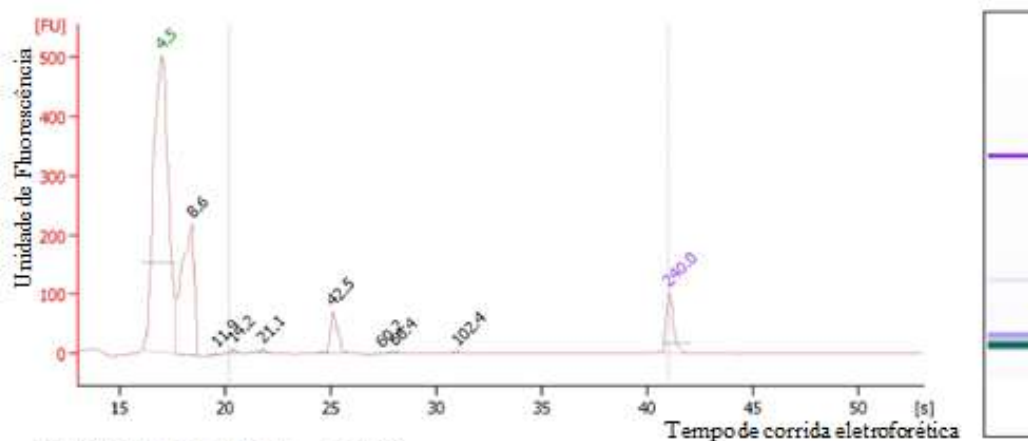


Figura 11: Avaliação por eletroforese capilar da NTPDase-2 purificada em meio LB . A) Amostra obtida por purificação manual por *batch*, referente à 2 pellets (400 mL) induzido em meio LB. A NTPDase-2 apresenta-se em 42,6 kDa, com concentração igual a 204,4 ng/μL e 96,5% de pureza (box vermelho /seta). B) Amostra obtida por FPLC em coluna HisPrep FF 16/10 (20 mL) de Ni-agarose, referente à 12 pellets de 400 mL de indução em meio LB. A banda referente à proteína NTPDase-2 apresenta-se em 43,0 kDa, com concentração igual 717,2 ng/μL e grau de pureza 83,9% (box vermelho /seta).

Foi realizada a diluição da amostra de FPLC, para comparar o grau de pureza das amostras purificadas pelos dois métodos, ambas induzidas em meio LB. Esta diluição foi baseada na concentração proteica obtida por eletroforese capilar (717,2 ng/ μ L), e a concentração comparativa escolhida foi 141,6 ng/ μ L, que é a concentração da amostra purificada manualmente em meio SOC, já que esta é a amostra mais diluída entre as analisadas. Essa amostra diluída foi submetida à eletroforese capilar, obtendo a concentração 69,7 ng/ μ L e 76,0% de pureza (Figura 12).

Novamente, a concentração obtida após a diluição foi mais diluída do que foi previsto, e assim como a diluição para o meio SOC, o meio LB também foi diluído em água, o que reduziu a molaridade da ureia presente no tampão de 8 M para 1,58 M, e isto pode ter levado à uma pequena precipitação proteica, reduzindo a concentração proteica em solução. A amostra obtida por FPLC manteve um grau de pureza menor que a amostra obtida pela purificação manual para o meio LB, mesmo em amostras com concentrações próximas, confirmando que o menor grau de pureza refere-se ao protocolo usado. Em comparação com o meio SOC, a amostra obtida por meio LB teve concentração e grau de pureza equiparáveis, sendo assim, determinou-se que a padronização para a produção do antígeno continuaria em meio LB, já que este é um meio mais barato e tão eficaz quanto o meio SOC para a expressão da proteína desejada.



Overall Results for sample 2 : LB FPLC

Number of peaks found: 6 Noise: 0.9004
 Total Rel Conc: 91.6 ng/ μ l

Peak table for sample 2 : LB FPLC

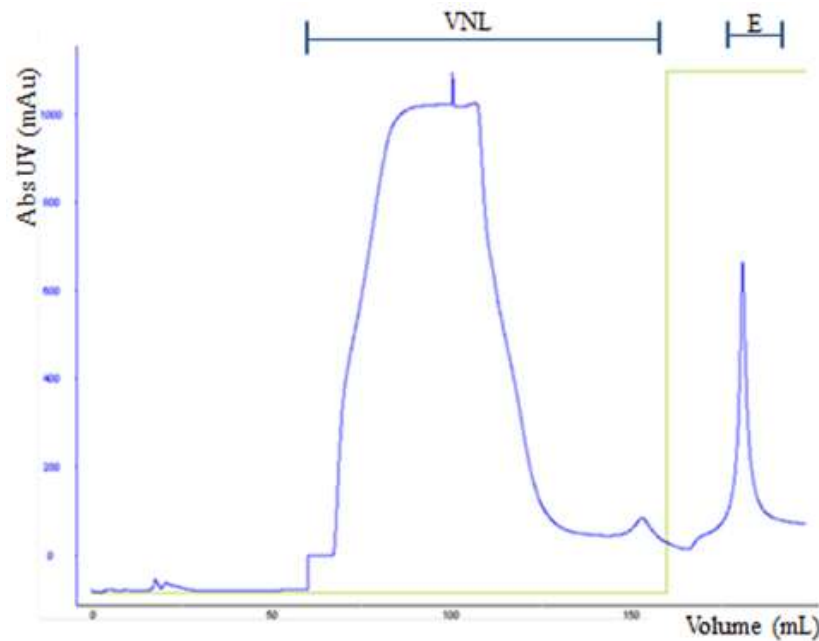
Peak	Size [kDa]	Rel. Conc. [ng/ μ l]	Calib. Conc. [ng/ μ l]	% Total	Observations	Aligned Migration Time [s]
1	4.5	0.0	0.0	0.0	Lower Marker	17.00
2	8.6	0.0	0.0	0.0	System Peak	18.42
3	11.9	0.0	0.0	0.0	System Peak	19.58
4	14.2	6.3	0.0	6.9		20.37
5	21.1	7.7	0.0	8.4		21.79
6	42.5	68.7	0.0	76.0		25.11
7	60.2	1.3	0.0	1.4		27.37
8	66.4	5.2	0.0	5.7		28.00
9	102.4	1.5	0.0	1.6		31.00
10	240.0	60.0	0.0	0.0	Upper Marker	41.00

Figura 12: Eletroforese capilar da diluição da amostra obtida a partir de 12 pellets (400 mL) induzido em meio LB em FPLC. A concentração da amostra obtida por FPLC foi diluída, a fim de igualar a concentração da proteína de interesse e de seus interferentes com a concentração da amostra obtida pela purificação manual a partir de 2 pellets (400 mL) induzido em meio SOC (amostra mais diluída encontrada). Obteve-se a concentração 68,7 ng/ μ L e 76,0% de pureza (box vermelho/seta).

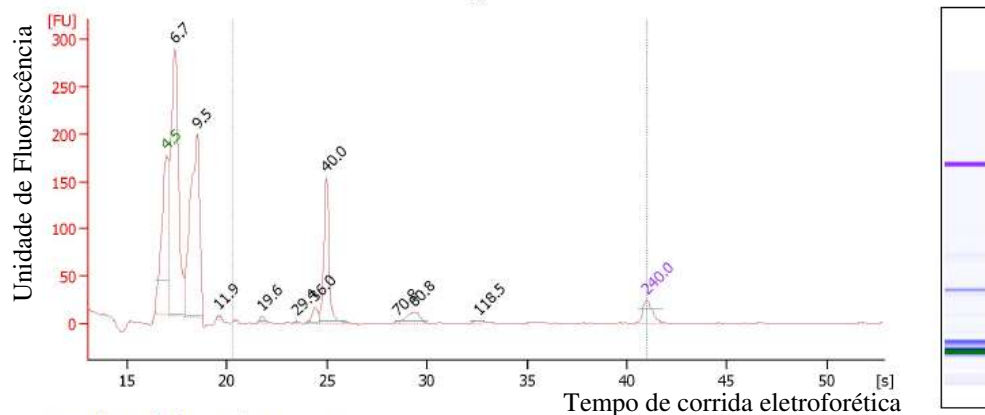
Uma nova purificação por FPLC foi realizada usando 2 pellets (400 mL) induzido em meio LB, para verificar se a redução da quantidade de amostra aplicada no equipamento aumentaria o grau de pureza. Esta amostra também foi obtida pelo processo de pré-purificação B (seção 4.1.2) e pelo programa de purificação A em FPLC (seção 4.1.4).

A figura 13A apresenta o cromatograma da purificação, que evidencia a eluição da proteína de interesse (E) como um pico único, posterior à eluição das proteínas não ligadas à coluna de níquel (VNL). Na eletroforese capilar, a banda referente à NTPDase-2 apareceu em 40,0 kDa, com concentração igual a 356,9 ng/ μ L e pureza igual a 73,2% (Figura 13B).

A)



B)



Overall Results for sample 4 : 17

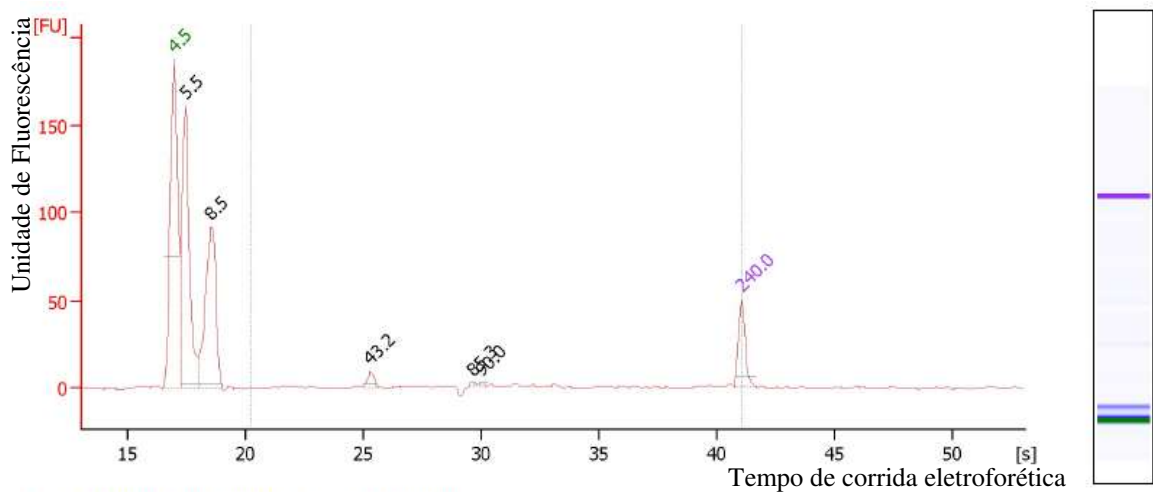
Number of peaks found: 7 Noise: 1.4327
 Total Rel Conc: 487.3 ng/ μ l

Peak table for sample 4 : 17

Peak	Size [kDa]	Rel. Conc. [ng/ μ l]	Calib. Conc. [ng/ μ l]	% Total	Observations	Aligned Migration Time [s]
1	4.5	0.0	0.0	0.0	Lower Marker	17.00
2	6.7	0.0	0.0	0.0	System Peak	17.40
3	9.5	0.0	0.0	0.0	System Peak	18.51
4	11.9	0.0	0.0	0.0	System Peak	19.57
5	19.6	14.8	0.0	3.0		21.74
6	29.4	4.7	0.0	1.0		23.50
7	36.0	45.3	0.0	9.3		24.41
8	40.0	356.9	0.0	73.2		24.97
9	70.8	4.0	0.0	0.8		28.55
10	80.8	55.6	0.0	11.4		29.35
11	118.5	6.1	0.0	1.3		32.58
12	240.0	60.0	0.0	0.0	Upper Marker	41.00

Figura 13: Perfil proteico da purificação em sistema automatizado (FPLC) usando 2 pellets (400 mL) induzido em meio LB em coluna HisPrep FF 16/10 (20 mL) de Ni-agarose. A) Cromatograma de purificação da proteína NTPDase-2. O eixo y representa a absorbância a 280 nm, para quantificação proteica, medida em mAu e o eixo x representa o volume, em mL. A linha verde refere-se à concentração de imidazol no processo de purificação. VNL = Volume Não Ligado; E = eluição da NTPDase-2. B) Na eletroforese capilar, a proteína é representada pela banda de 40,0 kDa, com concentração igual a 356,9 ng/ μ L e 73,2% de pureza (box vermelho/seta).

A diluição da amostra obtida por FPLC, com 2 pellets (400 mL) induzido em meio LB, foi aplicada na eletroforese capilar, fornecendo os valores de concentração igual a 16,3 ng/ μ L e pureza de 80,0% (Figura 14). Esta diluição foi baseada na concentração proteica obtida por eletroforese capilar (356,9 ng/ μ L), e a concentração comparativa escolhida foi 141,6 ng/ μ L, que é a concentração da amostra purificada manualmente em meio SOC, já que esta é a amostra mais diluída entre as analisadas. A concentração obtida foi 16,3 ng/ μ L muito abaixo do que foi calculado (Figura 14). O grau de pureza foi igual a 80,0%, ou seja, teve um aumento, mas não muito significativo quando comparado com as purezas das amostras realizadas por purificação manual.



Overall Results for sample 8 : 17 diluido

Number of peaks found: 3 Noise: 1.3353
 Total Rel Conc: 20.4 ng/ μ l

Peak table for sample 8 : 17 diluido

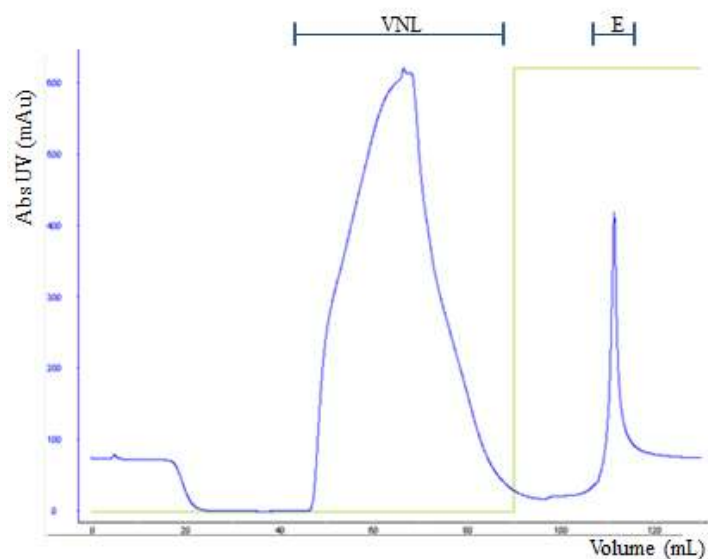
Peak	Size [kDa]	Rel. Conc. [ng/ μ l]	Calib. Conc. [ng/ μ l]	% Total	Observations	Aligned Migration Time [s]
1	4.5	0.0	0.0	0.0	Lower Marker	17.00
2	5.5	0.0	0.0	0.0	System Peak	17.44
3	8.5	0.0	0.0	0.0	System Peak	18.54
4	43.2	16.3	0.0	80.0		25.29
5	85.3	2.0	0.0	10.0		29.63
6	90.0	2.1	0.0	10.0		30.02
7	240.0	60.0	0.0	0.0	Upper Marker	41.00

Figura 14: Eletroforese capilar da diluição da amostra obtida a partir de 2 pellets (400 mL) induzido em meio LB em FPLC. A concentração da amostra obtida por FPLC foi diluída, a fim de igualar a concentração da proteína de interesse e de seus interferentes com a concentração da amostra obtida pela purificação manual a partir de 2 pellets referentes a 400 mL de indução em meio SOC (amostra mais diluída encontrada). Obteve-se a concentração 16,3 ng/ μ L e 80,0% de pureza (box vermelho/seta).

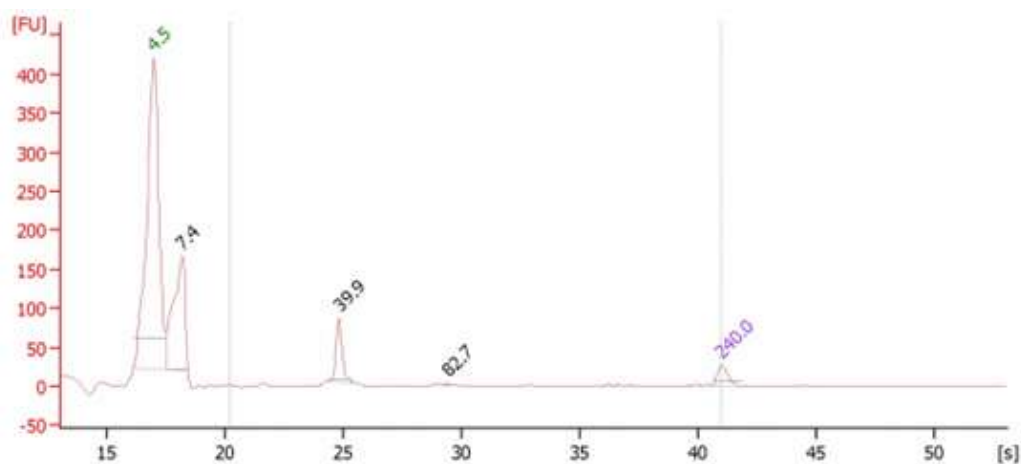
Desta forma, foi feita uma purificação em FPLC, usando apenas 200 mL de meio LB (meio pellet de 400 mL), a fim de aumentar a pureza da amostra. A amostra foi submetida ao processo de pré-purificação B (seção 4.1.2) e à purificação em FPLC usando o programa de purificação A (seção 4.1.4).

O cromatograma da purificação é apresentado na figura 15A, mostrando a eluição da NTPDase-2 (E) como um pico único. A eletroforese capilar desta amostra apresentou concentração igual 178,2 ng/ μ L e pureza igual a 96,6% (Figura 15B). O aumento da pureza gerado pela redução do volume aplicado no FPLC pode ser justificado pelo aumento na proporção de resina de Ni-agarose por volume de amostra aplicado, favorecendo a ligação da proteína de interesse ao níquel.

A)



B)



Overall Results for sample 2 : 200 meio

Number of peaks found: 2 Noise: 1.4208
 Total Rel Conc: 184.4 ng/μl

Peak table for sample 2 : 200 meio

Peak	Size [kDa]	Rel. Conc. [ng/μl]	Calib. Conc. [ng/μl]	% Total	Observations	Aligned Migration Time [s]
1	4.5	0.0	0.0	0.0	Lower Marker	17.00
2	7.4	0.0	0.0	0.0	System Peak	18.17
3	39.9	178.2	0.0	96.6		24.84
4	82.7	6.2	0.0	3.4		29.43
5	240.0	60.0	0.0	0.0	Upper Marker	41.00

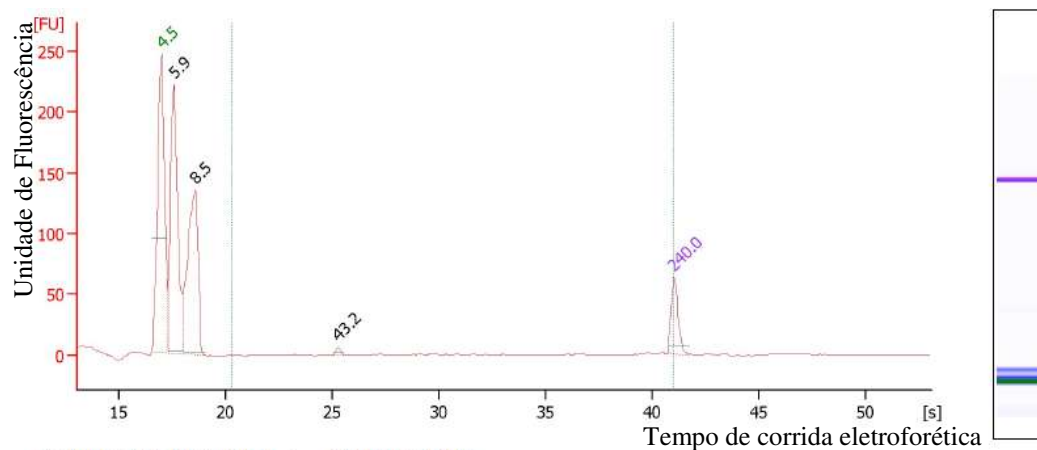
Figura 15: Perfil proteico da purificação em sistema automatizado (FPLC) usando 0,5 pellet (400 mL) induzido em meio LB em coluna HisPrep FF 16/10 (20 mL) de Ni-agarose. A) Cromatograma de purificação da proteína NTPDase-2. O eixo y representa a absorbância a 280 nm, para quantificação proteica, medida em mAu e o eixo x representa o volume, em mL. A linha verde refere-se à concentração de imidazol no processo de purificação. VNL = Volume Não Ligado; E = eluição da NTPDase-2. B) Análise por eletroforese capilar, a proteína é representada pela banda de 39,9 kDa, com concentração igual a 178,2 ng/L e 96,6% de pureza (box vermelho/seta).

A diluição da amostra gerada por 0,5 pellet relativo a 400 mL de indução em meio LB, assim como nas amostras anteriores, forneceu uma concentração bem abaixo do calculado, 6,8 ng/ μ L (Figura 16). Nesta diluição o erro foi maior porque a diluição foi baseada na concentração proteica obtida pelo ensaio de Bradford (Bradford, 1976), que forneceu o resultado 909 ng/ μ L, muito acima do valor encontrado pela eletroforese capilar (178,2 ng/ μ L). A concentração comparativa escolhida foi 141,6 ng/ μ L (concentração da amostra purificada manualmente em meio SOC, obtida por eletroforese capilar).

A pureza da amostra diluída atingiu 100,0%, o que é interessante para a aplicação no ELISA, uma vez que o antígeno é diluído antes de ser usado nessa técnica (Figura 16). No entanto, o volume de amostra aplicada no FPLC e obtido após a purificação é muito inferior à capacidade do equipamento.

O ensaio de Bradford (Bradford, 1976) envolve a ligação do corante Coomassie blue G-250 às proteínas, produzindo uma solução colorida no espectro visível. A intensidade da cor deste composto é medida por fotometria de absorvância a 595 nm (Brady et al., 2015). Tipicamente, soluções padrão de soro albumina bovina (BSA) são utilizadas para produzir uma curva de calibração de absorvância versus concentração de massa, e isto foi feito para este ensaio. Infelizmente, o pressuposto que a resposta (absorvância por unidade de concentração) e a sensibilidade do ensaio são universais nem sempre é válido, e variabilidade proteína-proteína podem levar a um excesso ou subestimação da concentração do analito de proteína (Noble et al., 2009).

A composição proteica também pode gerar viés nos resultados de Bradford, uma vez que a interação proteína-corante é influenciada pelas interações eletrostáticas dos grupos sulfonados do corante com os resíduos básicos, arginina, histidina e lisina (Compton et al., 1985; Moreno et al., 1986). Outro fator que é influenciado pela composição proteica são as interações hidrofóbicas do corante com os resíduos triptofano, fenilalanina e tirosina (Compton et al., 1985; Fountoulakis et al., 1992). As proteínas que são em grande parte hidrofóbicas e/ou têm uma proporção elevada de resíduos de arginina, lisina e tirosina fornecerão valores de absorção mais elevados do que a mesma concentração em massa de uma proteína com menor carácter hidrofóbico e/ou com menor número de resíduos básicos. Sendo assim, o resultado obtido por eletroforese capilar é mais confiável que o ensaio de Bradford.



Overall Results for sample 4 : 200 meio diluido

Number of peaks found: 1 Noise: 1.2396

Total Rel Conc: 6.8 ng/μl

Peak table for sample 4 : 200 meio diluido

Peak	Size [kDa]	Rel. Conc. [ng/μl]	Calib. Conc. [ng/μl]	% Total	Observations	Aligned Migration Time [s]
1	4.5	0.0	0.0	0.0	Lower Marker	17.00
2	5.9	0.0	0.0	0.0	System Peak	17.57
3	8.5	0.0	0.0	0.0	System Peak	18.57
4	43.2	6.8	0.0	100.0		25.30
5	240.0	60.0	0.0	0.0	Upper Marker	41.00



Figura 16: Eletroforese capilar da diluição da amostra obtida por FPLC partir de 0,5 pellet (400 mL) induzido em meio LB. Obteve-se a concentração 6,8 ng/μL e 100,0% de pureza (box vermelho/seta).

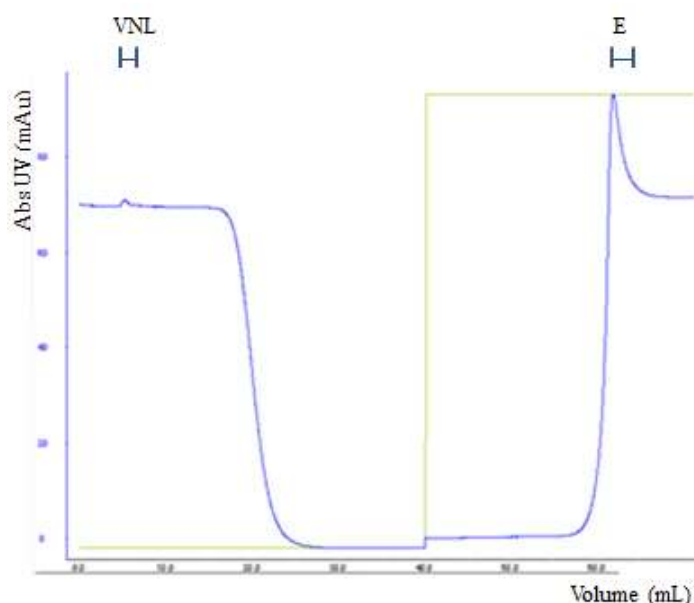
Com o objetivo de manter o grau de pureza da amostra próximo a 100,0% e aumentar a quantidade de amostra aplicada, foi feita uma purificação com gradiente de tampão de eluição usando 1 pellet referente a 400 mL de indução em meio LB. Para isto, o pellet (400 mL) induzido em meio LB foi submetido a pré-purificação B (seção 4.1.2) e purificado em FPLC usando o programa de purificação B (seção 4.1.4). O imidazol tem afinidade pelo níquel presente na coluna de cromatografia, e após a aplicação da amostra no equipamento é feita uma lavagem com tampão contendo 10 mM de imidazol a fim de retirar as proteínas não ligadas à coluna (VNL). Essa molaridade de imidazol permite que a proteína de interesse se ligue a coluna e dificulta as ligações inespecíficas. Após a lavagem, é feita a eluição usando o tampão contendo 300 mM de imidazol. Essa molaridade faz com que as proteínas se desliguem da coluna, uma vez que o níquel se ligará ao imidazol. Em todas as purificações realizadas até o momento, a eluição se iniciava com a passagem de 100% do tampão de eluição contendo 300 mM de imidazol (programa de purificação A, seção 4.1.4). Nesta nova purificação proposta, a eluição foi realizada aumentando gradativamente a quantidade de tampão de eluição. O cromatograma gerado não teve nenhum pico de proteína purificada. Uma possível explicação para isto é que a proteína pode ter sofrido mudanças conformacionais à medida que aumentava a concentração de imidazol, e não se desligou da coluna, nem mesmo quando atingiu 100% do tampão de eluição.

Sendo assim, a coluna de cromatografia foi lavada novamente com o tampão contendo 10 mM de imidazol, e posteriormente foi usado 100% do tampão de eluição contendo 300 mM de imidazol, para verificar se o aumento brusco na concentração de imidazol seria capaz de desligar as proteínas da coluna. O cromatograma apresenta um pico de purificação de proteína após a aplicação do tampão de eluição e a amostra foi chamada de pós-gradiente (Figura 17A). O volume não ligado (VNL) apresenta-se como um pequeno pico, uma vez que as proteínas não ligadas já foram eluídas anteriormente. O pico referente à proteína purificada (E) também foi menor do que os que foram gerados nas purificações anteriores.

A eletroforese capilar da amostra pós-gradiente forneceu valores abaixo do limite de detecção da técnica (14 ng/ μ L), uma vez que não apareceu nenhuma banda proteica na amostra, os picos gerados são apenas picos do sistema, referente aos padrões internos (Figura 17B). A proteína NTPDase-2 pode ter sido eluída aos poucos, durante a purificação com gradiente de tampão de eluição, não gerando nenhum pico devido a

diluição da amostra. Conclui-se então, que este processo não é conveniente para a purificação da NTPDase-2.

A)



B)

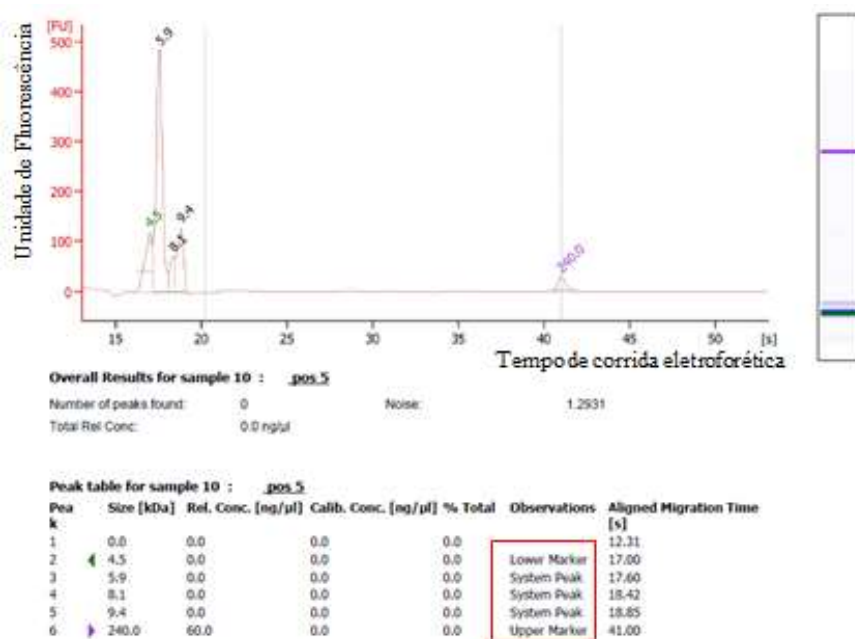


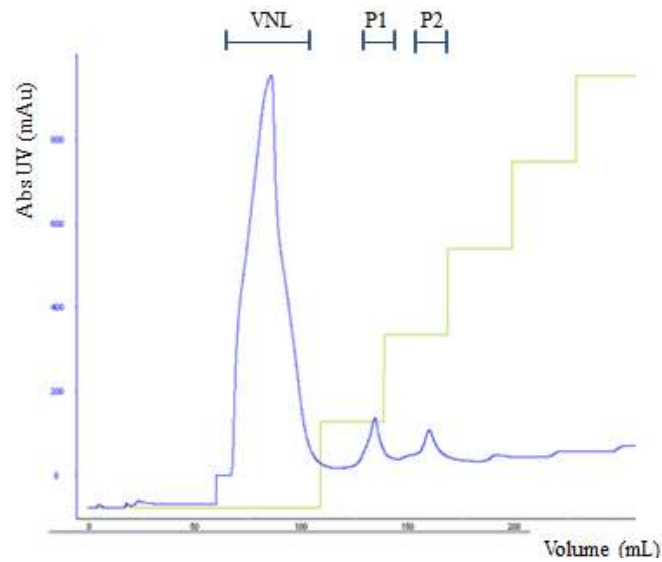
Figura 17: Perfil proteico da purificação pós-gradiente de tampão de eluição em FPLC usando 1 pellet de 400 mL induzido em meio LB em coluna HisPrep FF 16/10 (20 mL) de Ni-agarose. A) Cromatograma de purificação da proteína NTPDase-2 após o gradiente de tampão de eluição. O eixo y representa a absorvância a 280 nm, para quantificação proteica, medida em mAu e o eixo x representa o volume, em mL. A linha verde refere-se à concentração de imidazol no processo de purificação. VNL = Volume Não Ligado; E = eluição da NTPDase-2. B) Análise por eletroforese capilar da amostra obtida após gradiente de tampão de eluição. Não apareceu nenhuma proteína na amostra, apenas picos do sistema (box vermelho).

Uma nova estratégia de purificação foi testada usando steps (incrementos) de 20% no tampão de eluição e foi utilizado um pellet de 400 mL de indução em meio LB. A amostra foi submetida à pré-purificação B e a purificação em FPLC usando o programa de purificação C (seção 4.1.4).

Após a lavagem iniciou-se a eluição com 20% de tampão de eluição e 80% de tampão de lavagem. Após a passagem de 30 mL (um volume e meio de coluna), a eluição seguiu com 40% de tampão de eluição e 60% de tampão de lavagem, seguindo assim até atingir 100% de tampão de eluição, o que é ilustrado pela linha verde no cromatograma (Figura 18A). O cromatograma apresentou dois picos de purificação, sendo um dos picos em 20% de tampão de eluição (P1) e o outro em 40% de tampão de eluição (P2) (Figura 18A).

A eletroforese capilar da amostra P1, apresenta uma banda de 41,2 kDa representando a NTPDase-2, cuja concentração é 25,2 ng/ μ L e o grau de pureza é 63,7% (Figura 18B). A amostra P2 também foi analisada por eletroforese capilar, gerando valores de concentração e grau de pureza semelhantes ao P1 (dado não mostrado). A amostra possui mais três bandas proteicas que podem ser contaminantes, em 19,9; 60,7 e 99,0 kDa, com purezas iguais a 18,1; 9,6 e 8,9, respectivamente (Fig. 12B). Desta forma, é necessária uma metodologia de purificação que retire ou diminua a quantidade destes contaminantes. A metodologia de steps de 20% não trouxe melhorias ao processo de purificação.

A)



B)

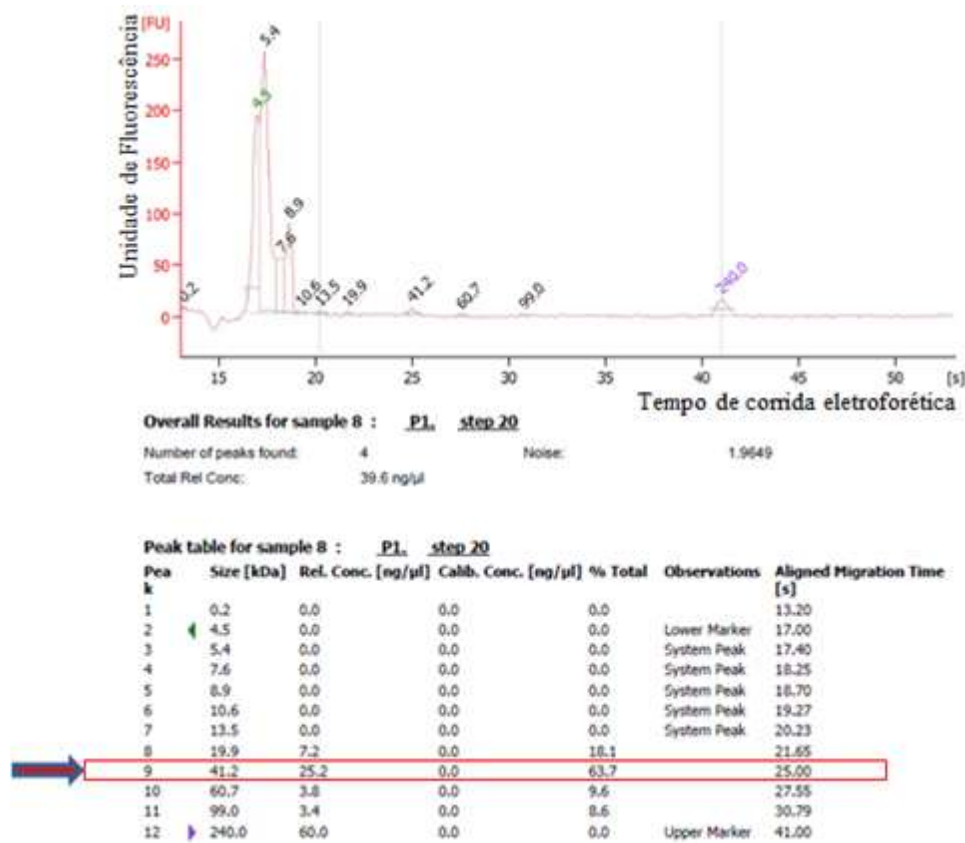


Figura 18: Purificação da proteína NTPDase-2 em FPLC com steps de 20% de tampão de eluição, usando 1 pellet (400 mL) induzido em meio LB em coluna HisPrep FF 16/10 (20 mL) de Ni-agarose.

A) Cromatograma de purificação apresenta dois picos de eluição (P1 e P2). O eixo y representa a absorbância a 280 nm, para quantificação proteica, medida em mAu e o eixo x representa o volume, em mL. A linha verde ilustra a concentração de imidazol no processo de purificação. VNL = Volume Não Ligado; P1 = pico 1; P2= pico 2. B) Eletroforese capilar da amostra obtida, a banda de 41,2 kDa representa a NTPDase-2, cuja concentração é 25,2 ng/μL e o grau de pureza é 63,7% (box vermelho, sseta). A amostra possui mais três bandas referentes a possíveis contaminantes, em 19,9; 60,7 e 99,0 kDa, com purezas iguais a 18,1%; 9,6% e 8,9%, respectivamente.

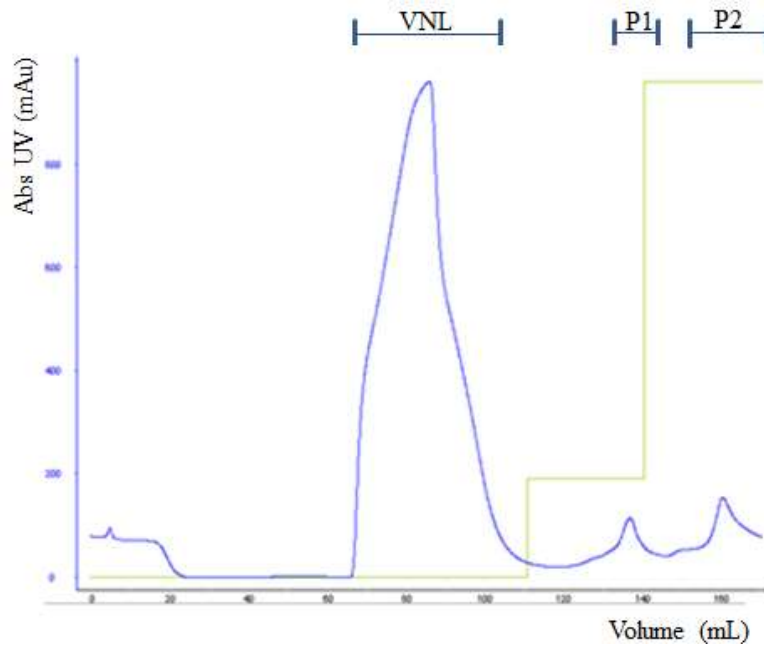
Uma nova purificação foi realizada usando apenas dois passos de eluição, sendo que os primeiros 30 mL da eluição foram feitos usando 20% de tampão de eluição e 80% do tampão de lavagem, e em seguida foi usado 100% do tampão de eluição, de acordo com o programa de purificação D em FPLC (descrito na seção 4.1.4). A amostra foi previamente submetida ao processo de pré-purificação B (seção 4.1.2).

A mudança brusca da molaridade de imidazol foi feita para não permitir que a proteína altere gradativamente sua conformação e permaneça ligada à coluna, como pode ter acontecido na purificação com gradiente de tampão de eluição. A linha verde no cromatograma ilustra os passos da eluição (Figura 19A). O objetivo é avaliar se os possíveis contaminantes visualizados na purificação com step de 20% de tampão de eluição (Figura 18), podem ser eluídos em 20% de tampão de eluição, e a proteína NTPDase-2 eluída em 100% de tampão de eluição.

O cromatograma de purificação apresentou dois picos de purificação, denominado como P1 e P2, sendo que P1 foi obtido em 20% de tampão de eluição e P2 em 40% de tampão de eluição (Figura 19A).

A eletroforese capilar do P2 apresenta a proteína de interesse em 40,4 kDa e forneceu concentração igual a 40,5 ng/ μ L e pureza de 62,6% (Figura 19B). Novamente a concentração e o grau de pureza encontrados foram menores que o esperado, isto indica que essa estratégia de purificação não foi efetiva para eliminar os contaminantes.

A)



B)

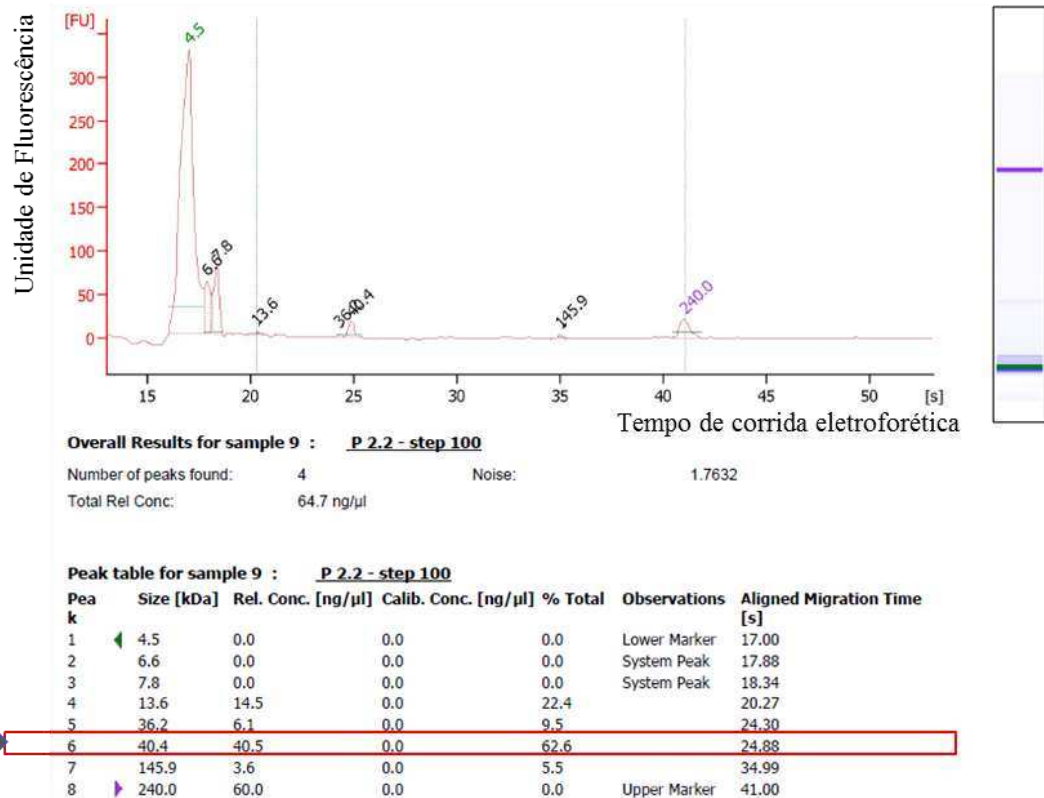
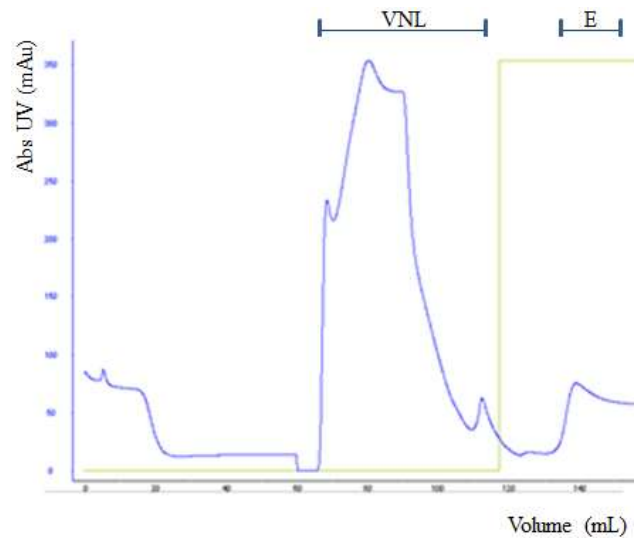


Figura 19: Purificação da proteína NTPDase-2 em FPLC usando dois passos de eluição, 20% de tampão de eluição e 100% de tampão de eluição, usando 1 pellet (400 mL) induzido em meio LB em coluna HisPrep FF 16/10 (20 mL) de Ni-agarose. A) Cromatograma de purificação apresenta dois picos de purificação (P1 e P2). O eixo y representa a absorbância a 280 nm, para quantificação proteica, medida em mAu e o eixo x representa o volume, em mL. A linha verde ilustra a concentração de imidazol no processo de purificação. VNL = Volume Não Ligado; P1 = pico 1; P2= pico 2. B) Eletroforese capilar da amostra obtida, a banda de 40,4 kDa representa a NTPDase-2, cuja concentração é 40,5 ng/μL e o grau de pureza é 62,6% (box vermelho, seta).

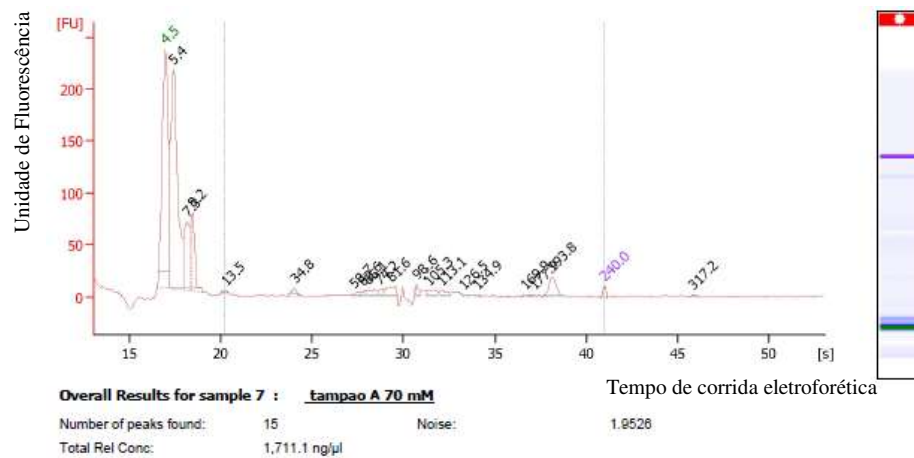
Outra metodologia testada foi aumentar a molaridade de imidazol do tampão de lavagem de 10 mM para 70 mM. A amostra foi submetida à pré-purificação B e pelo programa de purificação A em FPLC. O uso de 70 mM de imidazol no tampão de lavagem permitiria que possíveis contaminantes saíssem no volume não ligado (VNL). O cromatograma gerado não possui um pico expressivo (Figura 20A).

Devido a um erro durante a corrida na eletroforese capilar, em que o sinal óptico da amostra foi muito alto, os dados de concentração e pureza das proteínas não estão confiáveis, mas pode-se verificar que não existe nenhuma banda com tamanho próximo de 43 kDa, que pudesse indicar a proteína de interesse, logo a metodologia não foi eficaz para a purificação dessa proteína (Figura 20B). Isto indica que possivelmente, 70 mM de imidazol é suficiente para desligar a proteína NTPDase-2 da coluna de purificação, sendo eluída no volume não ligado (VNL) juntamente com as demais proteínas.

A)



B)



Peak table for sample 7 : tampao A 70 mM

Peak	Size [kDa]	Rel. Conc. [ng/ul]	Calib. Conc. [ng/ul]	% Total	Observations	Aligned Migration Time [s]
1	4.5	0.0	0.0	0.0	Lower Marker	17.00
2	5.4	0.0	0.0	0.0	System Peak	17.40
3	7.3	0.0	0.0	0.0	System Peak	18.15
4	8.2	0.0	0.0	0.0	System Peak	18.45
5	13.5	80.4	0.0	4.7		20.25
6	34.8	148.8	0.0	8.7		24.10
7	58.7	76.2	0.0	4.5		27.30
8	62.6	58.9	0.0	3.4		27.80
9	66.1	161.6	0.0	9.4		28.10
10	74.2	96.0	0.0	5.6		28.75
11	81.6	278.3	0.0	16.3		29.35
12	98.6	110.8	0.0	6.5		30.75
13	105.3	133.1	0.0	7.8		31.35
14	113.1	114.8	0.0	6.7		32.05
15	126.5	27.6	0.0	1.6		33.25
16	134.9	22.3	0.0	1.3		34.00
17	169.9	25.9	0.0	1.5		36.60
18	177.9	16.2	0.0	0.9		37.10
19	193.8	360.2	0.0	21.1		38.10
20	240.0	60.0	0.0	0.0	Upper Marker	41.00

Figura 20: Purificação da NTPDase-2 em FPLC, usando tampão de lavagem com 70 mM de imidazol e 1 pellet (400 mL) induzido em meio LB em coluna HisPrep FF 16/10 (20 mL) de Ni-agarose. A) Cromatograma de purificação da proteína NTPDase-2. O eixo y representa a absorbância a 280 nm, para quantificação proteica, medida em mAu e o eixo x representa o volume, em mL. A linha verde refere-se à concentração de imidazol no processo de purificação. VNL = Volume Não Ligado; E = eluição da NTPDase-2. B) Eletroforese capilar da amostra obtida não apresenta nenhuma banda com tamanho próximo ao da proteína de interesse, 43 kDa. Os dados de concentração e pureza não estão confiáveis devido a um erro durante a corrida eletroforética.

Uma das formas de eliminar contaminantes e aumentar a pureza da amostra purificada é acrescentar etapas de ultracentrifugação ao processo. A ultracentrifugação garante que apenas as partículas solúveis permanecerão no sobrenadante. Sendo assim, foram testadas duas metodologias incluindo ultracentrifugação. Na primeira metodologia, a amostra foi submetida à pré-purificação C (seção 4.1.2) e purificada segundo o programa de purificação A em FPLC (seção 4.1.4). Neste processo os passos de centrifugação da pré-purificação B (12.000 x g por 10 minutos) foram substituídos pela ultracentrifugação (197.000 x g por 40 minutos).

Na segunda metodologia, a amostra foi submetida à pré-purificação D (seção 4.1.2) e purificada segundo o programa de purificação A (seção 4.1.4). Neste processo, a ultracentrifugação (197.000 x g por 40 minutos), foi adicionada ao protocolo de pré-purificação B (seção 4.1.2). As duas metodologias foram feitas usando um pellet de 400 mL de indução em meio LB.

Os cromatogramas das duas purificações estão na figura 21, sendo que a figura 21A refere-se à amostra obtida pela pré-purificação C e a figura 21B refere-se à amostra obtida pela pré-purificação D. Embora o pico do cromatograma na figura 21B pareça maior, a escala do gráfico é menor, porque neste processo o volume não ligado é menor, atingindo apenas 800 mAU, enquanto que na figura 21A, o volume não ligado atinge mais de 1500 mAU. Logo, os dois picos são similares.

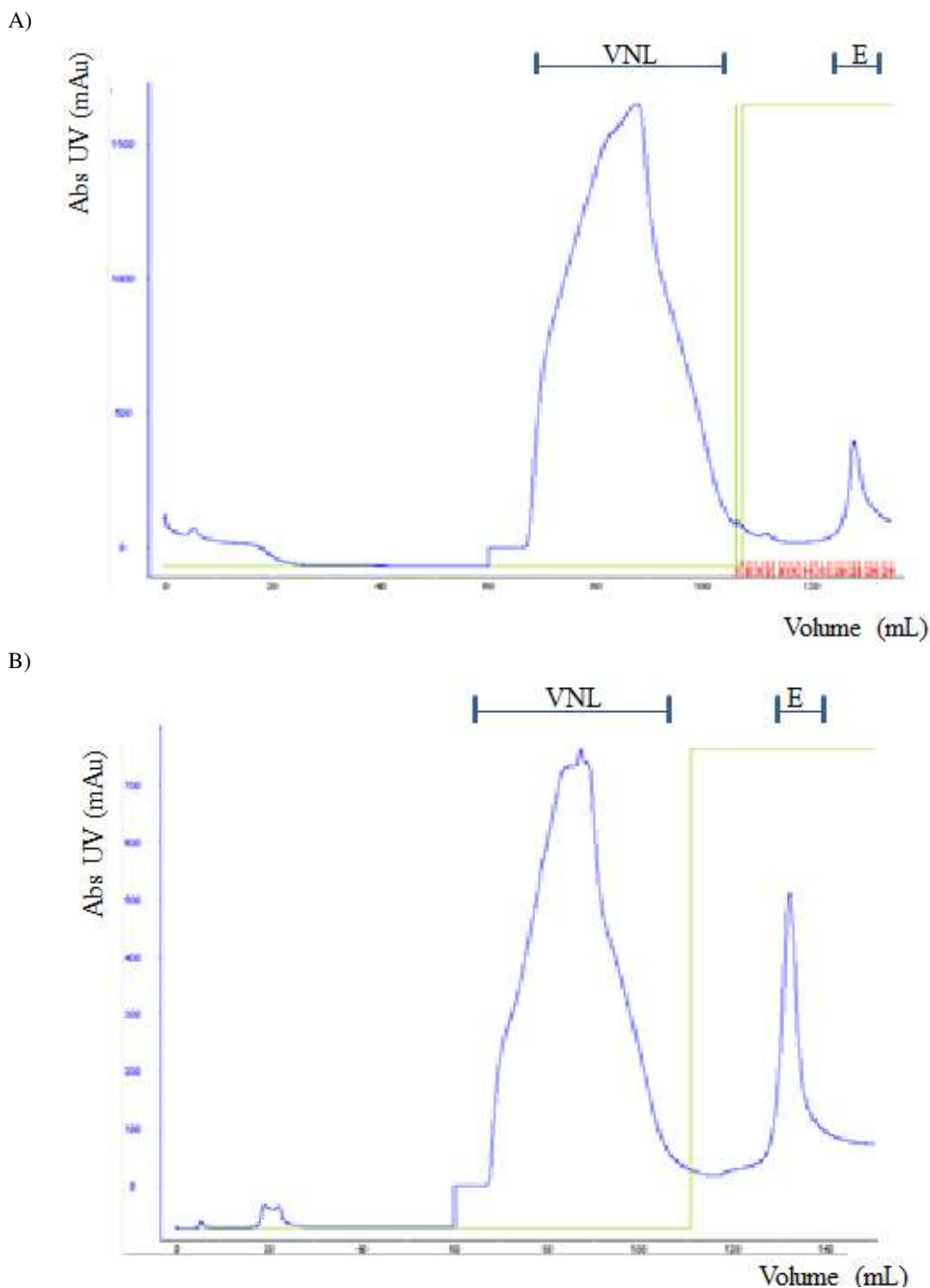
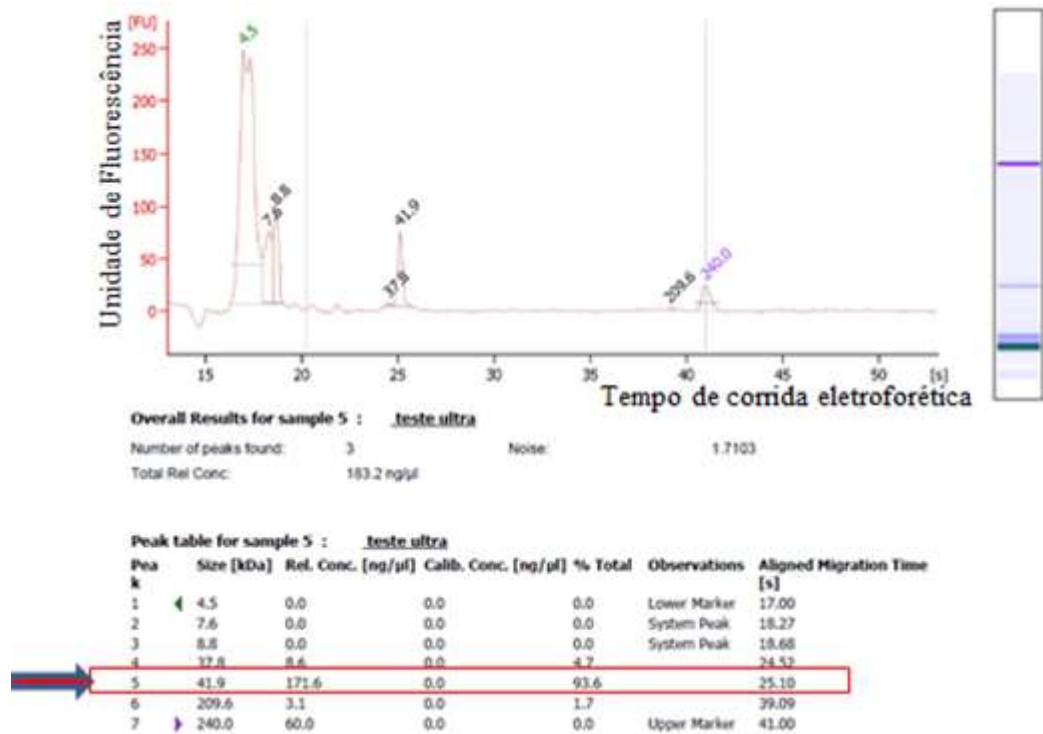


Figura 21: Cromatograma da purificação da NTPDase-2 em FPLC, após ultracentrifugação prévia, usando coluna HisPrep FF 16/10 (20 mL) de Ni-agarose e 1 pellet (400 mL) induzido em meio LB. A) Substituição das centrifugações convencionais por ultracentrifugação (pré-purificação C). B) Acréscimo do processo de ultracentrifugação (pré-purificação D). Os picos gerados possuem alturas compatíveis, uma vez que as escalas dos dois gráficos são diferentes. Os eixos y representam a absorbância a 280 nm, para quantificação proteica, medida em mAu e os eixos x representam os volumes, em mL. As linhas verdes referem-se à concentração de imidazol no processo de purificação. VNL = Volume Não Ligado; E = eluição da NTPDase-2.

Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese capilar. A amostra obtida pela pré-purificação C, a banda referente à proteína de interesse apresentou-se em 41,9 kDa, com concentração igual a 171,6 ng/μL e grau de pureza 93,6% (Figura 22A). Enquanto que a amostra obtida pela pré-purificação D, a NTPDase-2 apareceu em 42,0 kDa, com concentração igual a 195,4 ng/μL e grau de pureza de 90,6% (Figura 22B). Ambos os processos foram eficientes para obtenção de alto grau de pureza das amostras, sendo que o primeiro processo foi mais rápido que o segundo, uma vez que elimina algumas etapas.

A)



B)

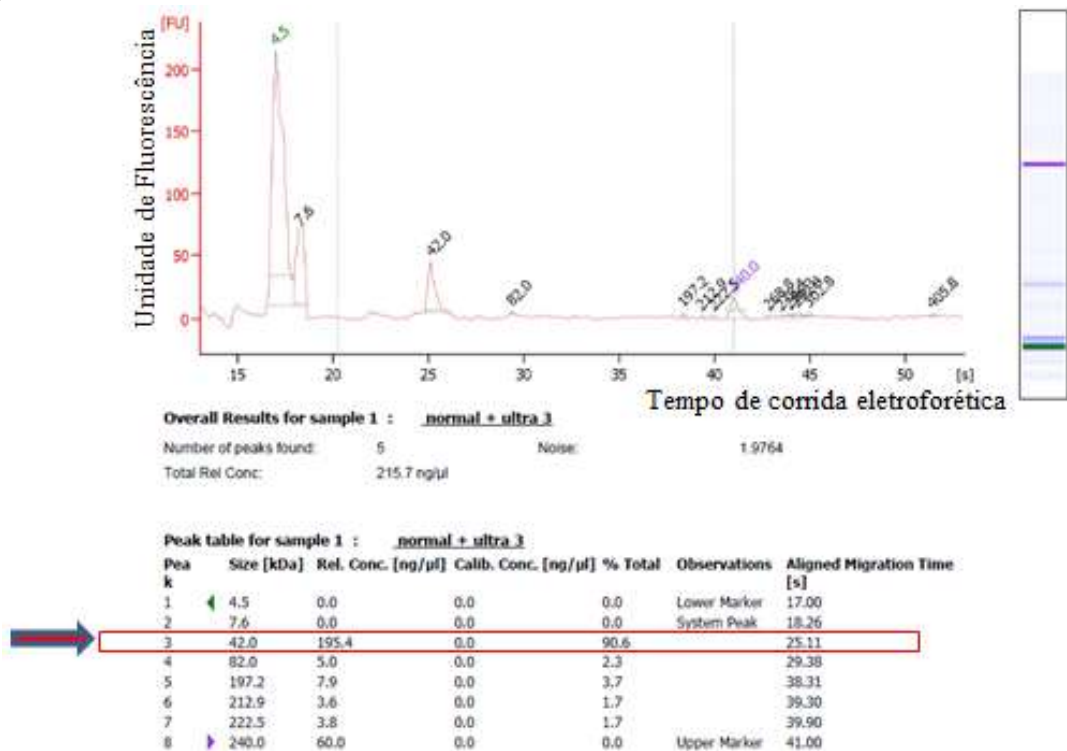
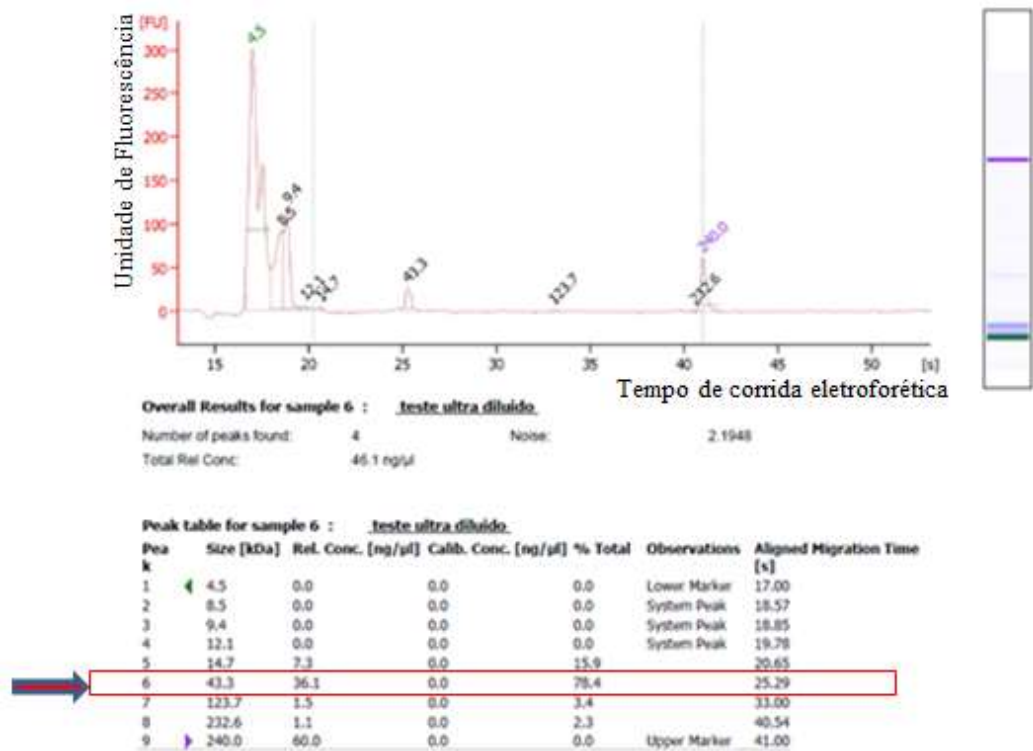


Figura 22: Eletroforese capilar das amostras submetidas a ultracentrifugação prévia à purificação em FPLC usando 1 pellet (400 mL) induzido em meio LB, em coluna HisPrep FF 16/10 (20 mL) de Ni-agarose. A) Substituição das centrifugações por ultracentrifugação (pré-purificação C). A banda referente à proteína NTPDase-2 apresenta-se em 41,9 kDa, com concentração igual 171,6 ng/μL e grau de pureza 93,6% (box vermelho, seta). B) Acréscimo da ultracentrifugação (pré-purificação D). A NTPDase-2 apresenta-se em 42,0 kDa, com concentração igual a 195,4 ng/μL e 90,4% de pureza (box vermelho, seta).

As duas amostras obtidas por ultracentrifugação, foram diluídas e submetidas novamente à eletroforese capilar, a fim de avaliar se o grau de pureza iria se manter alto quando a proteína for diluída para aplicação no ELISA. Além disso, foi avaliado se o grau de pureza se aproximava das purificações manuais quando as amostras eram diluídas. A diluição foi realizada com base nos resultados do ensaio de Bradford (1045 e 1098 ng/μL, respectivamente), e foi ajustado para 141,6 ng/μL, a menor concentração das amostras purificadas manualmente.

Na eletroforese capilar da amostra obtida pela pré-purificação C diluída, a banda referente à proteína NTPDase-2 apresentou-se em 43,3 kDa, com concentração igual 36,1 ng/μL e grau de pureza 78,4% (Figura 23A). Na amostra obtida pela pré-purificação D diluída, a NTPDase-2 apresentou-se em 43,5 kDa, com concentração igual a 50,6 ng/μL e 94,1% de pureza (Figura 23B). As concentrações encontradas foram bem mais baixas que o esperado, uma vez que a diluição foi ajustada com base nos resultados do ensaio de Bradford, que superestimou a concentração proteica. A amostra obtida pela pré-purificação C, teve uma queda no grau de pureza quando foi diluída, enquanto que a amostra obtida por pré-purificação D manteve o grau de pureza alto, sendo a melhor metodologia encontrada para conciliar maior volume aplicado no FPLC e alto grau de pureza.

A)



B)

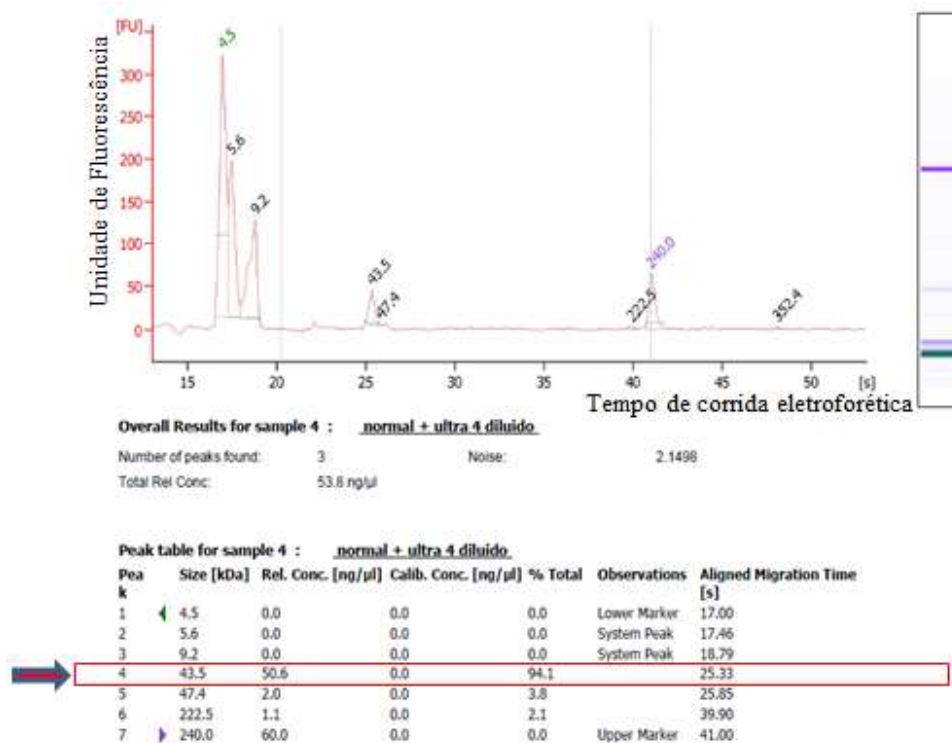
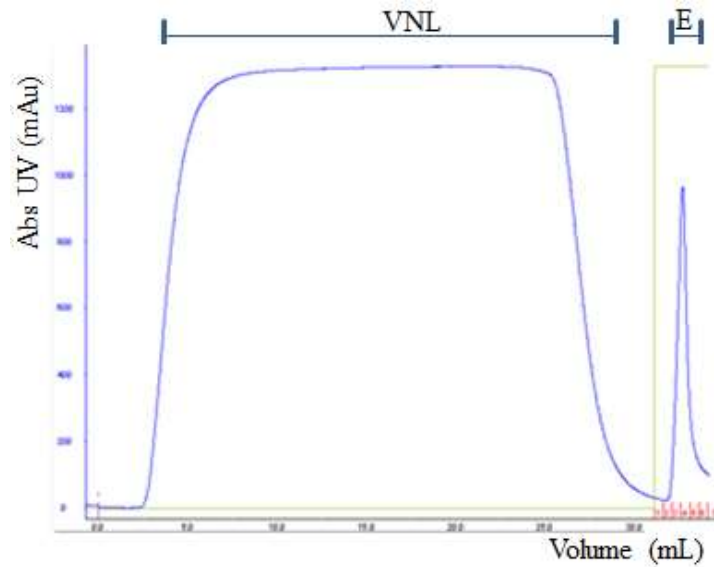


Figura 23: Eletroforese capilar das amostras diluídas submetidas à ultracentrifugação prévia à purificação em FPLC usando 1 pellet (400 mL) induzido em meio LB, em coluna HisPrep FF 16/10 (20 mL) de Ni-agarose. A) Substituição das centrifugações por ultracentrifugação (pré-purificação C). A banda referente à proteína NTPDase-2 apresentou-se em 43,3 kDa, com concentração igual 36,1 ng/μL e grau de pureza 78,4% (box vermelho, seta). B) Acréscimo da ultracentrifugação (pré-purificação D). NTPDase-2 apresenta-se em 43,5 kDa, com concentração igual a 50,6 ng/μL e 94,1% de pureza (box vermelho, seta).

Foi testada também, a mesma metodologia aplicando 0,5 pellet (400 mL) induzido em LB em FPLC com coluna de purificação HisTrap FF crude (1 mL) de Ni-agarose. O cromatograma desta purificação é mostrado na Figura 24A. Na eletroforese capilar a NTPDase-2 apresentou-se na banda de 49,4 kDa, com concentração igual a 394,4 ng/ μ L e grau de pureza é 58,6% (Figura 24B). A amostra não forneceu grau de pureza elevado como na purificação usando a coluna de 20 mL. Logo, a coluna HisTrap FF crude (1 mL) não é adequada para a purificação da proteína de interesse com alto grau de pureza nestas condições.

A)



B)

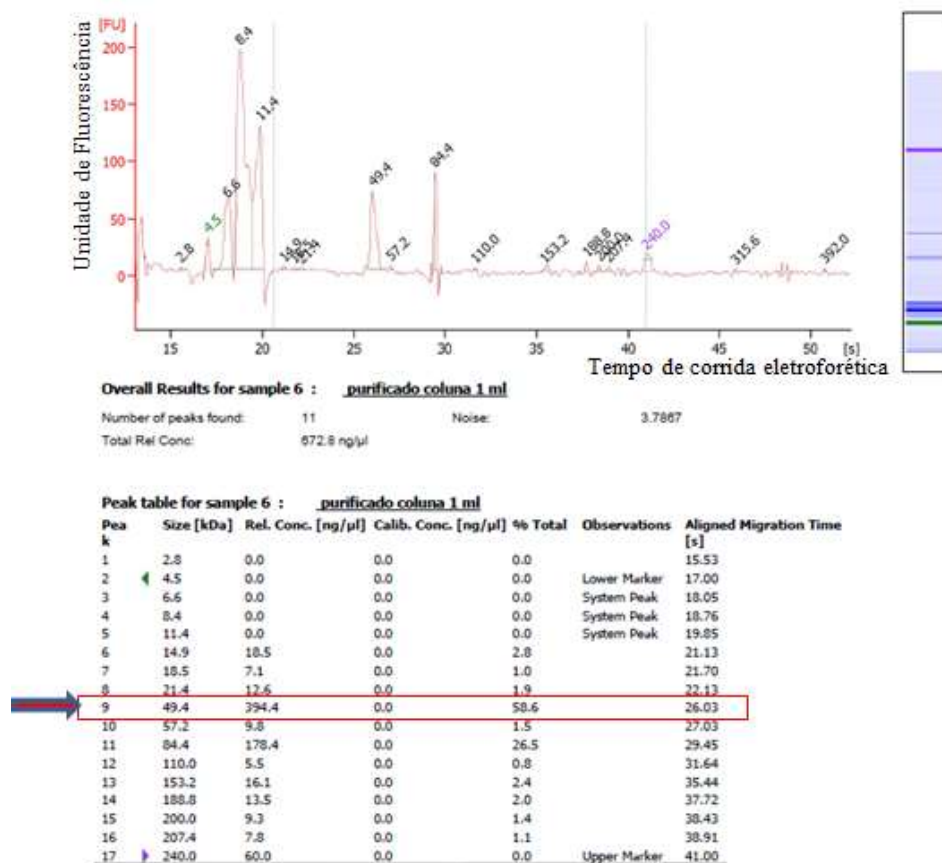


Figura 24: Cromatograma da purificação em FPLC em coluna HisTrap FF crude (1 mL) de Niagarose de 1 mL, aplicando 0,5 pellet (400 mL) induzido em meio LB. A) Cromatograma da purificação apresentou um pico único de purificação (E). Os eixos y representam a absorbância a 280 nm, para quantificação proteica, medida em mAu e os eixos x representam os volumes, em mL. As linhas verdes referem-se à concentração de imidazol no processo de purificação. VNL = Volume Não Ligado; E = eluição da NTPDase-2. B) Eletroforese capilar da amostra obtida, a banda de 49,4 kDa representa a NTPDase-2, cuja concentração é 394,4 ng/μL e o grau de pureza é 58,6%.

Foi realizado o rendimento para a purificação em FPLC usando 0,5 pellet e 1 pellet, referentes a 400 mL de indução em meio LB em coluna HisPrep FF 16/10 (20 mL) de Ni-agarose. As concentrações foram obtidas pelo ensaio de Bradford. A tabela 2 apresenta os volumes e as concentrações de cada etapa da purificação de 0,5 pellet (400 mL) induzido em meio LB. O extrato foi diluído 20 vezes para fazer o ensaio de Bradford, a fim de não extrapolar o limite de detecção do ensaio. Após a diluição, a concentração encontrada para o extrato foi 1,459 mg/mL, multiplicando por 20, tem-se a concentração de proteínas totais do extrato, 29,197 mg/mL. A quantidade de proteína em cada etapa foi calculada multiplicando o volume pela concentração da amostra de cada etapa. As lavagens seguidas pelas centrifugações geraram os sobrenadantes 1, 2 e 3. A amostra purificada obtida teve concentração igual a 0,717 mg/mL, e volume de 2,7 mL. Logo, obteve-se 1,936 mg de proteína purificada a partir de 200 mL de indução em meio LB por essa metodologia, extrapolando este valor para 1 L de meio, tem-se 9,68 mg/L de meio LB. O rendimento da purificação foi 2,88%, um vez que obteve-se 1,936 mg de proteína purificada a partir de 67,154 mg de proteínas.

Tabela 2: Rendimento da purificação em FPLC usando 0,5 pellet (400 mL) induzido em meio LB, em coluna HisPrep FF 16/10 (20 mL). Concentrações baseadas no ensaio de Bradford (Bradford, 1976).

Etapa	Volume (mL)	Concentração (mg/mL)	Quantidade de proteínas (mg)
Extrato diluído 20x	2,3	1,459 $1,459 \times 20 = 29,197$	67,154
Sobrenadante 1	2	1,457	2,914
Sobrenadante 2	19	0,645	12,274
Sobrenadante 3	21	0,245	5,145
Solubilizado	21	0,682	14,322
Purificado	2,7	0,717	1,9359
Rendimento			2,88%

A tabela 3 apresenta os volumes e as concentrações de cada etapa da purificação de 1 pellet (400 mL) induzido em meio LB usando a coluna HisPrep FF 16/10 (20 mL) de Ni-agarose. Assim como na tabela anterior, a concentração do extrato foi medida com a amostra diluída 20 vezes. Após a diluição, a concentração encontrada para o extrato foi 1,321 mg/mL, multiplicando por 20, tem-se a concentração de proteínas totais do extrato, 26,42 mg/mL. A amostra purificada obtida teve concentração igual a 0,507 mg/mL, e volume de 7,0 mL. Logo, obteve-se 3,549 mg de proteína purificada em 400 mL de meio LB, extrapolando este valor para 1 L de meio, tem-se 8,873 mg/L de meio LB. O rendimento da purificação foi 2,58%, um vez que obteve-se 3,549 mg de proteína purificada a partir de 137,384 mg de proteínas. Sendo assim, a purificação usando 400 mL de indução em meio LB rendeu 10, 41% menos do que usando 200 mL de indução em meio LB.

Tabela 3: Rendimento da purificação em FPLC usando 1 pellet (400 mL) induzido em meio LB, em coluna HisPrep FF 16/10 (20 mL). Concentrações baseadas no ensaio de Bradford (Bradford, 1976).

Etapa	Volume (mL)	Concentração (mg/mL)	Quantidade de proteínas (mg)
Extrato diluído 20x	5,2	1,321 1,225 x 20 = 26,42	137,384
1º sobrenadante	5,3	1,676	8,8828
2º sobrenadante	20	1,398	27,960
3º sobrenadante	20	0,815	16,300
Solubilizado	19	1,160	22,04
Purificado	7	0,507	3,549
Rendimento			2,58%

A tabela 4 apresenta um resumo com todos os resultados obtidos de concentração e grau de pureza obtidos pela eletroforese capilar, e rendimento para todas as metodologias testadas.

Tabela 4: Resumo dos resultados de concentração e pureza para todas as metodologias testadas. A sigla LD refere-se ao Limite de Detecção da técnica e a sigla NC significa resultado Não Confiável, devido a erro na eletroforese capilar. O símbolo (*) indica que o rendimento foi calculado com base no ensaio de Bradford (Bradford, 1976), os demais resultados foram calculados pela eletroforese capilar.

Metodologia	Concentração NTPDase-2 Eletroforese capilar (ng/ µL)	Pureza NTPDase-2 Eletroforese capilar (%)	Rendimento por litro de indução (mg/L)
FPLC Meio SOC / 12 pellets	876,9	76,4	2,01
Diluição	98,4	75,3	
Manual Meio SOC/ 2 pellets	141,6	100,0	0,354
FPLC Meio LB / 12 pellets	717,2	83,9	
Diluição	69,7	76	
Manual Meio LB / 2 pellets	204,4	96,5	
FPLC Meio LB / 2 pellets	356,9	73,2	
Diluição	16,3	80	
FPLC Meio LB / 1 pellet			8,87*
FPLC Meio LB /0,5 pellet	178,2	96,6	9,68 *
Diluição	6,8	100,0	
FPLC Meio LB / 1 pellet/ Gradiente	Abaixo LD		

FPLC Meio LB / 1 pellet / Steps de 20% tampão de eluição	25,2	63,7	
FPLC Meio LB / 1 pellet 20% e 100% de tampão de eluição	40,5	62,6	
FPLC Meio LB / 1 pellet /Tampão de lavagem com 70 mM	NC	NC	
FPLC Meio LB / 1 pellet Pré-purificação C	171,6	93,6	
Diluição	36,1	78,4	
FPLC Meio LB / 1 pellet Pré-purificação D	195,4	90,6	
Diluição	50,6	94,1	
FPLC Meio LB / 1 pellet Coluna de 1 mL	394,4	58,6	

Os dados da tabela acima evidenciam que o processo de purificação em sistema manual (*batch*) fornece amostras com maior grau de pureza do que as amostras obtidas por sistema automatizado (FPLC), uma vez que o uso de 2 pellets em meio LB forneceu grau de pureza igual a 96,5% para o sistema manual e 73,2 para o sistema automatizado. No entanto, o processo de purificação em FPLC possibilita o uso de grandes quantidades de amostra e apresenta rendimento maior do que o sistema manual (0,354 mg/L para a purificação manual com uso de 2 pellets e 9,86 mg/L para a purificação em FPLC com uso de 0,5 pellet). Além disso, a quantidade de amostra aplicada no FPLC influencia os resultados de pureza e rendimento da técnica, sendo que o uso de 0,5 pellet relativo a 400 mL de indução em meio LB forneceu altos valores de pureza e rendimento.

Os dois meios de indução testados não resultaram em aumento na concentração ou no grau de pureza das amostras obtidas, sendo assim a indução foi padronizada em meio LB, uma vez que este meio de cultivo é mais barato.

A purificação em FPLC com gradiente de tampão de eluição, com o uso de steps de 20% de tampão de eluição, com dois passos de eluição em 20% e 100% de tampão de eluição e o uso de tampão de lavagem com 70 mM de imidazol não foram adequadas para o processo de purificação usado, uma vez que não forneceram melhorias na concentração ou no grau de pureza das amostras.

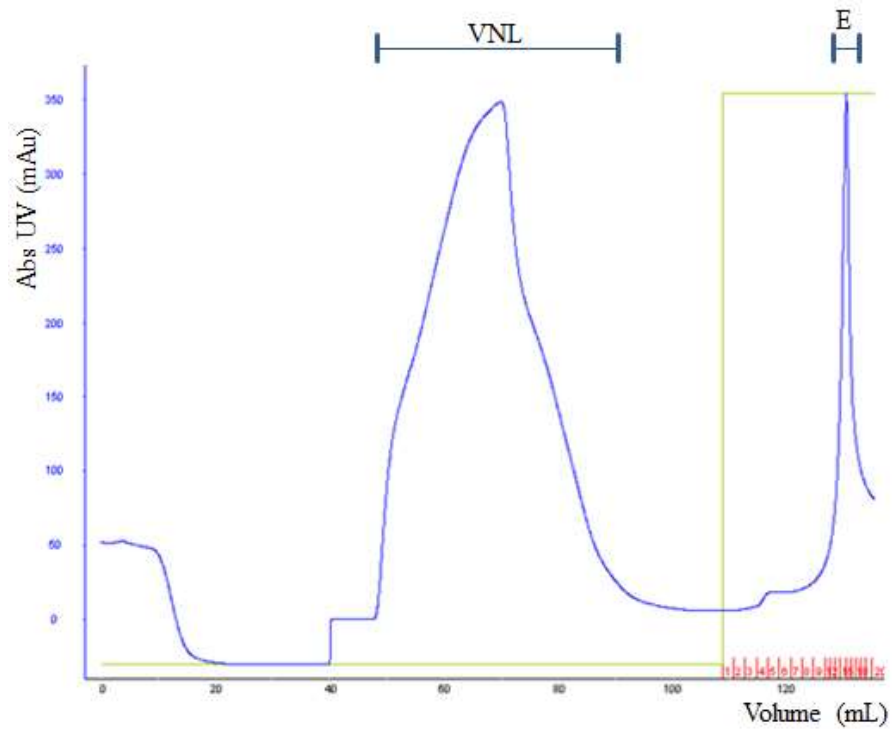
A pré-purificação C (substituição da centrifugação por ultracentrifugação) aumentou o grau de pureza da amostra (93,6%). No entanto, quando a amostra foi diluída o grau de pureza foi reduzido (78,4%), o que torna o processo inviável para uso no ELISA, uma vez que esta técnica usa o antígeno diluído. Já a pré-purificação D (acrécimo da ultracentrifugação), forneceu alto grau de pureza da amostra, que se manteve após a diluição. Sendo assim, o acréscimo da ultracentrifugação é uma forma de obter alto grau de pureza associado a maior quantidade de proteína purificada.

A substituição da coluna HisPrep FF 16/10 (20 mL) pela coluna HisTrap FF crude (1 mL), ambas de resina de Ni-agarose, não forneceu alto grau de pureza, portanto, não é ideal para obtenção do antígeno.

5.1.5 Estabilidade da proteína NTPDase-2 purificada

A fim de avaliar a estabilidade da proteína NTPDase-2 purificada, foram feitas quatro purificações. A amostra foi submetida à pré-purificação B e purificada em FPLC segundo o programa de purificação A usando a coluna HisPrep FF 16/10 (20 mL) e aplicando 0,5 pellet (400 mL) induzido em meio LB. A figura 25A mostra o cromatograma de uma das purificações, que apresenta o volume não ligado (VNL) seguido por um pico único de referente à eluição da proteína (E). A eletroforese em SDS-PAGE revelou a presença de uma única banda de proteínas com alto grau de enriquecimento em relação aos contaminantes (Figura 25B).

A)



B)

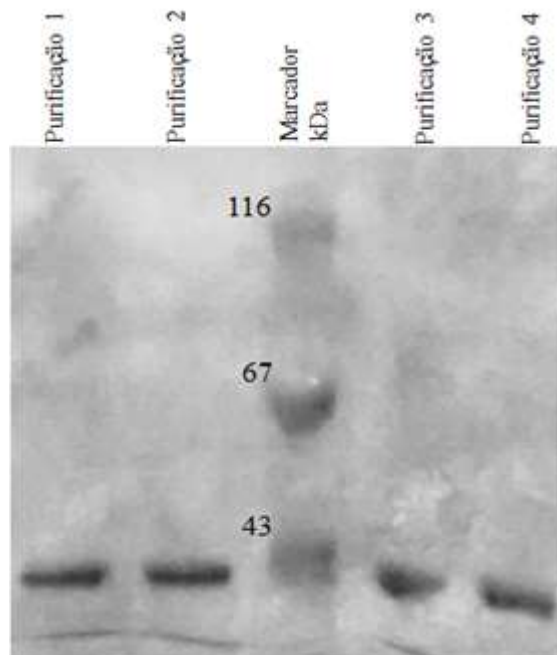


Figura 25: Perfil proteico das purificações no T0 de estabilidade. A) Cromatograma de purificação da proteína NTPDase-2, usando 0,5 pellet (400 mL) induzido em meio LB em coluna HisPrep FF 16/10 (20 mL) em FPLC. O eixo y representa a absorbância a 280 nm, para quantificação proteica, medida em mAu e o eixo x representa o volume, em mL. A linha verde refere-se à concentração de imidazol no processo de purificação. VNL = Volume Não Ligado; E = eluição da NTPDase-2. B) SDS-PAGE 12% corado com Comassie blue, a terceira canaleta refere-se ao marcador, as demais canaletas referem-se às purificações. As bandas referentes à proteína de interesse apresentam-se em 43 kDa.

Cada purificação gerou, em média 2,7 mL de proteína purificada, que foi unido em um pool com aproximadamente 10,8 mL. Essa amostra foi dividida em 154 tubos de 0,5 mL, cada um contendo 70 μ L. Metade dessas amostras foi mantida em solução, enquanto que a outra metade foi liofilizada. As amostras em solução e liofilizadas foram mantidas a 22° C, 4° C e -20° C. O monitoramento da proteína foi realizado por SDS-PAGE 12% (Figura 26) e pelo ensaio de Bradford (Tabela 5). O SDS-PAGE apresenta cada uma das condições testadas no T0 e representa as condições da proteína no início do experimento de estabilidade (Figura 26A). A concentração de cada uma das condições testadas foi obtida pelo ensaio de Bradford, T0 (zero dias), T1 (14 dias), T2 (28 dias) e T3 (42 dias), e continuarão a serem medidas a cada 14 dias, por um ano ou até que a proteína seja degradada (Tabela 5). O ensaio de Bradford no T0 indica que a concentração das amostras liofilizadas é significativamente menor que a concentração das amostras em solução, isso ocorreu, provavelmente, devido à perda de amostra durante o processo de liofilização.

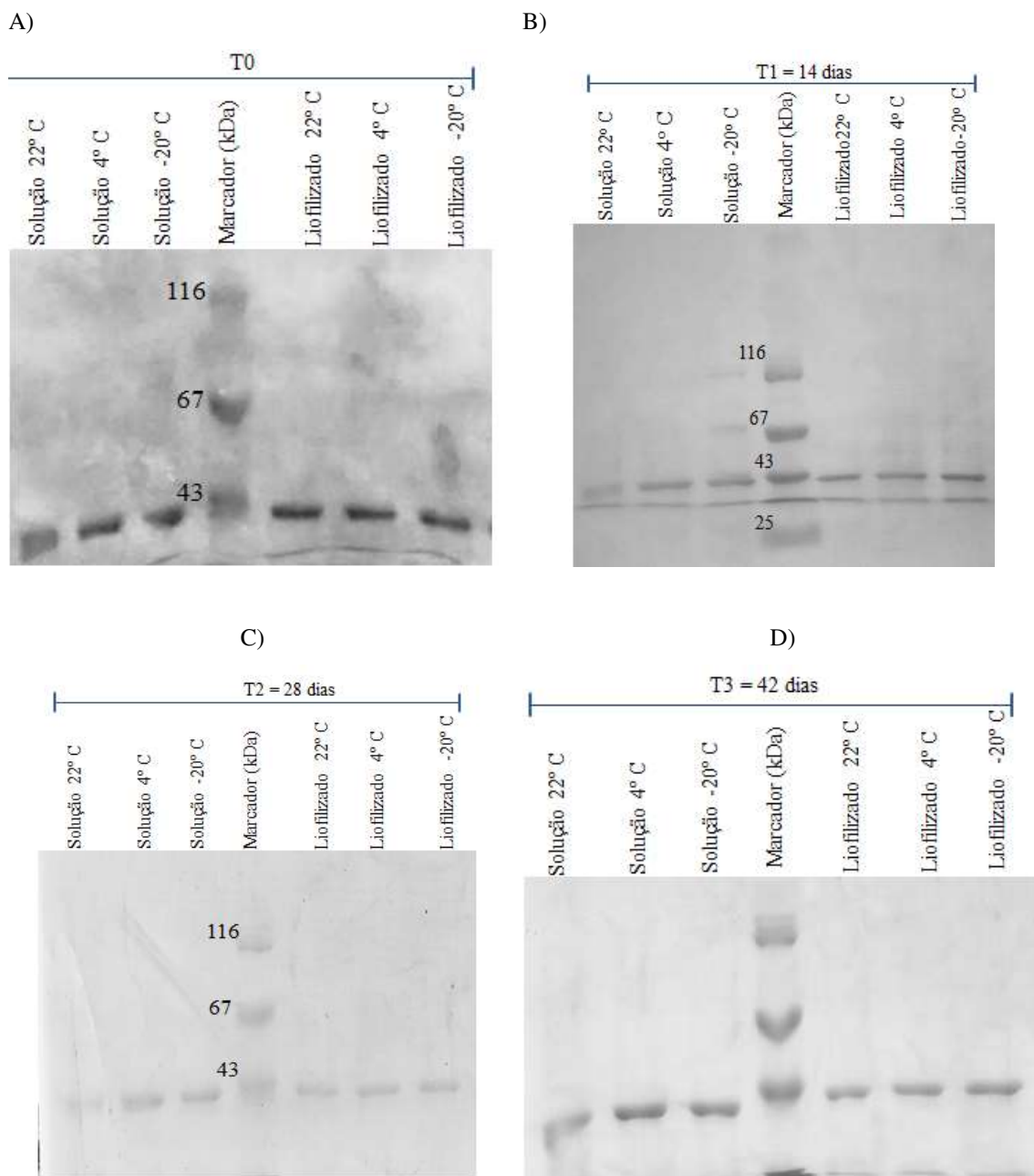


Figura 26: Análise da estabilidade da proteína NTPDase-2 por SDS-Page 12%. A) Proteínas purificadas mantidas em diferentes condições no T0, ou seja, no início do experimento. B) As mesmas condições no T1, após 14 dias. C) T2, após 28 dias. D) T3, após 42 dias.

Tabela 5: Análise da estabilidade proteica da rNTPDase-2 mantidas em diferentes condições dosada pelo ensaio de Bradford. T0 (zero dias), T1 (14 dias), T2 (28 dias) e T3 (42 dias). O símbolo (*) representa perda de concentração proteica significativa em relação à T0.

Condição	T0 (mg/mL)	T1 (mg/mL)	T2 (mg/mL)	T3 (mg/mL)
Solução 22° C	0,407 ± 0,024	0,419 ± 0,040	0,347 ± 0,010	0,255 ± 0,091*
Solução 4° C	0,451 ± 0,059	0,389 ± 0,022	0,398 ± 0,031	0,321 ± 0,047*
Solução -20° C	0,428 ± 0,024	0,493 ± 0,027	0,304 ± 0,064*	0,181 ± 0,037*
Liofilizado 22° C	0,281 ± 0,041	0,177 ± 0,024*	0,166 ± 0,039*	0,097 ± 0,020*
Liofilizado 4° C	0,272 ± 0,041	0,317 ± 0,087	0,166 ± 0,007	0,114 ± 0,013*
Liofilizado -20° C	0,281 ± 0,023	0,310 ± 0,046	<u>0,639 ± 0,037</u>	0,150 ± 0,023*

Os dados da tabela mostram que houve perda significativa da concentração proteica nos primeiros 14 dias (T1) apenas para a amostra mantida liofilizada a 22° C. Em 28 dias (T2) as amostras mantidas em solução a -20° C e liofilizada a 22° C tiveram perda de concentração proteica. Para a amostra liofilizada a -20° C (valor sublinhado) a concentração proteica aumentou, sugerindo um erro técnico durante o ensaio de Bradford, no entanto, em T3 essa amostra teve perda proteica significativa.

As melhores condições de armazenamento para a rNTPDase-2 em solução são a 4° C e a 22° C, sendo que quando essas duas amostras são comparadas após 42 dias (T3) não apresentam diferença entre elas. Para as amostras liofilizadas, as melhores condições de armazenamento são a 4° C e a -20° C.

Comparando todos os valores de concentração fornecidos após 42 dias (T3), as melhores condições de armazenamento, que tiveram menor perda proteica, foram em solução a 4° C e a 22° C. Essas condições são mais fáceis de serem mantidas para o trabalho de campo, e representarão uma vantagem no uso da rNTPDase-2 como antígeno no teste imunocromatográfico para o diagnóstico em campo da LVC.

5.2 Padronização do Diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina (LVC) por Imunocromatografia usando o Antígeno NTPDase-2 de *Leishmania infantum chagasi*

O protótipo do kit de diagnóstico por imunocromatografia desejado se encontra na figura 27. A membrana da amostra seria o local de aplicação do soro do cão. Para o conjugado com ouro coloidal foi testada a proteína A de *Staphylococcus aureus* e a anti-IgG de cão. Na linha teste pretende-se adicionar o antígeno recombinante NTPDase-2 de *Leishmania infantum chagasi*, que se ligará ao anticorpo anti-NTPDase-2, presente no soro do cão infectado. Para a linha controle foram testadas diferentes concentrações da IgG de cão, ao qual se ligará às imunoglobulinas presentes no soro do animal.

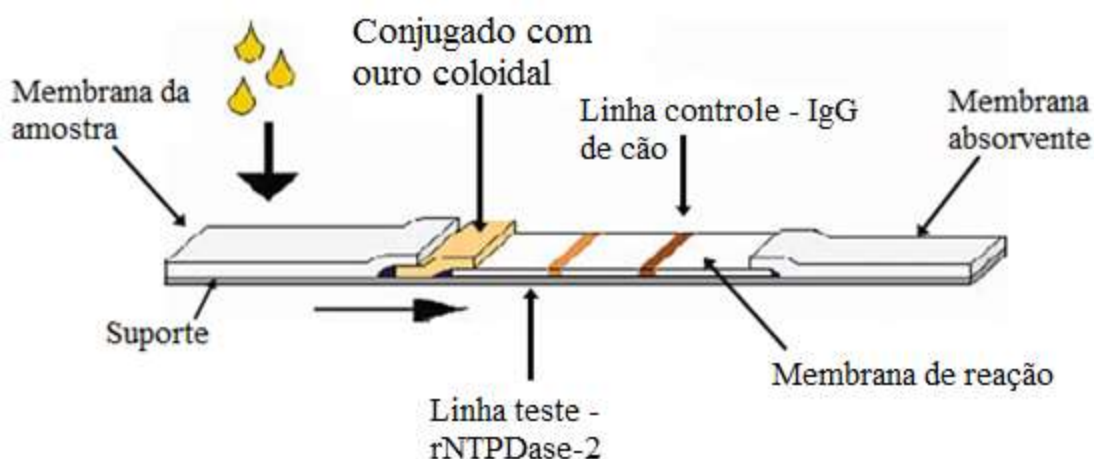


Figura 27: Protótipo do kit de diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina (LVC) por imunocromatografia usando a Proteína Recombinante NTPDase-2 de *Leishmania infantum chagasi*.

5.2.1 Conjugação da Proteína A e Anti-IgG de cão com ouro coloidal 40 nm

A proteína A de *Staphylococcus aureus* é comumente usada na imunocromatografia devido à sua propriedade de se ligar às imunoglobulinas. Essa proteína é produzida pela maioria das cepas de *Staphylococcus* e está covalentemente ligada à parede celular das bactérias ou é secretada. A propriedade mais relevante da proteína A consiste em sua afinidade para imunoglobulinas do tipo G, através da ligação ao fragmento Fc (Forsgren et al., 1966). Também possui afinidade moderada por certas

IgA, IgE e IgM (Goding, 1978). Na imunocromatografia, essa proteína é conjugada a sondas, e quando a proteína A se liga à imunoglobulina presente no teste, a reação é evidenciada pela sonda, fornecendo cor.

No presente trabalho, a proteína A de *S. aureus* foi conjugada por adsorção física a partículas de ouro coloidal (de 40 nm colloidal gold – DCN, USA). Foram testadas 6 diferentes concentrações de proteínas (0,012 a 0,002 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), e 7 valores de pH (6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 e 9,0) (seção 4.5). As melhores condições para a conjugação da proteína A à partícula de ouro coloidal foi a concentração proteica igual a 0,012 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e pH igual a 7,0, uma vez que essas condições forneceram valores de absorvância dentro do limite estimado para moléculas conjugadas a ouro coloidal à 540 nm (0,521 – 0,525).

A conjugação à partícula de ouro de 40 nm também foi feita para a anti-IgG de cão, que poderia substituir a proteína A no diagnóstico. Uma vez que a anti-IgG de cão é mais específica para a ligação à IgG de cão, essa substituição poderia aumentar a sensibilidade do diagnóstico, porém deve ser avaliada a estabilidade da conjugação da anti-IgG de cão à partícula de ouro. As mesmas condições testadas para a otimização da conjugação de proteína A com ouro coloidal foram realizadas para a anti-IgG, sendo que as melhores condições para anti-IgG foi a concentração proteica igual a 0,006 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e pH igual a 8,0, porque forneceram absorvâncias entre 0,521 – 0,525 no comprimento de onda 540 nm.

Sob as condições descritas acima, procedeu-se a conjugação das moléculas às partículas de ouro coloidal (40nm colloidal gold – DCN, USA) pela metodologia descrita na seção 4.3 (protocolo cedido pela DCN Conjugation Services) e foi obtido amostras com absorvâncias entre 0,521 – 0,525 em 540 nm.

5.2.2 Padronização da Linha Controle da Imunocromatografia

Os passos iniciais para a construção do kit de diagnóstico por imunocromatografia podem ser padronizados usando o dot blot, a fim de gastar pouco volume dos reagentes usados.

A fim de padronizar a linha controle da imunocromatografia, foi feito um dot blot usando IgG de cão comercial com concentração igual a 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Foi adsorvido na membrana de nitrocelulose 5 μg da IgG de cão sem diluir, diluído $10^{-1} \times$, $10^{-2} \times$ e $10^{-4} \times$, segundo o dot blot A (seção 4.6). A revelação da IgG foi feita com a proteína A conjugada com ouro coloidal 40 nm e com anti-IgG de cão conjugada com ouro coloidal

40 nm, ambas diluídas 10x e 5x. Como a concentração de proteína A conjugada foi 0,012 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, a diluição 10 x apresenta concentração 0,0012 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e a diluição 5 x apresenta concentração igual a 0,0024 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. A anti-IgG de cão, a concentração conjugada foi 0,006 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, logo, a diluição 10x apresenta concentração igual a 0,0006 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e a diluição 5 x tem concentração igual a 0,0012 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, considerando que toda a proteína presente foi conjugada. Os spots gerados demonstram que a conjugação foi bem sucedida tanto para a proteína A quanto para a anti-IgG de cão.

Quanto a concentração de IgG, a amostra sem diluir, com concentração igual à 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, formou-se um spot denso e com coloração forte (Figura 28, boxes vermelhos), para as demais concentrações, o spot foi claro e não teve diferença visual entre eles (Figura 28). Sendo assim, a concentração ideal para a IgG adicionada à linha controle, está entre 5 mg/mL (sem diluir) e 0,5 mg/mL (diluída 10x).

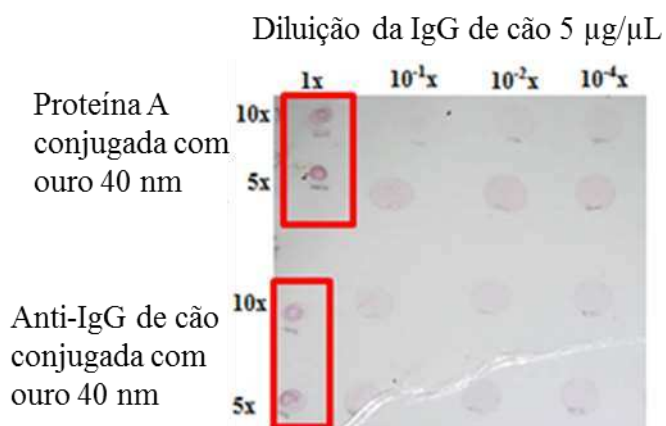


Figura 28: Dot Blot para a padronização da linha controle. Foi adsorvida IgG de cão em diferentes concentrações na membrana de nitrocelulose. A revelação da IgG foi feita com proteína A conjugada à ouro coloidal 40 nm, diluído 10x e 5x e com anti-IgG de cão conjugada à ouro-coloidal 40 nm diluído 10x e 5x. Melhores resultados foram obtidos sem diluir a IgG de cão (boxes vermelhos).

Novas concentrações de IgG de cão foram testadas para a linha controle. A amostra de IgG comercial foi aplicada à membrana de nitrocelulose sem diluir, diluindo 0,5 x; 0,25x; e 0,1x, segundo o dot blot A (seção 4.6). A revelação foi realizada com proteína A conjugada com ouro coloidal 40 nm e com anti-IgG de cão conjugada com ouro coloidal 40 nm, ambas diluídas 10x e 5x (Figura 29). Os spots formados com a concentração de IgG 5 µg/µL (sem diluir) e 2,5 µg/µL (diluição 0,5x) tiveram coloração forte. Para o conjugado, a proteína A teve bons resultados diluindo 5x, assim como a anti-IgG de cão que também forneceu bons resultados para a diluição 5x (box vermelho, setas). Como a anti-IgG é mais específica, pode ser usada em uma concentração menor que a proteína A, embora as diluições sejam as mesmas, a concentração proteica de anti-IgG de cão que foi conjugada foi metade da concentração proteica da proteína A que foi conjugada a ouro.

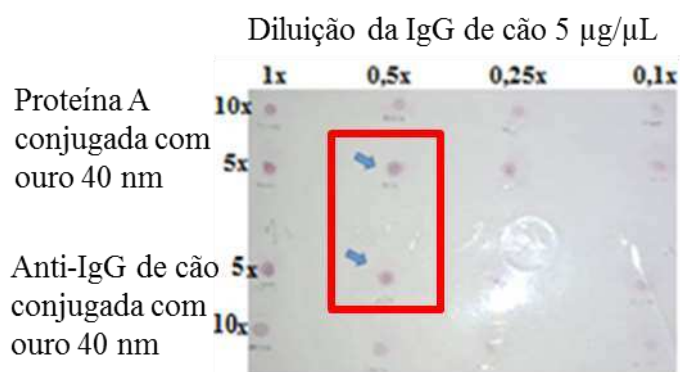


Figura 29: Dot Blot para a padronização da linha controle. Foi adsorvida IgG de cão em diferentes concentrações na membrana de nitrocelulose 5 µg/µL, 2,5 µg/µL, 1,25 µg/µL e 0,5 µg/µL, indicados pelas diluições 1x – 0,1x. A revelação da IgG foi feita com proteína A conjugada à ouro coloidal 40 nm, diluído 10x e 5x e com anti-IgG de cão conjugada à ouro-coloidal 40 nm diluído 10x e 5x. Melhores resultados foram obtidos diluindo a IgG de cão 0,5x, ou seja 2,5 µg/µL e diluindo o conjugado de proteína A e anti-IgG 5x.

A fim de comparar os conjugados produzidos no presente estudo com conjugados comerciais, o dot blot anterior foi repetido acrescentando um conjugado comercial (Figura 30). Esse conjugado comercial trata-se de uma proteína A conjugada com ouro coloidal 10 nm. Novamente o complexo proteína A conjugada com ouro coloidal 40 nm obteve bons resultados pra a diluição 5x, e a concentração de IgG de cão gerou bons resultados diluída 0,5x, ou seja, 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Figura 30, seta vermelha). O anti-IgG conjugado com ouro 40 nm gerou melhores resultados na diluição 5x e 0,5 x de diluição da IgG de cão (Figura 30, seta verde). A proteína A conjugada com ouro coloidal 10 nm comercial não teve marcação (Figura 30, box amarelo), indicando que este conjugado não foi eficaz para o uso no teste por imunocromatografia. Em geral, o tamanho da partícula de ouro utilizado em testes rápidos qualitativos convencionais é 30 nm (Xiulan, et al., 2005).

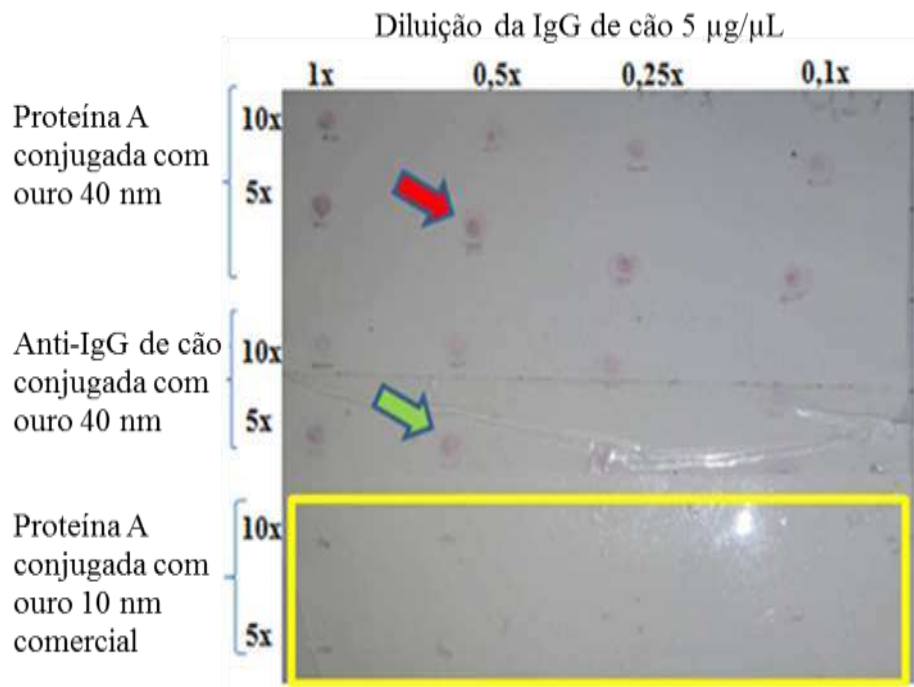


Figura 30: Dot Blot para a padronização da linha controle usando IgG de cão em diferentes concentrações e diferentes conjugados. A IgG de cão foi adsorvida na membrana de nitrocelulose com concentrações 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 1,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, indicados pela diluição 1 - 0,1x. A revelação da IgG foi feita com proteína A conjugada à ouro coloidal 40 nm, diluído 10x e 5x, anti-IgG de cão conjugada à ouro-coloidal 40 nm diluído 10x e 5x, e proteína A conjugada com ouro coloidal 10 nm comercial. Seta vermelha e seta verde apresentam bons resultados usando, respectivamente, proteína A e anti-IgG de cão conjugados com ouro. Conjugado comercial não gerou marcações (box amarelo).

O conjugado também foi testado para reconhecimento geral de anticorpos dos soros positivos e negativos. Para isto, foi feito um dot blot sensibilizando a membrana de nitrocelulose com soros positivo e negativo, segundo a metodologia dot blot B (seção 4.6) (Figura 31). Os soros foram diluídos 1:40, 1:60 e 1:80 e foram adicionados à membrana de nitrocelulose. Foram feitos três spots como controle, usando a IgG de cão comercial em substituição ao soro, com concentração igual a 2,5 mg/mL. Todas as amostras foram reveladas com anti-IgG de cão conjugada com ouro coloidal 40 nm diluído 10x.

Em todas as diluições dos soros, o spot do soro positivo teve marcação mais forte que do soro negativo, devido ao maior número de IgGs presentes no soros positivos. Nos spots referentes ao controle, o primeiro spot foi revelado com uma anti-IgG conjugada com ouro coloidal que já estava diluída há um mês, esse deve ser o motivo pelo qual este spot ficou com coloração mais clara (seta amarela). Já os outros dois spots referentes ao controle, foram revelados com anti-IgG conjugada com ouro também diluída 10x, mas para estes dois spots a diluição do conjugado foi feita na hora da aplicação, o que resultou em uma marcação mais forte. Portanto, provavelmente esse conjugado não se mantém estável quando é armazenado diluído.

A melhor diluição do soro foi 1:60, pois nessa diluição o positivo teve marcação forte (seta vermelha). A marcação do positivo para a diluição 1:40 também foi forte, no entanto, a diluição 1:60 permite usar um volume menor de soro do cão.

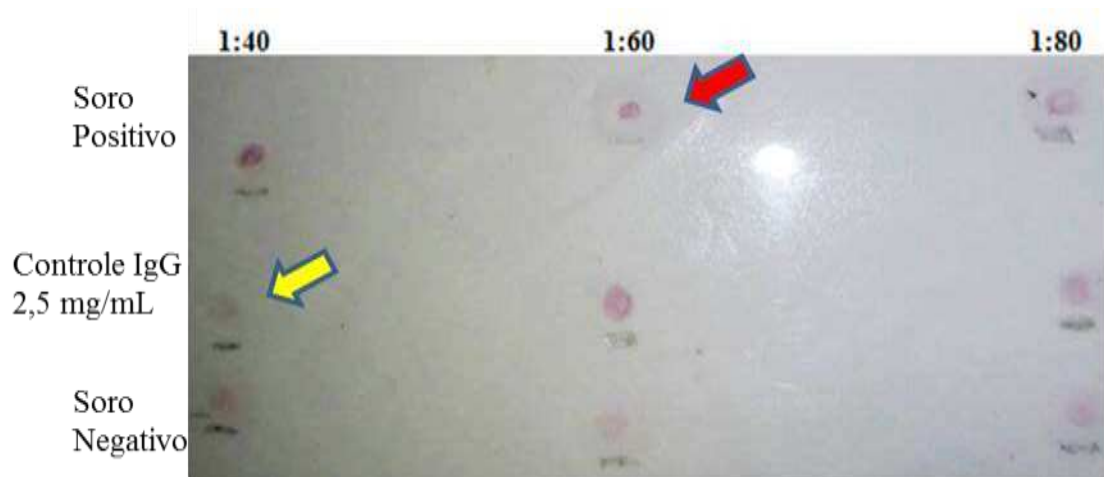


Figura 31: Reconhecimento de anticorpos do soro de cães positivos e negativos pelos conjugados. Membrana de nitrocelulose sensibilizada com soro positivo e negativo diluído 1:40, 1:60 e 1:80 e revelada com anti-IgG conjugada com ouro coloidal 40 nm diluído 10x. Foram feitos 3 spots de controle com IgG comercial, com concentração igual a 2,5 mg/mL. Seta vermelha indica o melhor resultado para diluição do soro por apresentar forte marcação do positivo, usando menor quantidade de soro. A seta amarela indica o único spot revelado com anti-IgG armazenada diluída, sugerindo que o conjugado perde a eficácia quando armazenado diluído.

A estabilidade das moléculas conjugadas diluídas 10x e 5x, foi avaliada usando esses conjugados diluídos há quatro meses. Tanto a proteína A conjugada com ouro coloidal 40 nm quanto à anti-IgG de cão conjugada com ouro coloidal 40 nm tiveram marcações, porém foram mais fracas (Figura 32). Para o conjugado com anti-IgG, a diminuição na marcação foi ainda maior, demonstrando que a estabilidade dessa molécula é menor que da proteína A (box amarelo). Pode-se concluir assim, que essas moléculas conjugadas não se mantem estáveis quando mantidas diluídas, apenas o conjugado concentrado se mantem estável.

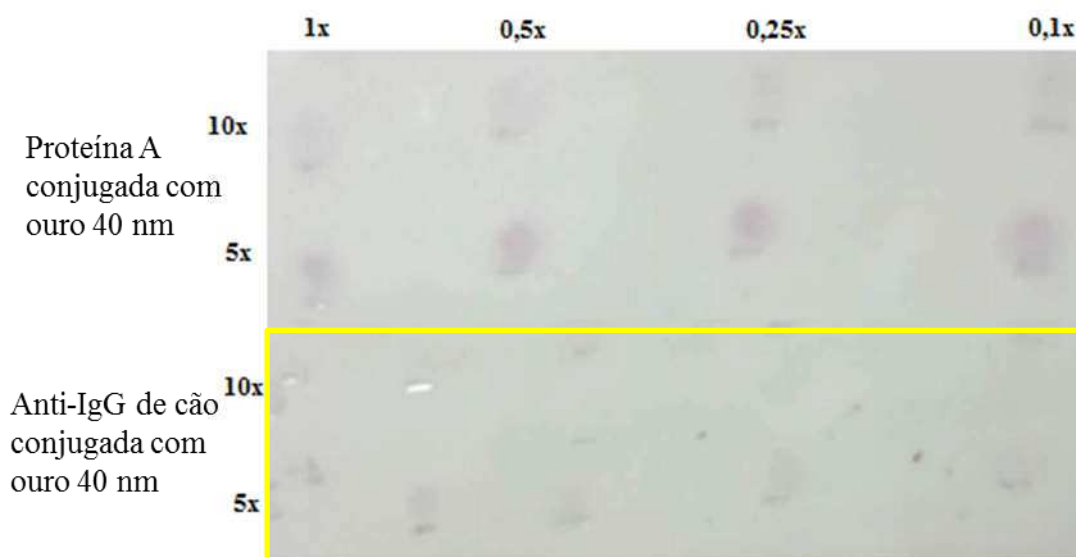
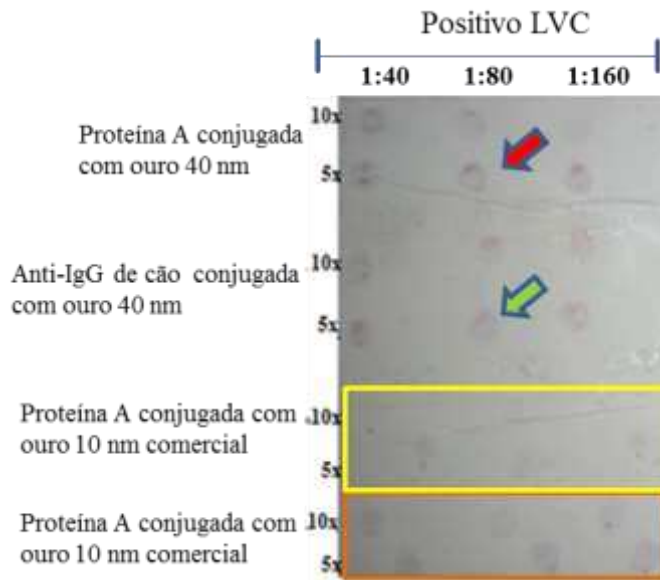


Figura 32: Avaliação da estabilidade das moléculas conjugadas armazenadas por quatro meses diluídas 10x e 5x. Foi usada a IgG de cão em diferentes concentrações na membrana de nitrocelulose 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 1,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, indicados pela diluição 1x, 0,5x, 0,25x e 0,1x. O box amarelo indicam as amostras reveladas por anti-IgG conjugada a ouro coloidal.

O dot blot B (seção 4.6), foi repetido, a fim de avaliar o reconhecimento do conjugado pelos anticorpos dos soros. Neste novo experimento, utilizaram-se também os conjugados comerciais proteína A conjugado com ouro coloidal 10 nm e 40 nm (Figura 33).

Os soros foram diluídos 1:40, 1:80 e 1:160 e foram adicionados à membrana de nitrocelulose. Novamente foi possível visualizar uma diferença de marcação entre os soros positivos e negativos, sendo que os positivos tiveram marcação mais forte. As amostras reveladas com o conjugado comercial de 10 nm não tiveram marcação (box amarelo) e as amostras reveladas com o conjugado comercial de 40 nm tiveram marcação, mas foram mais fracas que as amostras reveladas com o conjugado produzido no presente trabalho (box laranja). Sendo assim, os melhores conjugados testados foram proteína A conjugada com ouro coloidal e anti-IgG de cão conjugada com ouro coloidal, ambos produzidos neste trabalho. Para as amostras reveladas com proteína A conjugada a ouro coloidal diluído 5x, a diluição do soro 1:40 teve marcação forte para o positivo e 1:80 teve marcação também mas não foi tão evidente (Figura 33, seta vermelha), sendo assim a melhor diluição continua sendo 1:60 obtida na figura 31. O mesmo é válido para as amostras conjugadas com anti-IgG de cão (Figura 33, seta verde).

A)



B)

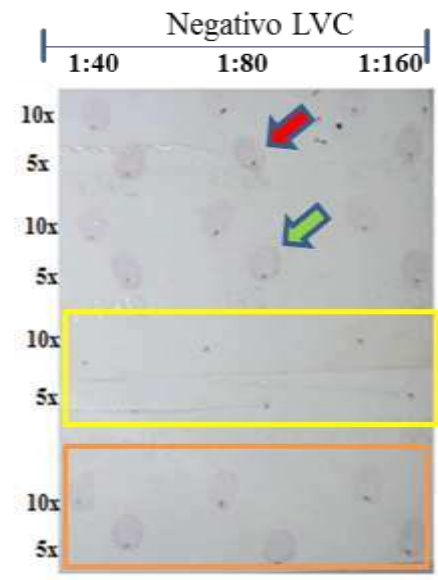


Figura 33: Reconhecimento de anticorpos dos soros de cães pelos conjugados. Membrana de nitrocelulose sensibilizada com soro diluído 1:40, 1:80 e 1:160 e revelada com Proteína A conjugada com ouro coloidal 40 nm diluído 10x e 5x, Anti-IgG de cão conjugada com ouro coloidal 40 nm diluído 10x e 5x, e Proteína A conjugada com ouro comercial 10 nm e 40 nm diluídos 10x e 5x. A) Soro de cão positivo para LVC. B) Soro de cão negativo para LVC.

5.2.3 Padronização da Linha Teste da Imunocromatografia

A fim de padronizar a linha teste, foi feito o dot blot C (seção 4.6), no qual foi adicionada à membrana de nitrocelulose 1 μL da proteína NTPDase-2 purificada em FPLC usando 2 pellets (400 mL) induzido em meio LB em coluna HisPrep FF 16/10 (20 mL). A proteína foi analisada por eletroforese capilar obtendo concentração igual a 356,9 ng/ μL e pureza 73,2% (detalhes da purificação na Figura 14). A membrana foi incubada com soros de cães positivo e negativo, diluídos 1:40, 1:80 e 1: 160 (Figura 34). Para a Proteína A e o Anti-IgG de cão conjugados com ouro coloidal 40 nm, a marcação foi evidente para a diluição 5x (Figura 34, box vermelho para o conjugado Proteína A com ouro coloidal e box amarelo para o conjugado anti-IgG de cão conjugado a ouro coloidal). Dentre estes, a diluição do soro 1:40 forneceu marcação diferencial entre soro positivo e negativo (seta vermelha para o conjugado Proteína A conjugada com ouro e seta amarela para o conjugado anti-IgG de cão conjugado com ouro). No entanto, essa diferença de marcação foi pequena, e é necessário encontrar condições nas quais apenas o positivo forneça marcação.

Quanto aos conjugados comerciais, a proteína A conjugada com ouro 40 nm teve marcação, mas foi fraca. Já o conjugado com 10 nm não teve nenhuma marcação. As amostras positivas foram ligeiramente mais marcadas que as amostras negativas. É necessário encontrar uma concentração de proteína e uma diluição de soro no qual apenas o positivo tenha marcação.

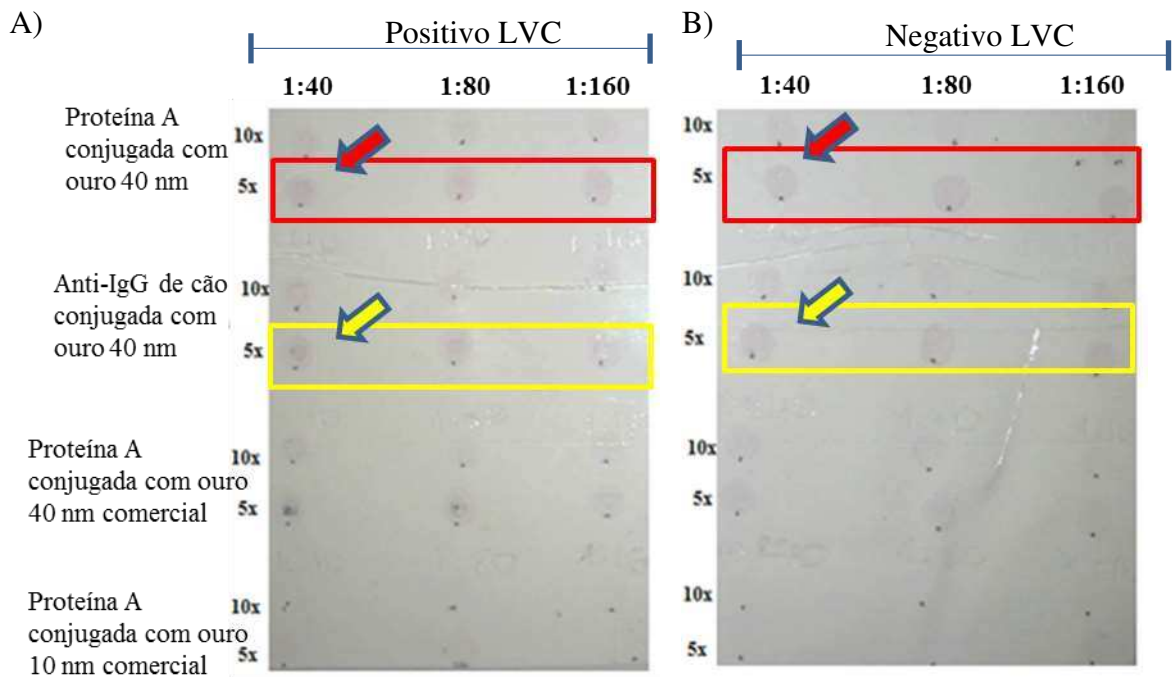


Figura 34: Membrana de nitrocelulose sensibilizada com NTPDase-2, com concentração igual a 356,9 ng/ μ L e pureza 73,2%. A) Incubada com soro de cão positivo para LVC, diluído 1:40, 1:80 e 1:160. Revelação foi feita com Proteína A conjugada com ouro coloidal 40 nm diluída 10x e 5x, Anti-IgG de cão conjugada com ouro coloidal 40 nm diluído 10x e 5x e Proteína A conjugada com ouro comercial 40 nm e 10 nm. A marcação foi evidente para a diluição 5x para o conjugado Proteína A com ouro (box vermelho). Para essa diluição do conjugado e a diluição do soro 1:40 teve marcação diferencial entre soro positivo e negativo (seta vermelha). B) As mesmas condições testadas para soro de cão negativo para LVC. A marcação também foi evidente para a diluição 5x para o conjugado anti-IgG de cão com ouro (box amarelo). Marcação diferencial entre soro positivo e negativo para diluição do conjugado 5x e diluição do soro 1:40.

O mesmo experimento foi repetido usando a proteína obtida por FPLC usando 0,5 pellet (400 mL) induzido em meio LB em coluna HisPrep FF 16/10 (20 mL) (Figura 35). A proteína foi analisada por eletroforese capilar, tendo concentração igual 178,2 ng/ μ L e pureza 96,6% (detalhes da purificação na Figura 15). Foi usado como controle a IgG de cão comercial com concentração 2,5 μ g/ μ L, testada para a linha controle. A membrana foi incubada com os mesmos soros e com as mesmas diluições da figura anterior (Figura 34). As marcações foram mais fortes, tanto para o positivo quanto para o negativo, sugerindo que o grau de pureza é importante para uma boa marcação. No entanto, a diferença de marcação entre o soro positivo e negativo foi menor em todas as situações testadas.

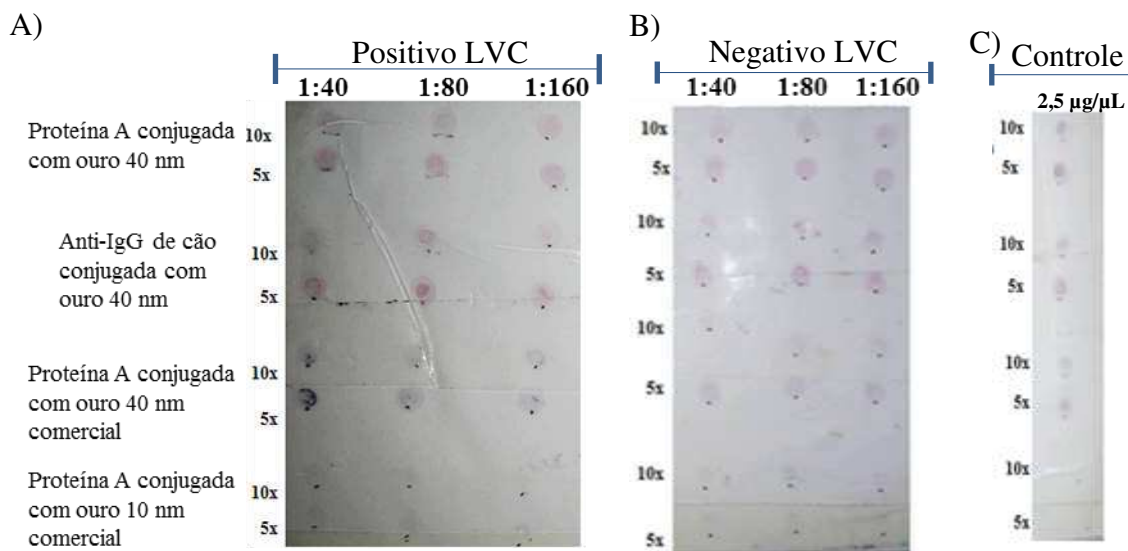


Figura 35: Membrana de nitrocelulose sensibilizada com NTPDase-2, com concentração igual a 178,2 ng/ μ L e pureza 96,6%. A) Incubada com soro de cão positivo para LVC, diluído 1:40, 1:80 e 1:160. Revelação foi feita com Proteína A conjugada com ouro coloidal 40 nm diluída 10x e 5x, Anti-IgG de cão conjugada com ouro coloidal 40 nm diluído 10x e 5x e Proteína A conjugada com ouro comercial 40 nm e 10 nm. B) As mesmas condições testadas para soro de cão negativo para LVC. C) Controle usando IgG de cão comercial com concentração 2,5 mg/mL.

Uma forma testada para selecionar apenas os soros positivos para LVC foi diminuir a concentração do antígeno testado. Era esperado que com a menor concentração de antígeno, apenas o soro positivo tivesse anticorpos o suficiente para se ligar após o bloqueio. Sendo assim, a proteína NTPDase-2 testada no último experimento foi diluída 2x (Figura 36), 4x (Figura 37) e 8x (Figura 38), obtendo as concentrações 89,1; 44,5 e 22,3 ng/ μ L, respectivamente. O controle foi feito igual ao experimento anterior, mantendo a concentração da IgG 2,5 mg/ mL. As diluições de soro testadas foram 1:40 e 1:80. Para 89,1 ng/ μ L (Figura 36), a marcação foi semelhante ao dot blot usando 178,2 ng/ μ L (Figura 37), os demais dot blot tiveram marcação mais fraca, mas todos estes dot blots testados forneceram marcação muito semelhante para o positivo e negativo. Desta forma, pode ser que a etapa de bloqueio não esteja funcionando adequadamente, e a marcação visualizada seja residual.

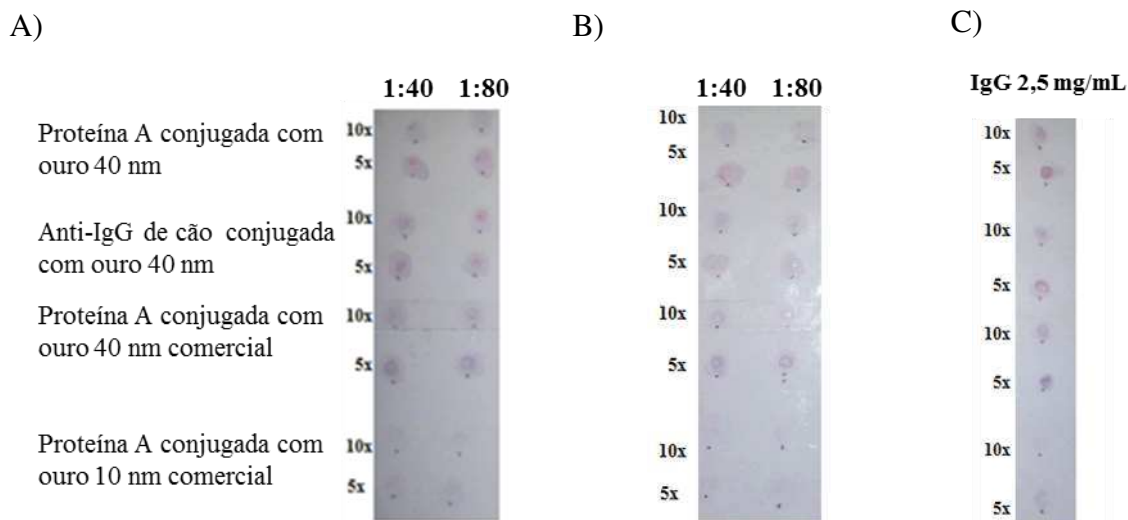


Figura 36: Membrana de nitrocelulose sensibilizada com NTPDase-2, com concentração igual a 89,1 ng/ μ L. A) Incubada com soro de cão positivo para LVC, diluído 1:40 e 1:80. Revelação foi feita com Proteína A conjugada com ouro coloidal 40 nm diluída 10x e 5x, Anti-IgG de cão conjugada com ouro coloidal 40 nm diluído 10x e 5x e Proteína A conjugada com ouro comercial 40 nm e 10 nm diluídas 10x e 5x. B) As mesmas condições testadas para soro de cão negativo para LVC. C) Controle usando IgG de cão comercial com concentração 2,5 mg/mL.

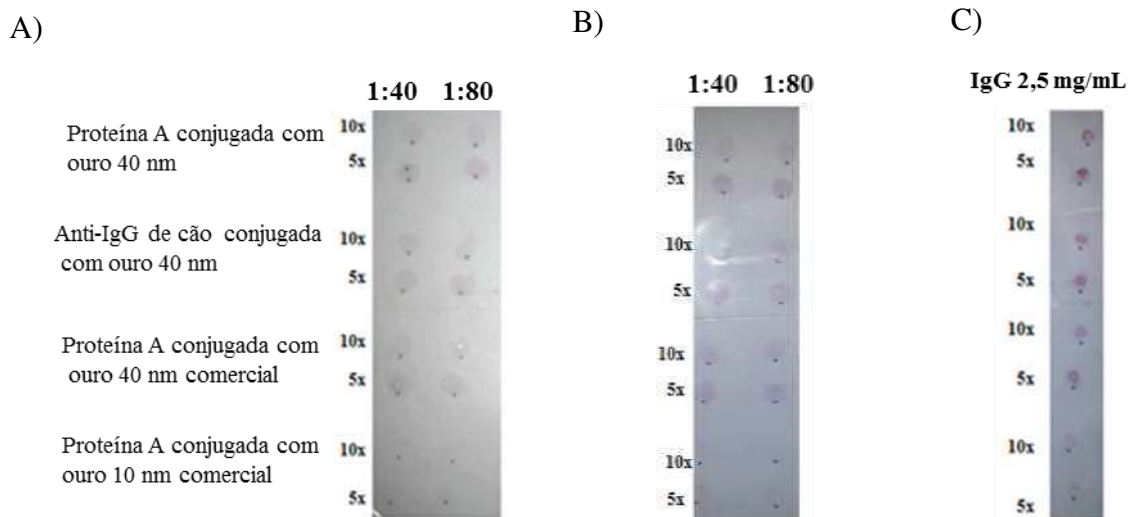


Figura 37: Membrana de nitrocelulose sensibilizada com NTPDase-2, com concentração igual a 44,5 ng/ μ L. A) Incubada com soro de cão positivo para LVC, diluído 1:40 e 1:80. Revelação foi feita com Proteína A conjugada com ouro coloidal 40 nm diluída 10x e 5x, Anti-IgG de cão conjugada com ouro coloidal 40 nm diluído 10x e 5x e Proteína A conjugada com ouro comercial 40 nm e 10 nm diluídas 10x e 5x. B) As mesmas condições testadas para soro de cão negativo para LVC. C) Controle usando IgG de cão comercial com concentração 2,5 mg/mL.

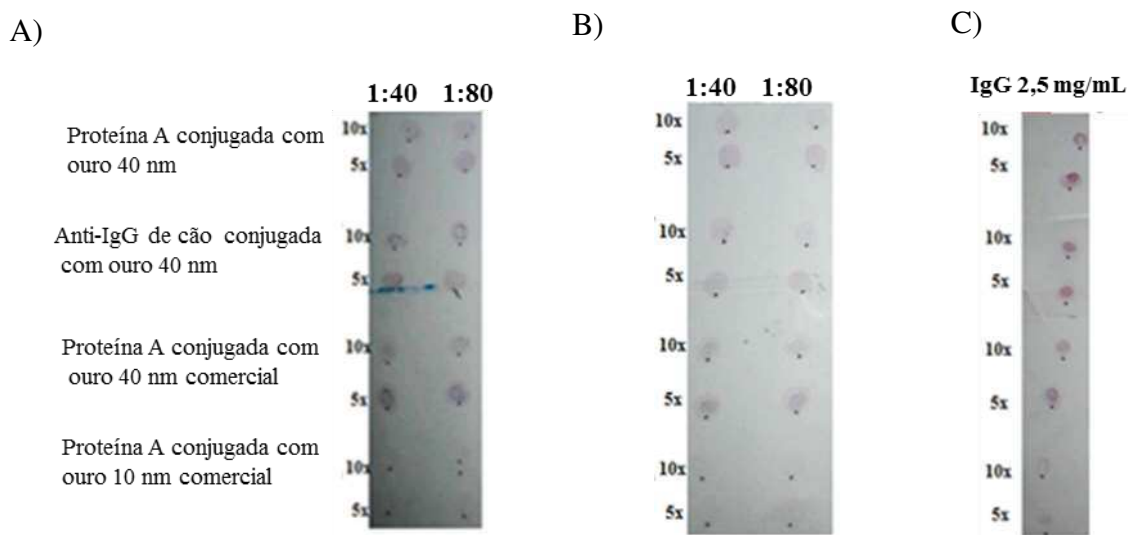


Figura 38: Membrana de nitrocelulose sensibilizada com NTPDase-2, com concentração igual a 22,3 ng/ μ L. A) Incubada com soro de cão positivo para LVC, diluído 1:40, 1:80 e 1:160. Revelação foi feita com Proteína A conjugada com ouro coloidal 40 nm diluída 10x e 5x, Anti-IgG de cão conjugada com ouro coloidal 40 nm diluído 10x e 5x e Proteína A conjugada com ouro comercial 40 nm e 10 nm. B) As mesmas condições testadas para soro de cão negativo para LVC. C) Controle usando IgG de cão comercial com concentração 2,5 mg/mL.

Os experimentos anteriores não apresentaram diferença de marcação entre soros positivos e negativos, o que não era esperado, uma vez que os soros positivos apresentam maior número de anticorpos anti-NTPDase-2. Então foi realizado um dot blot para avaliar se as marcações obtidas nesses experimentos eram resultantes do reconhecimento de anticorpos anti-NTPDase-2 (presentes no soro), pelas moléculas conjugadas a ouro coloidal.

Para isto, foi feito um novo dot blot utilizando 1 μL e 5 μL de NTPDase-2 purificada, com concentração igual a 178,2 ng/ μL (Figura 39). O uso de 1 μL representa o depósito de 178,3 ng de NTPDase-2 na membrana de nitrocelulose e, o uso de 5 μL representa o depósito de 891 ng de NTPDase-2 na membrana de nitrocelulose. Era esperado que não ocorresse nenhuma marcação, uma vez que não foram adicionados os soros de cães à membrana de nitrocelulose, e desta forma, não teria anticorpos anti-NTPDase-2 para se ligar às NTPDase-2 adsorvida na membrana. Como o conjugado deve se ligar especificamente ao anticorpo anti-NTPDase-2, neste dot blot, não poderia ocorrer marcação.

A figura 39, mostra que ocorreu a marcação usando 1 μL e 5 μL de NTPDase-2, sugerindo que não está ocorrendo o reconhecimento de anticorpos anti-NTPDase-2 e que as marcações são resultante da adsorção das moléculas de conjugado. Sendo assim, novos dots blots serão testados, incubando a membrana de nitrocelulose em solução contendo os conjugados, a fim de prevenir o depósito inespecífico de moléculas de conjugado.

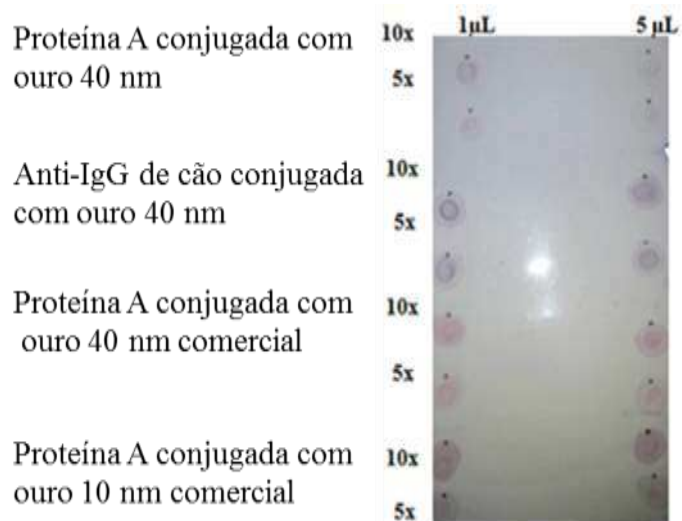


Figura 39: Avaliação da especificidade das marcações da linha teste. Dot blot utilizando 1 μ L e 5 μ L de NTPDase-2. A marcação ocorreu sem adição de anticorpos anti-NTPDase-2, sugerindo que as marcações são resultantes da adsorção das moléculas conjugadas.

Novos ensaios devem ser realizados para confirmar a reação na linha teste. Além disso, as membranas e outros constituintes do kit imunocromatográficos devem ser testados a fim de desenvolver um kit sensível e específico para LVC.

6. Conclusão

Os dados do presente estudo confirmam que o antígeno NTPDase-2 de *Leishmania infantum chagasi* tem potencial para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina e que é possível melhorar os níveis de detecção de anticorpos variando as condições do ensaio e a forma de produção do antígeno.

Desta forma, este estudo mostrou que a purificação em sistema manual (*batch*) fornece amostras com maior grau de pureza do que as amostras obtidas por sistema automatizado (FPLC). No entanto, o processo de purificação em FPLC possibilita o uso de grandes quantidades de amostra e apresenta rendimento maior do que o sistema manual.

Quanto à conformação do antígeno, o diagnóstico por ELISA usando proteínas renaturadas não se mostrou mais eficaz que do que usando proteína desnaturada, o que indica que o reconhecimento antígeno: anticorpo neste caso não é preferencialmente dependente da conformação do antígeno. O uso dos substratos para a revelação de cor TMB e OPD, também não geraram diferenças significativas. Quanto ao processo de renaturação do antígeno, o protocolo usando tampão 1 por 24 horas, diluindo o antígeno 40x ou 50x (concentrações iguais a 0,0219 mg/mL e 0,0175 mg/mL), foi o protocolo de renaturação mais eficaz.

Para a padronização do ELISA usando antígeno obtido por FPLC (grau de pureza 76%), foi estabelecido o uso de 0,5 µg de antígeno por poço e diluição do soro 1:160. Usando o antígeno purificado manualmente no ELISA (grau de pureza 100,0%) foi padronizado o uso de 0,1 µg de antígeno e diluição do soro 1:160. Esses resultados indicam que o grau de pureza do antígeno aumenta a sensibilidade do diagnóstico. Assim, foram feitas várias purificações para conciliar o alto grau de pureza com bom rendimento.

A quantidade de amostra aplicada no FPLC influenciou os resultados de pureza e rendimento da técnica, sendo que o uso de 0,5 pellet relativo a 400 mL de indução em meio LB forneceu altos valores de pureza e rendimento, sendo uma boa forma para obtenção do antígeno em FPLC. O rendimento da purificação em FPLC usando 1 pellet relativo a 400 mL de indução foi 10,4% menor do que o rendimento da purificação usando 0,5 pellet relativo a 400 mL de indução, ambos em meio LB.

A análise da estabilidade proteica evidenciou que as amostras purificadas e armazenadas em solução a 4° C e a 22° C tiveram a menor perda proteica durante 42 dias. Essas condições são mais fáceis de serem mantidas para o trabalho em campo, e representaram uma vantagem para o uso da rNTPDase-2 como antígeno no teste imunocromatográfico, uma vez que não é necessário baixas temperaturas para manter a proteína estável. Nenhuma das condições testadas para a estabilidade proteica teve degradação total da proteína purificada em 42 dias.

Visando a padronização do diagnóstico de LVC por imunocromatografia, foram padronizadas as condições para a conjugação da Proteína A e da anti-IgG de cão à ouro coloidal 40 nm. Para Proteína A foi padronizada a concentração proteica 0,012 µg/µL em pH 7,0. Para anti-IgG de cão foi padronizada a concentração proteica 0,006 µg/µL e pH 8,0. As amostras conjugadas tiveram absorvância entre 0,521 - 0,525 em 540 nm, característica de moléculas conjugadas a ouro, e foram capazes de reconhecer IgG de cão comercial e anticorpos presentes nos soros de cães. Os conjugados Proteína A a ouro coloidal 10 nm e 40 nm comerciais não apresentaram bons resultados nos dot blots, sendo menos eficazes que os conjugados produzidos no presente trabalho.

Para a linha controle do teste imunocromatográficos, foi padronizado a concentração da IgG 2,5 µg/µL (diluição 0,5x) e diluição do conjugado 5x. Para a linha teste foram usadas diferentes concentrações e diferentes graus de pureza do antígeno NTPDase-2 na membrana de nitrocelulose. As marcações para as amostras de soro positivo e negativo, em diferentes diluições, foram fracas e não apresentaram marcações diferentes entre os soros positivos e negativos. Além disso, o dot blot sem adição dos soros de cães à membrana de nitrocelulose, ou seja, sem anticorpos anti-NTPDase-2, foi capaz de gerar marcações na membrana, sugerindo que não está ocorrendo o reconhecimento de anticorpos anti-NTPDase-2 e que as marcações são resultantes da adsorção das moléculas de conjugado.

Sendo assim, novos ensaios devem ser realizados para confirmar a reação na linha teste. Além disso, as membranas e outros constituintes do kit imunocromatográficos devem ser testados a fim de desenvolver um kit sensível e específico para LVC.

7. Referências

1. Aara N, Khandelwal K, Bumb RA, Mehta RD, Ghiya BC, Jakhar R, Dodd C, Salotra P, Satoskar AR, (2013). Clinico-epidemiologic study of cutaneous leishmaniasis in Bikaner, Rajasthan, India. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 89 (1), pp. 111–115.
2. Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, et al. (2006). International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* 58, pp. 281–341
3. © Agilent Technologies, Inc., 2010 May 1, 2010 Publication Number 5990-5721EN.
4. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M. WHO Leishmaniasis Control Team (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence *PLoS ONE*, 7.
5. Alves CF, Figueiredo MM, Souza CC, Machado-Coelho GLL, Melo MN, Tafuri WL, Raso P, Soares RP, Tafuri WL (2013). American Tegumentary Leishmaniasis: Effectiveness of an Immunohistochemical Protocol for the Detection of *Leishmania* in Skin. *PLoS ONE* 8(5): e63343.
6. Amato VS, Tuon FF, Imamura R, Abegão de Camargo R, Duarte MI, Neto VA, (2009). Mucosal leishmaniasis: description of case management approaches and analysis of risk factors for treatment failure in a cohort of 140 patients in Brazil. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 23 (9), pp. 1026–1034.
7. Baeshen MN, Al-Hejin AM, Bora RS, Ahmed MM, Ramadan HA, Saini KS, Baeshen NA, Redwan EM, (2015). Production of Biopharmaceuticals in *E. coli*: Current Scenario and Future Perspectives. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 25(7), pp 953-962.
8. Bandla M, Thompson R, Shan G (2011). Lateral Flow Devices. Book chapter in *Immunoassays In Agricultural Biotechnology*. Guomin Shan, eds. by John Wiley & Sons.
9. Bastos MS, (2014). Expressão Heteróloga das NTPDases 1 e 2 de *Leishmania infantum chagasi* em Sistema Bacteriano e de Células de Mamífero e Estudo de suas Influências na Infecção *in vitro* e na Expressão de Purino Receptores P2. Tese de Doutorado apresentada à Universidade Federal de Viçosa.

10. Bazin I, Nabais E, Lopez-Ferber M, (2010). Rapid Visual Tests: Fast and Reliable Detection of Ochratoxin A. *Toxins (Basel)*; 2(9), pp 2230–2241.
11. Bigonnesse F, Levesque AS, Kukulski F, Lecka J, Robson SC, Fernandes MJ, Sevigny J, (2004). Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. *Biochemistry*, v. 43, n. 18, pp. 5511-9.
12. Blanco VM, Cossio A, Martinez JD, Saravia NG, (2013). Clinical and Epidemiologic Profile of Cutaneous Leishmaniasis in Colombian Children: Considerations for Local Treatment. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 89 no. 2, pp 359-364.
13. Brady PN, Macnaughtan MA, (2015). Evaluation of colorimetric assays for analyzing reductively methylated proteins: Biases and mechanistic insights. *Analytical Biochemistry*, Volume 491, 15 December 2015, pp 43–51.
14. Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC (2006). Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacology & therapeutics* 112; pp 358-404.
15. Bradford MM, (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, pp 248-254.
16. Burnstock G, (1980). Purinergic modulation of cholinergic transmission. *Gen Pharmacol* 1115-18.
17. Burnstock G, (2007). Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 64 pp 1471-1483.
18. Burnstock G, Ralevic V, (2014). Purinergic signaling and blood vessels in health and disease. *Pharmacol Rev* 66, pp 102–92.
19. Compton SJ, Jones CG, (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry*, 151 pp. 369–374.
20. Colwell DD, Dantas-Torres F, Otranto D, (2011). Vector-borne parasitic zoonoses: Emerging scenarios and new perspectives. *Veterinary Parasitology*, (182), 1, pp 14–21.
21. Courtenay O, Carson C, Calvo-Bado L, Garcez LM, Quinnell RJ, (2014). Heterogeneities in *Leishmania infantum* Infection: Using Skin Parasite Burdens to Identify Highly Infectious Dogs. *PLoS Negl Trop Dis* 8(1): e2583.
22. De Paiva-Cavalcanti M, de Moraes RCS, Pessoa-e-Silva R, Trajano-Silva LAM, Gonçalves-de-Albuquerque SC, Tavares DHC, Brelaz-de-Castro MCA, Silva RF,

- Pereira VRA, (2015). Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell & Bioscience* (5), 31.
- 23.** DeSouza, RF (2012). Expressão e Purificação da Proteína Recombinante NTPDase2 de *Leishmania infantum* e sua Aplicação no Imunodiagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. Tese de Doutorado apresentada à Universidade Federal de Viçosa.
- 24.** DeSouza RF, Santos YL, Vasconcellos RS, Borges-Pereira L, Caldas IS, Almeida MR, Bahia MT, Fietto JLR, (2013). Recombinant *Leishmania (Leishmania) infantum* Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase NTPDase-2 as a new antigen in canine visceral leishmaniasis diagnosis. *Acta Tropica* (125),1, pp 60–66.
- 25.** Ekman P, Jager O, (1993). Quantification of subnanomolar amounts of phosphate bound to seryl and threonyl residues in phosphoproteins using alkaline hydrolysis and malachite green. *Anal Biochem*, (214), pp 138-141.
- 26.** Elmahallawy EK, Martínez AS, Rodriguez-Granger J, HoyosMallecot Y, Agil A, Mari JMN, Fernández JG, (2014). Diagnosis of leishmaniasis. *The Journal of Infection Developing Countries*; 8(8), pp 961-972.
- 27.** Erlinge D, Burnstock G, (2008). P2 receptors in cardiovascular regulation and disease. *Purinergic Signal* (4), pp 1–20.
- 28.** Faria AR, Andrade HM, (2012). Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: major technological advances and few practical applications. *Rev Pan-Amaz Saude* (3), no.2, pp 47-57.
- 29.** Fietto JLR, DeMarco R, Nascimento IP, Castro IM, Carvalho TMU, Souza W, Bahia MT, Alves MJM, Verjovski-Almeida S, (2004). Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (316), 2, pp 454–460.
- 30.** Figueiredo AB, Serafim TD, Marques-da-Silva EA, Meyer-Fernandes JR, Afonso LC (2012). *Leishmania amazonensis* impairs DC function by inhibiting CD40 expression via A2B adenosine receptor activation. *European journal of immunology* (42), pp 1203-15.
- 31.** Forsgren A, Sjöquist J, (1966). "Protein A" from *S. aureus*. I. Pseudo-immune reaction with human gamma-globulin. *Journal of Immunology* (97), 6, pp 822-827.
- 32.** Fountoulakis M, Juranville JF, Manneberg M, (1992). Comparison of the Coomassie brilliant blue, bicinchoninic acid, and Lowry quantitation assays, using

- non-glycosylated and glycosylated proteins. *J. Biochem. Biophys. Methods*, (24), pp. 265–274.
33. Fu E, Liang T, Houghtaling J, Ramachandran S, Ramsey SA, Lutz B, Yager B, (2011). Enhanced Sensitivity of Lateral Flow Tests Using a Two-Dimensional Paper Network Format. *Analytical Chemistry* (83), pp 7941–7946.
 34. Fuentes E, Palomo I, (2015). Extracellular ATP metabolism on vascular endothelial cells: A pathway with pro-thrombotic and antithrombotic molecules. *Vascul Pharmacol.*, (15), pp 1537-1891.
 35. Goding JW, (1978). Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent. *Journal of Immunological Methods* (20), pp 241–253.
 36. Gomes YM, De Paiva-Cavalcanti M, Lira RA, Abath FGC, Alves LC (2008). Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. *The Veterinary Journal* (175), 1, pp 45–52.
 37. Gradoni L, (2015). Canine *Leishmania* vaccines: still a long way to go. *Veterinary Parasitology*, (208), pp 94-100.
 38. Gramiccia M, (2011). Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Veterinary Parasitology* (181), pp 23– 30.
 39. Grimaldi G, Teva A, Ferreira AL, dos Santos CB, Pinto IS, de Azevedo CT, Falqueto A (2012). Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* (106), pp 54–59.
 40. Guerra JA, Prestes SR, Silveira H, Coelho LI, Gama P, Moura A, Amato V, Barbosa MG, Ferreira LC, (2011). Mucosal Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazilian Amazon. *Plos Neglected Tropical Diseases*, (5), 3, pp 980.
 41. Guzman-Aranguez A, Santano C, Martin-Gil A, et al. (2013). Nucleotides in the eye: focus on functional aspects and therapeutic perspectives. *J Pharmacol Exp Ther* (345), pp 331–41.
 42. Hajjarian H, Mohebbali M, Mamishi S, Vasigheh F, Oshaghi MA, Naddaf SR, Teimouri A, Edrissian GH, Zarei Z (2013). Molecular Identification and Polymorphism Determination of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis Agents Isolated from Human and Animal Hosts in Iran. *BioMed Research International*, Article ID 789326, pp 1-7.
 43. Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CH (2011). Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitology* (27),9, pp 403-409.

44. Hwang PM, Pan JS, Sykes BD, (2014). Targeted expression, purification, and cleavage of fusion proteins from inclusion bodies in *Escherichia coli*, *FEBS Letters* (588), 2, pp 247-252.
45. Junger WG, (2011). Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nature reviews Immunology* (11), pp 201-12.
46. Kaye P, Scott P, (2011). Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology* (9), pp 604-615.
47. Kedzierski L, (2011). Leishmaniasis. *Human vaccines*, (7), 11, pp 1204-1214.
48. Kedzierski L, (2010). Leishmaniasis Vaccine: Where are we today? *J Glob Infect Dis.* (2), 2, pp 177–185.
49. Kim S, Kunapuli SP, (2011). P2Y12 receptor in platelet activation. *Platelets* (22), pp 56-60.
50. Kronlage M, Song J, Sorokin L, Isfort K, Schwerdtle T, Leipziger J, Robaye B, Conley PB, Kim HC, Sargin S, Schon P, Schwab A, Hanley PJ, (2010). Autocrine purinergic receptor signaling is essential for macrophage chemotaxis. *Sci Signal* (3), pp 55.
51. Kumar V, Sharma A, (2009). Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. *Eur J Pharmacol*, (616), pp 7-15.
52. Kumar V, (2013). Adenosine as an endogenous immunoregulator in cancer pathogenesis: where to go? *Purinergic Signal*, (9), pp 145-165.
53. Leite PM, Gomes RS, Figueiredo AB, Serafim TD, Tafuri WL, de Souza CC, Moura SA, Fietto JL, Melo MN, Ribeiro-Dias F, Oliveira MA, Rabello A, Afonso LC (2012). Ectonucleotidase activities of promastigotes from *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* relates to parasite infectivity and disease clinical outcome. *PLoS neglected tropical diseases*, (6), pp 1850.
54. Lohman AW, Billaud M, Isakson BE, (2012). Mechanisms of ATP release and signalling in the blood vessel wall. *Cardiovasc Res*, (95), pp 269–80.
55. Maia C, Campino L, (2008). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol* (158), 4, pp 274-287.
56. Maia C, Campino L, (2011). Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends in Parasitology*, (27), pp 341–4.
57. Maioli TU, Takane E, Arantes RM, Fietto JL, Afonso LC (2004). Immune response induced by New World *Leishmania* species in C57BL/6 mice. *Parasitology research*, (94), pp 207-12.
58. Manzillo VF, Di Muccio T, Cappiello S, Scalone A, Paparcone R, Fiorentino E, Gizzarelli M, Gramiccia M, Gradoni L, Oliva G, (2013). Prospective Study on the

Incidence and Progression of Clinical Signs in Naïve Dogs Naturally Infected by *Leishmania infantum*. PLoS Negl Trop Dis (7), 5, pp 2225.

59. Mariotini-Moura C, Bastos MS, Castro FF, Trindade ML, Vasconcellos RS, Neves-do-Valle MAA, Moreira BP, Santos RF, Oliveira CM et al. (2014). *Trypanosoma cruzi* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (TcNTPDase-1) biochemical characterization, immunolocalization and possible role in host cell adhesion. Acta Tropica (130), pp 140–147.
60. Marques-da-Silva EA, Oliveira JC, Figueiredo AB, Júnior DSL, Carneiro CM, Fietto JLR, Afonso LCC, (2008). Extracellular nucleotide metabolism in *Leishmania*: influence of adenosine in the establishment of infection. Microbes and Infection (10),8, pp 850–857.
61. Marr JJ, Berens RL, Nelson DJ, (1978). Purine metabolism in *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects (544), 2, 1, pp 360-371.
62. Masse K, Dale N, (2012). Purines as potential morphogens during embryonic development. Purinergic Signal (8), pp 503–21.
63. Mei L, Du W, Gao W, Mei QB, (2010). Purinergic signaling: a novel mechanism in immune surveillance. Acta Pharmacol Sin (31), pp 1149-1153.
64. Mercier N, Kiviniemi TO, Saraste A, et al. (2012). Impaired ATP-induced coronary blood flow and diminished aortic NTPDase activity precede lesion formation in apolipoprotein E-deficient mice. Am J Pathol (180), pp 419–28.
65. Ministério da Saúde, 2014. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. In: Ministério da Saúde – MS (Ed.), Brasília.
66. Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G, (2008). Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. Trends in Parasitology (24), 8, pp 372.
67. Mohammadiha A, Mohebbali M, Haghghi A, Mahdian R, Abadi AR, Zarei Z, et al. (2013). Comparison of real-time PCR and conventional PCR with two DNA targets for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in human and dog blood samples. Exp Parasitol (133), pp 89–94.
68. Moreno MR de, Smith JF, Smith RV, (1986). Mechanism studies of Coomassie blue and silver staining of proteins. J. Pharm. Sci. (75), pp 907–911.
69. Murphy DM; Ivanenkov VV, Kirley TL, (2003). Bacterial expression and characterization of a novel, soluble, calcium-binding, and calcium-activated human nucleotidase. Biochemistry (42), pp 2412-2421.

70. Noble JE, Bailey MJA, (2009). Quantitation of protein. R.B. Richard, P.D. Murray (Eds.), *Methods in Enzymology: Guide to Protein Purification*, Academic Press, San Diego, pp 73–95.
71. O’Farrell B, (2009). Evolution in Lateral Flow Immunoassay Systems. Book chapter. In; *Lateral Flow Immunoassay*. Wong and Tse, eds. Springer.
72. Organização Mundial de Saúde – OMS (2010). Control of the *Leishmaniasis*. World Health Organ Tech Rep Ser 949: 186.
73. Otranto D, Dantas-Torres F, (2013). The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. *Trends in Parasitology* (29), 7, pp 339–345.
74. Pace D, (2014). Leishmaniasis. *Journal of Infection* (69).
75. PAHO / WHO – Pan American Organization. *Visceral Leishmaniasis*, 2014.
76. Paniz Mondolfi AE, Duffey GB, Horton LE, Tirado M, Reyes Jaimes O, Perez-Alvarez A, Olga Zerpa MD, (2013). Intermediate/borderline disseminated cutaneous leishmaniasis. *International Journal of Dermatology*, (52), 4, pp 446–455.
77. Palatnik-de-Sousa CB, Day MJ, (2011). One Health: The global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasites & Vectors* (4), pp 197.
78. Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Castagnaro M, Crotti A, Maroli M, Oliva G, Roura X, Zatelli A, Zini E, (2010). Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* (236), 11, pp 1184-1191.
79. Peixoto HM; Oliveira MRF, Romero GAS, (2015). Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. *Tropical Medicine and International Health* (20), 3, pp 334–352.
80. Petersen CA, Barr SC, (2009). Canine leishmaniasis in North America: emerging or newly recognized? *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* (39), pp. 1065–1074.
81. Pilatti MM, Ferreira SA, Melo MN, Andrade ASR (2009). Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjunctival swab samples. *Research in Veterinary Science* (87), 2, pp 255–257.
82. Pimentel FG, Bastos MSE, Santos RF, Moura CM, Bressan GC, Silva Junior A, Almeida MR, Fietto JLR, (2016). The *Leishmania*-Macrophage Interactions: Role of E-NTPDases and Purinergic Signaling. *Macrophage* (3), pp 1143.
83. Pinheiro PHC, Pinheiro AN, Ferreira JHL, Costa FAL, Katz S, Barbiéri CL, (2009). A recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* as an antigen for delayed-type hypersensitivity assays and serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* (162), 1-2, pp 32-39.

84. Portaria Interministerial N° 1.426, de 11 de julho de 2008. Ministério da Saúde.
85. Posthuma-Trumpie GA, Korf J, Amerongen A van, (2009). Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (393), pp 569–582.
86. Quinnell R, Courtenay O, (2009). Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* (136), pp 1915–1934.
87. 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, pp 1992.
88. Ralevic V, Burnstock G, (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* (50), pp 413–92.
89. Ready PD, (2010). Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill*, (15), 10, pp 19505.
90. Ribeiro JA, (1979). Purinergic modulation of transmitter release. *J Theor Biol*, (80), pp 259-270.
91. Riedmaier P, Sansom FM, Sofian T, Beddoe T, Schuelein R, Newton HJ, et al. (2014). Multiple ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases facilitate intracellular replication of *Legionella pneumophila*. *The Biochemical journal* (462), pp 279-89.
92. Romero GAS, Boelaert M, (2010). Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America—A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis* (4), 1, pp 584.
93. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*, second edition. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring, NY.
94. Sansom FM, Robson SC, Hartland EL (2008). Possible effects of microbial ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases on host-pathogen interactions. *Microbiol Mol Biol Rev* (72), pp 765-781.
95. Sansom FM (2012). The role of the NTPDase enzyme family in parasites: what do we know, and where to from here? *Parasitology*, (139), pp 963–980.
96. Santos RF, Possa MA, Bastos MS, Guedes PM, Almeida MR, Demarco R, et al. (2009). Influence of Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity on *Trypanosoma cruzi* infectivity and virulence. *PLoS neglected tropical diseases*, (3), pp 387.
97. Savoia D, (2015). Recent updates and perspectives on leishmaniasis. *The Journal of Infection in Developing Countries, North America*, (9), 6, pp 588-596.

98. Serafim TD, Figueiredo AB, Costa PA, Marques-da-Silva EA, Goncalves R, de Moura SA, et al (2012). Leishmania metacyclogenesis is promoted in the absence of purines. *PLoS neglected tropical diseases*, (6), pp 1833.
99. Sheedy C, Yau KY, (2011). Principles of Immunoassays. Book chapter in *Immunoassays In Agricultural Biotechnology*. Guomin Shan, eds. by John Wiley & Sons.
100. Silva DA, Madeira MF, Abrantes TR, Filho C. J. L. B., Figueiredo F. B. (2013). Assessment of serological tests for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *The Veterinary Journal*, (195), 2, pp 252–253.
101. Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology* (165), pp 1–18.
102. Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G, (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, (4), pp 86.
103. Solano-Gallego L, Villanueva-Saz S, Carbonell M, Trotta M, Furlanello T, Natale A, (2014). Serological diagnosis of canine leishmaniosis: comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan®, ID Screen® and Leishmania 96®), a rapid test (Speed Leish K®) and an in-house IFAT. *Parasites & Vectors*, (7), pp 111.
104. Solcà MdS, Bastos LA, Guedes CES, Bordoni M, Borja LS, et al. (2014). Evaluating the Accuracy of Molecular Diagnostic Testing for Canine Visceral Leishmaniasis Using Latent Class Analysis. *PLoS ONE* (9), 7, pp 103635.
105. Spudeit DA, Dolzan MD, Micke GA, (2012). Conceitos básicos em Eletroforese Capilar. *Scientia Chromatographica*, (4), 4, pp 287-297. Instituto Internacional de Cromatografia.
106. Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, Sundar S, (2011). Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, (105), 1, pp 1–6.
107. Tagliaro F, Manetto G, Crivellente F, Smith FP, (1998). A brief introduction to capillary electrophoresis. *Forensic Science International*, (92), 2-3, pp 75-88.
108. Talmi-Frank D, Nasereddin A, Schnur LF, Schonian G, Toz SO, et al. (2010). Detection and Identification of Old World Leishmania by High Resolution Melt Analysis. *PLoS Negl Trop Dis* (4), 1, pp 581.

109. Valdez-Cruz NA, Caspeta L, Perez NO, Ramirez OT, Trujillo-Roldan MA, (2010). Production of recombinant proteins in *E. coli* by the heat inducible expression system based on the phage lambda pL and/or pR promoters. *Microb Cell Fact*, (9), pp 18.
110. Vasconcellos RS, (2010). Expressão heteróloga e caracterização bioquímica da Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase-2 (NTPDase-2) de *Leishmania infantum chagasi*. Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal de Viçosa.
111. Vasconcellos RS, Mariotini-Moura C, Gomes RS, Serafim TD, Firmino Rde C, Silva EBM, et al. (2014). *Leishmania infantum* ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 is an apyrase involved in macrophage infection and expressed in infected dogs. *PLoS Neglect Trop D*, (8), pp 3309.
112. Volf P, Hostomska J, Rohousova I, (2008). Molecular crosstalks in *Leishmania*-sandfly-host relationships. *Parasite* (15), pp 237–243.
113. Xiulan S, Xiaolion Z, Jian T, Zhou J, Chu FS, (2005). Preparation of gold-labeled antibody probe and its use immunochromatography assay for detection of aflatoxin B1. *Int. J. Food Microbiol.* (99), pp 185.
114. Xu Q, Xu H, Gu H, Li J, Wang Y, Wei M, (2009). Development of lateral flow immunoassay system based on superparamagnetic nanobeads as labels for rapid quantitative detection of cardiac troponin I. *Materials Science and Engineering: C*, (29), 3, pp 702–707.
115. Zimmermann H, (2008). ATP and acetylcholine, equal brethren. *Neurochemistry International*, (52), 4–5, pp 634–648.
116. Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N, (2012). Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signalling* (8), pp 437–502.