

RONNY FRANCISCO DE SOUZA

**EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE
NTPDase2 DE *Leishmania infantum* E SUA APLICAÇÃO NO
IMUNODIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE CANINA.**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S729e
2012

Souza, Ronny Francisco de, 1977-

Expressão e purificação da proteína recombinante
NTPDase2 de *Leishmania infantum* e sua aplicação no
imunodiagnóstico da leishmaniose canina / Ronny Francisco
de Souza. – Viçosa, MG, 2012.
xi, 197f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Texto em português e inglês.

Orientador: Juliana Lopes Rangel Fietto.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 57-64

1. Leishmaniose. 2. Cão - Doenças - Diagnóstico.
3. Proteínas recombinantes. 4. NTPDase. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 636.708969364

RONNY FRANCISCO DE SOUZA

**EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE
NTPDase2 DE *Leishmania infantum* E SUA APLICAÇÃO NO
IMUNODIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE CANINA**

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

APROVADA: 29 de maio de 2012

Eduardo de Almeida Marques da Silva

Antônio Helvécio Tótola

Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo
(Coorientador)

Paula Dias Bevilacqua

Juliana Lopes Rangel Fietto
(Orientadora)

*À minha doce e Linda esposa,
Lidy
Ao meu primogênito e fonte do
acaso dos meus genes, Guilherme*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, através do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e do BIOAGRO, pela oportunidade para o realização desse trabalho.

À Minha Orientadora, Professora Juliana Lopes Rangel Fietto, pela confiança, responsabilidade na orientação desse trabalho.

Às Professoras Márcia Rogéria de Almeida Lamego e Maria Terezinha Bahia pela coorientação e colaboração dada ao trabalho.

À minha esposa, Lidiany Angélica Marques, que tem estado ao meu lado em todo tempo apoiando e me fazendo sempre acreditar que tudo vai dar certo. Por suportar tudo ao meu lado como sempre, serena e aconselhadora.

À minha prole, Guilherme Marques Francisco de Souza, que já nasceu guerreiro por suportar a minha ausência, quando ao mesmo tempo precisava da minha presença.

Ao meu Pai, pelo apoio e por sempre acreditar em mim. Obrigado pela amizade e amor incondicional.

A minha sogrona, Maria Auxiliadora Marques, que como diz o nome é mãe e auxiliadora. Muito obrigado pelo apoio em muitos momentos nesse período, em que Eu, Lidy e Guilherme precisamos.

Ao laboratório LIMA, pela oportunidade do desempenho desse trabalho, bem como as equipes de trabalho das linhas de pesquisa coordenado pelas professoras Juliana Lopes Rangel Fietto e Márcia Rogéria de Almeida Lamego e professor Abelardo Silva. Aos alunos Igor, Anna Cláudia e Jean pela cooperação nesse trabalho. Em especial a dois grandes amigos Ramon de Freitas Santos (Mamona) e Matheus de Silva Bastos (Doze) pelos momentos aqui compartilhados.

À professora Terezinha Bahia e George Lins da Universidade Federal de Ouro Preto-UFOP pela parceria em ceder amostras sorológicas caninas. Ao Pós-Doutorando Ivo Caldas-UFOP, um amigo e colaborador dos meus experimentos, que sempre me respondeu prontamente aos chamados para a realização das minhas atividades em Ouro Preto-MG, não importando o dia, nem hora. Obrigado pela parceria nos trabalhos sorológicos.

Ao Centro de Controle Zoonótico de Governador Valadares-MG, na pessoa da médica Veterinária Aimara da Costa Pinheiro, por ceder as amostras dos cães eutanasiados no Centro.

Ao Doutorando Talles Maciel, que não mediu esforços em estar acompanhando nessa campanha de coleta de amostras dos cães eutanasiados em Governador Valadares.

Ao Doutorando Gabriel Tafur, do Laboratório de Doenças Parasitárias, pela parceria na produção, juntamente com a aluna Anna Cláudia, das lâminas coradas por Giemsa e H&E e imunohistoquímica.

Ao técnico do laboratório-LIMA, Sr. Valdir, pelo auxílio sem objeção na condução dos trabalhos.

À Republica Tigrada (Ouro Preto), que ainda tem contribuído para os trabalhos do grupo apirase e em especial por sempre me receber de portas abertas contribuído para realização das minhas atividades acadêmicas.

Meu muito obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
1.1.1 LEISHMANIOSE.....	2
1.1.2 DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE CANINA.....	4
1.1.2.1 Parasitológico.....	4
1.1.2.2 Métodos de detecção do DNA do parasita.....	5
1.1.2.3 Imunodiagnóstico.....	5
1.1.2.4 Teste imunocromatográfico.....	7
1.1.3 ENTPDases.....	8
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
2.1 AMOSTRAS DE SORO.....	10
2.2 ANIMAIS.....	10
2.3 COLETA DE AMOSTRAS DE SANGUE.....	10
2.4 COLETA E ARMAZENAMENTO DOS TECIDOS.....	11
2.5 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE NTPDase2....	11
2.6 DIAGNÓSTICO DIRETO.....	14
2.6.1 CITOLOGIA POR DECALQUE (“IMPRINT”).....	14
2.6.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	14
2.6.2.1 Coloração Hematoxilina e Eosina (H&E).....	14
2.6.2.2 Coloração por giemsa lento	15
2.6.2.3 Imunohistoquímica.....	15
2.7 DIAGNÓSTICO INDIRETO.....	16
2.7.1 ENSAIO DE IMUNOADSORÇÃO LIGADO À ENZIMA-ELISA.....	16
2.7.2 ENSAIO IMUNOCROMATOGRÁFICO.....	17
2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	17
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
3.1 PURIFICAÇÃO DA NTPDase2 RECOMBINANTE.....	19
3.1.1 PADRONIZAÇÃO DA PURIFICAÇÃO DA NTPDase2 RECOMBINANTE DE <i>L. infantum</i> : PREPARAÇÃO DOS CORPOS DE INCLUSÃO.....	19
3.1.2 TESTE DE CONCENTRAÇÃO DE IMIDAZOL E DA CONCENTRAÇÃO DE	19

<i>URÉIA NO RENDIMENTO DE PURIFICAÇÃO.....</i>	
<i>3.1.3 TESTE DA CONCENTRAÇÃO DE NaCl E DITIOTREITOL NO RENDIMENTO DE PURIFICAÇÃO.....</i>	<i>26</i>
<i>3.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE USO DA rNTPDase2 NO IMUNODIAGNÓSTICO DE LVC POR ELISA.....</i>	<i>36</i>
<i>3.2.1 TESTE DA QUANTIDADE DA NTPDASE2 RECOMBINANTE.....</i>	<i>36</i>
<i>3.2.2 ELISA EM SOROTECA USANDO rNTPDase2: AMOSTRAS DE CARATINGA – REGIÃO ENDÊMICA DE LV HUMANA.....</i>	<i>38</i>
<i>3.2.3 ELISA EM SOROTECA USANDO rNTPDase2: AMOSTRAS DE GOVERNADOR VALADARES – REGIÃO ENDÊMICA PARA LTA.....</i>	<i>42</i>
<i>3.3 ANÁLISE PARASITOLÓGICA DAS AMOSTRAS DE GOVERNADOR VALADARES.....</i>	<i>46</i>
<i>3.4 ENSAIO IMUNOCROMATOGRÁFICO.....</i>	<i>53</i>
<i>4. CONCLUSÃO.....</i>	<i>56</i>
<i>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</i>	<i>57</i>
<i>ANEXOS.....</i>	<i>65</i>
<i>ANEXO1.....</i>	<i>66</i>
<i>ANEXO2.....</i>	<i>90</i>
<i>ANEXO3.....</i>	<i>138</i>
<i>ANEXO4.....</i>	<i>174</i>

RESUMO

SOUZA, Ronny Francisco de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2012. **Expressão e purificação da proteína recombinante NTPDase2 de *Leishmania infantum* e sua aplicação no imunodiagnóstico da leishmaniose canina.** Orientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto. Coorientadores: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo, Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo e Sérgio Oliveira de Paula.

No Brasil as leishmanioses são doenças de carácter zoonótico, sendo transmitida por flebótomos hematófagos da família Psychodidae. O desenvolvimento das formas clínicas: tegumentares ou visceral, está intimamente ligado à espécie envolvida na infecção e ao estado imunológico do indivíduo infectado. O cão é atualmente o principal reservatório de importância epidemiológica. A eliminação de cães infectados é hoje uma das ações de vigilância epidemiológica, sendo orientada por sorodiagnóstico. Nesse estudo a NTPDase2 de *L. infantum* foi expressa de forma heteróloga em *E. coli*, e purificada. A proteína rNTPDase2 purificada foi utilizada em ensaio de ELISA indireto em dois bancos de soros. Um banco montado com amostras do município de Caratinga, uma região endêmica para Leishmaniose Visceral Canina (LVC) e o outro banco com amostras do município de Governador Valadares, uma região endêmica para Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Também foram incluídas neste estudo 30 amostras de soro de cães de região não endêmica para LVC infectados experimentalmente com *T. cruzi*. Para as amostras de Caratinga a rNTPDase2 purificada foi utilizada na concentração de 0,5 µg. A sensibilidade foi 100% (IC 95%: 92,60% a 100,0%), a especificidade 100% (IC 95%: 86,77% a 100,0%) e o índice de concordância foi excelente ($k= 1$). Para as amostras de Governador Valadares o antígeno foi utilizado em três concentrações: 0,5, 1 e 2 µg. Para essas concentrações a sensibilidade variou de 91,67 a 95,35% e a especificidade foi de 100%, o índice de concordância foi excelente ($k> 0,8$). Amostras de tecidos de 48 cães do município de Governador Valadares foram também utilizadas para ensaio parasitológico direto. Na técnica de *imprint* foi utilizado tecido de baço e fígado corados com panótico rápido (sensibilidade= 79,16%). Utilizando linfonodo em cortes de 0,5 µM e corados com Giemsa Lento, H&E, a

sensibilidade foi de 100% para ambas as técnicas. Na técnica de imunohistoquímica, utilizando soro hiperimune de coelho anti-rNTPDase2, a sensibilidade foi 89,58%. A rNTPDase2 também foi usada em ensaio imunocromatográfico piloto mostrando o potencial para o uso neste tipo de teste. Neste estudo é demonstrado que a rNTPDase2 pode ser utilizada como um novo e potencial antígeno no diagnóstico da LVC.

ABSTRACT

SOUZA, Ronny Francisco de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2012. **Expression and purification of recombinant NTPDase2 *Leishmania infantum* and its application in immunodiagnosis of canine leishmaniasis.** Adviser: Juliana Lopes Rangel Fietto. Co-advisers: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo, Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo and Sérgio Oliveira de Paula.

In Brazil leishmaniasis are zoonotic diseases character, being transmitted by blood-sucking sand flies of the family Psychodidae. The development of clinical forms: visceral or cutaneous, is closely related to species involved in infection and immune status of the infected individual. The dog is currently the main reservoir of epidemiological importance. The elimination of infected dogs is now one of the epidemiological surveillance activities, being guided by serodiagnosis. In this study, NTPDase2 *L. infantum* is heterologously expressed in *E. coli* and purified. rNTPDase2 purified protein was used in ELISA assay of sera of two banks. A bank with samples mounted in the city of Caratinga-MG, an endemic area for Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) and the other bank with samples of the city of Governador Valadares-MG, a region endemic for American Cutaneous leishmaniasis (ACL). Also included in this study serum samples from 30 dogs from non-endemic area for CVL experimentally infected with *T. cruzi*. For samples purified Caratinga the rNTPDase2 was used at a concentration of 0,5 µg. The sensitivity was 100% (95% CI: 92,60% to 100,0%), specificity 100% (95% CI: 86,77% to 100,0%) and the index of agreement was excellent (k = 1). For samples Valadares antigen was used in three concentrations: 0,5, 1 and 2 µg. For these concentrations the sensitivity ranged from 91,67 to 95,35% and specificity was 100%, the level of agreement was excellent (k > 0,8). Tissue samples from 48 dogs in the city of Governador Valadares were also used for direct parasitological test. In the technique was used to imprint the spleen and liver tissue stained with fast Panotic (sensitivity = 79,16%). Using lymph node cuts of 0.5 µM and stained with slow Giemsa, H & E, the sensitivity was 100% for both techniques. In immunohistochemistry, using anti rabbit rNTPDase2 hyperimmune serum, the sensitivity was 89,58%. The rNTPDase2 also been used in immunochromatographic assay pilot demonstrating the potential for

use in this type of test. In this study it is shown that rNTPDase2 can be used as a new potential antigen for the diagnosis of CVL.

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é registrada no Brasil como sendo resultante da infecção por *Leishmania chagasi* (revisado por Bauzer *et al.*, 2007). O nome *Leishmania chagasi* foi dado inicialmente ao agente etiológico da leishmaniose visceral da América do Sul para distingui-la de *L. infantum* e *L. donovani* (Adler, 1940). A *L. chagasi* é considerada como um sinônimo de *L. infantum* (Mauricio *et al.*, 1999), sendo também denominada *L. infantum chagasi*. O vetor da *L. infantum chagasi* e principal vetor envolvido na transmissão da leishmaniose visceral na América Central e Sul é o flebótomo do gênero *Lutzomyia* (revisado por Bauzer *et al.*, 2007).

O cão é considerado um importante reservatório do parasito pela sua proximidade com o ser humano e constitui o principal elo na cadeia de transmissão de leishmaniose visceral nas zonas urbanas. A prática da eutanásia canina é recomendada a todos os animais sororreagentes e/ou parasitológicos positivos (Ministério da saúde, 2006). Apesar de várias drogas utilizadas para tratamento da doença serem capazes de melhorar os sinais clínicos ou atingir a cura clínica dos cães, nenhum desses tratamentos elimina completamente a infecção (Noli & Auxilia, 2005), pois os cães continuam como portadores do parasito (Manna *et al.*, 2008). Deste modo, o Ministério da Saúde atualmente não permite o tratamento dos animais infectados, indicando a sua eliminação (Portaria interministerial nº 1.426 de 11 de julho de 2008).

De acordo com Gradoni (2002), o método ideal de diagnóstico para LVC deve ser de baixo custo, rápido e mostrar uma alta razão de sensibilidade e especificidade. O desempenho dos métodos sorológicos utilizados atualmente é limitado pelos antígenos empregados, que são quase sempre derivados de promastigotas de cultura, parasitos íntegros ou moléculas solúveis, apresentando reações cruzadas com outras espécies da família Trypanosomatidae e até mesmo com microorganismos filogeneticamente distantes (Sundar *et al.*, 2002).

Das técnicas sorológicas, o teste de ELISA é o mais utilizado para o imunodiagnóstico da LVC, pois é um teste rápido e de fácil execução, conforme descrito por Gontijo & Melo (2004).

A realização de teste imunocromatográfico em diagnóstico tem sido utilizada desde 1980 (Leuving et al., 1980; Zuk et al., 1985). A vantagem desses testes é que são seguros e de fácil execução, sendo que foram criados devido à necessidade de uma detecção rápida e eficaz. Um dos importantes avanços no diagnóstico da LVC foi a identificação e produção de antígenos recombinantes (Burns et al., 1993), sendo a proteína rK39 uma das primeiras a ser utilizada no diagnóstico sorológico da LVC (Sundar et al., 1998). Apesar de existirem vários testes com antígenos recombinantes no mercado os mesmos apresentam falhas, especialmente relacionadas à especificidade e à dificuldade de detecção de amostras de animais assintomáticos, o que justifica a procura por novos antígenos.

Nesse trabalho, buscou-se a validação de um novo antígeno recombinante, a NTPDase2 de *L. infantum* por ELISA, avaliando-se sua sensibilidade para detectar amostras de animais independentemente do estágio da infecção e a especificidade em relação a reatividade cruzada com soros de cães infectados por *T. cruzi*. Além disso, o antígeno rNTPDase2 também foi avaliado em ensaio preliminar de imunocromatografia.

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 LEISHMANIOSE

As leishmanioses compreendem um conjunto de enfermidades cujos agentes etiológicos são espécies do gênero *Leishmania*. Dependendo da espécie em questão e do hospedeiro, as leishmanioses podem se dividir classicamente em duas formas clínicas básicas: visceral e tegumentar ou cutânea. A forma visceral, se não tratada, costuma ser fatal. Já as formas cutâneas, apesar de raramente evoluírem para a fatalidade, são mutilantes (forma mucosa e muco-cutânea) e desagradáveis, especialmente quando da existência de múltiplas lesões (formas cutânea-difusa e cutânea). As leishmanioses são consideradas primariamente zoonoses, porém como acometem também ao ser humano, podem ser consideradas antropozoonoses. Este fato está relacionado ao desenvolvimento econômico e a mudanças de hábitos e ambientais que expõem mais a população aos vetores da doença. Atualmente, as leishmanioses estão

entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo (TDR/WHO, 2010). Segundo a Organização Mundial de Saúde (TDR/WHO, 2010) a leishmaniose é endêmica em 88 países distribuídos por 4 continentes. Mais de 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Irã, Afeganistão, Síria, Arábia Saudita, Brasil e Peru e mais de 90% dos casos da forma visceral ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão. Ainda segundo a OMS, o número de casos de leishmaniose cutânea (LC) vem crescendo no Brasil nos últimos anos (1998: 21.800 casos; 1999: 30.550 casos; 2000: 35.000 casos). Só em 2009, mais de 21.000 novos casos foram notificados.

A leishmaniose visceral apresenta alta incidência e letalidade, principalmente em indivíduos não tratados e crianças desnutridas. Além disso, é considerada emergente e oportunista em indivíduos portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (Ministério da Saúde, 2006). No Brasil, a LV inicialmente tinha um caráter eminentemente rural, no entanto, vem se expandindo para as áreas urbanas de médio e grande porte. Este fato parece estar estreitamente relacionado com a presença de cães domésticos como reservatórios dos parasitos. Assim, a leishmaniose visceral canina (LVC) se torna o foco de vários estudos, visto a importância do cão como animal doméstico e a sua relevância como reservatório da doença. De acordo com a literatura, várias vertentes são necessárias ainda para o controle da LVC, como o controle de reservatórios e de vetores, uso de material impregnado com inseticidas e diagnóstico e tratamento rápidos (Chappuis et al., 2007).

A prática da eutanásia canina é recomendada a todos os animais sororreagentes e/ou parasitológico positivos (Alencar, 1961, Ministério da saúde, 2006). Apesar de várias drogas utilizadas para tratamento da doença serem capazes de melhorar os sinais clínicos ou atingirem a cura clínica dos cães, nenhum desses tratamentos viavelmente elimina a infecção (Noli & Auxilia, 2005), pois os cães continuam como portadores do parasito (Manna *et al.*, 2008). Segundo o Ministério da Saúde (2006), as tentativas de tratamento da leishmaniose visceral canina por meio de drogas tradicionalmente empregadas, como: antimoniato de meglumina, anfotericina B, isotionato de pentamidina, alopurinol, cetoconazol, fluconazol, miconazol, itraconazol, têm baixa eficácia, além de possibilitarem o risco de selecionar parasitos resistentes às drogas

utilizadas para o tratamento humano. Desde modo, o Ministério da Saúde atualmente não permite o tratamento dos animais infectados indicando a sua eliminação (Portaria interministerial nº 1.426 de 11 de julho de 2008).

1.1.2 DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE CANINA

O diagnóstico da LVC é ainda um desafio para médicos veterinários devido à grande variedade de sinais clínicos e a percentagem de cães assintomáticos (Baneth, 2006; Ikeda-Garcia e Feitosa, 2006). Assim, um acurado teste diagnóstico para LVC é necessário para o definitivo diagnóstico (Singh and Sivakumar, 2003; Ikeda-Garcia e Feitosa, 2006).

Segundo o Ministério da Saúde (2006), o diagnóstico da LVC se apresenta como um problema para os serviços de saúde pública principalmente por três fatores: a variedade de sinais clínicos semelhantes ao observado em outras doenças infecciosas, às alterações histopatológicas inespecíficas e à inexistência de um teste diagnóstico 100% específico e sensível.

Os métodos para o diagnóstico da LVC compreendem os parasitológicos, os sorológicos e os moleculares. Segundo o Ministério da Saúde (2006), o caso canino confirmado de leishmaniose visceral por critério laboratorial deve ser: cão com manifestações clínicas compatíveis com leishmaniose visceral e que apresente teste sorológico reagente ou exame parasitológico positivo (Portaria interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008).

1.1.2.1 Parasitológico

A demonstração de um único parasito ao microscópio em esfregaço é suficiente para diagnóstico da doença. Esse método permite a identificação direta do parasito na forma amastigota, quando proveniente de tecido animal e na forma promastigota a partir do cultivo e do trato digestivo de flebótomos infectados. A pesquisa direta do parasito apresenta alta especificidade, no entanto, a sensibilidade depende do tecido analisado (Siddig et al., 1988). Segundo o Ministério da Saúde (2006), a sensibilidade depende também do grau de parasitismo e do tempo de leitura da lâmina. É possível observar formas amastigotas nos esfregaços de punção aspirativa de linfonodos, de medula, baço e fígado. Os esfregaços corados com ácido panótico evidenciam, em exame

microscópico de imersão (1000x), amastigotas de forma elíptica ou arredondadas (3 a 4 µm). No entanto, além de ser invasivo este método não é adequado para estudos epidemiológicos em larga escala e até mesmo para diagnósticos individuais (Luvizotto, 2008).

1.1.2.2 Método de detecção do DNA do parasito

Muitos estudos baseados em técnicas moleculares de detecção de DNA foram desenvolvidos para detecção e identificação precisa dos parasitos sem a necessidade do isolamento do parasito em cultura. Diferentes materiais biológicos podem ser utilizados nas reações: aspirado de linfonodos, medula óssea, baço, sangue total, camada leucocitária, cultura e sangue coletado em papel filtro. Os métodos disponíveis para a identificação dos parasitos, especialmente no contexto de diagnóstico, são: método de hibridização com sondas específicas, técnica de amplificação de ácidos nucleicos, incluindo a reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para detecção de RNA e PCR somente para detecção de DNA. Os alvos para as sondas de DNA e PCR são seqüências repetidas de DNA presente nos minicírculos do kDNA de regiões conservadas (Revisado por Melo, 2004).

Apesar da PCR ser um método sensível para detecção de *Leishmania* em uma variedade de materiais clínicos de humanos e cão, ela é mais usada em estudos epidemiológicos que no diagnóstico de rotina. Essa técnica necessita de ajustes para se tornar mais simples e com custo operacional mais baixo.

1.1.2.3 Imunodiagnóstico

Vários testes não invasivos foram desenvolvidos para o diagnóstico da LV, sendo os de detecção de anticorpos os mais utilizados, pois a LV é caracterizada por uma grande estimulação policlonal de linfócitos B, que resulta em hipergamaglobulinemia. Devido às dificuldades para a demonstração direta do parasito e pela alta proporção de cães assintomáticos, métodos sorológicos são essenciais para o diagnóstico da LVC (Rosário et al., 2005). Estes testes são desenvolvidos para substituir o diagnóstico parasitológico no campo (Chappuis et al., 2005).

No Brasil, os testes mais utilizados no diagnóstico da LVC e LV humana são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) (Gontijo & Melo, 2004). Apesar de serem utilizados como referência pelo Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2006), nem sempre um resultado soropositivo pode ser conclusivo, pois várias doenças infecciosas, como tripanossomíases, ehrlichiose, babesiose, dirofilariose e borreliose podem interferir na análise, demonstrando resultados falsos positivos (Barbosa de Deus et al., 2002; Sundar et al., 2002). Também a ausência de anticorpos em cães leishmanióticos que desenvolvem uma resposta imune-humoral deficiente (anérgica), pode conduzir a resultados falso-negativos. Esses cães, que podem chegar a uma taxa de 10 a mais de 50% da população de cães infectados, não desenvolvem a doença e permanecem assintomáticos, ou então apresentam cura espontânea (Martinez-Moreno *et al.*, 1995).

Hoje o foco da pesquisa está voltado para a busca de componentes antigênicos que possam ser utilizados como instrumentos para diagnóstico específico. Um antígeno comumente utilizado é o antígeno solúvel bruto (kit biomanguinhos), que é preparado de suspensão de promastigotas em tampão fosfato (Ministério da Saúde, 2006). O desempenho dos métodos sorológicos utilizados atualmente é limitado pelos antígenos empregados, que são quase sempre derivados de promastigotas de cultura, parasitos íntegros ou moléculas solúveis, apresentando reações cruzadas com outras espécies da família Trypanosomatidae e até mesmo com microorganismos filogeneticamente distantes (Sundar et al., 2002). Segundo Almeida et. al., (2005) a utilização de antígeno solúvel bruto empregado no diagnóstico da leishmaniose canina é uma alternativa de baixo custo e de fácil execução, no entanto, a reatividade cruzada com outros agentes, tais como *Trypanosoma cruzi* (Barbosa-de-Deus et al, 2002), foi relatada. O Kit biomanguinhos é fornecido pelo Ministério da Saúde para os laboratórios credenciados em dar o diagnóstico da LVC. A sensibilidade por ELISA usando esse preparo varia de 80% a 100%, mas as reações cruzadas em soros de cães com outros agentes infecciosos como *T. cruzi*, *Babesia*, *Ehrlichia* resultam em muitos resultados falsos positivos (Sundar, 2002).

A identificação de antígenos recombinantes ou purificados, que se caracterizam por induzir a formação de anticorpos específicos detectáveis nos

testes sorológicos, tem contribuído para melhorar a sensibilidade e a especificidade destes métodos (Alves & Bevilacqua, 2004). O investimento em antígenos recombinantes para serem usados como componentes antigênicos é feito desde a década de 90. Um deles é a proteína recombinante A2 de *L. donovani*. O antígeno A2 é uma família de proteínas expressas em amastigotas, sua avaliação em áreas endêmicas do Brasil, apresenta 87% de sensibilidade (Carvalho et. al. 2002).

Outro antígeno amplamente utilizado é o antígeno recombinante K39, um membro da família das kinases (Burns et. al., 1993). Este antígeno recombinante é específico para as espécies do complexo *L. donovani*. No Brasil, quando empregado em soros de cães de áreas endêmicas mostrou 91,5% de sensibilidade e 94,7% de especificidade (Lima et al., 2004). Outros estudos realizados com esse antígeno demonstraram 100% de sensibilidade para cães sintomáticos e 66% para cães assintomáticos (Porrozzini et. Al., 2007).

Assim, a busca por novos alvos que apresentem maior sensibilidade e especificidade para as várias formas clínicas da doença se faz necessária, como o proposto neste trabalho.

1.1.2.4 Teste imunocromatográfico

Atualmente, os testes rápidos têm sido empregados para o diagnóstico da LVC (Lima et al., 2010). O princípio de funcionamento é simples, baseia-se na reação específica antígeno-anticorpo. Compõe-se de uma fase sólida (membrana porosa), onde estão imobilizados elementos de captura e uma fase móvel onde estão suspensos o conjugado de captura (partícula-anticorpo) e a molécula alvo. A otimização dessa técnica possibilita após o resultado, que é obtido em 10 min, a retirada do cão infectado de circulação, impedindo este de ser o reservatório para transmissão para outros cães. Uma abordagem recente desenvolvida a partir do antígeno rK39 é o Kalazar Detect®. Estudos realizados tanto com cães quanto com humanos demonstraram que a sensibilidade deste teste varia entre 82 a 100%, enquanto que a especificidade varia de 95 a 100%, dependendo da região estudada (Chappuis et al., 2005; Sundar et al., 2006).

Assim, nesse trabalho é proposto a utilização de um novo antígeno expresso de forma heteróloga, a NTPDase2 de *L. infantum*, e a implementação

deste antígeno em teste rápido por imunocromatografia. Para ser usado futuramente como triagem em teste rápido e posterior comprovação por ELISA, como preconiza o Ministério da Saúde (2006).

1.1.3 *E-NTPDases*

A família das Ecto-Nucleosideo Trifosfato Difosfohidrolase (E-NTPDase) (3.6.1.5.) inclui as ectoenzimas que hidrolisam ligações em γ e β resíduos de fosfatos de nucleotídeos, embora com variada especificidade. Todos os membros dessa família compartilham cinco domínios de seqüência altamente conservados denominados ACRs (“Região Conservada de Apirase”) (Handa e Guidotti, 1996, Vasconcelos et al., 1996) que presumivelmente são de maior relevância para sua atividade catalítica (Smith e Kirley, 1999).

A família E-NTPDase está incluída em um grupo de proteínas conhecidas como ectonucleotidases, como a família das E-NPP (ecto-nucleotideo pirofosfatase/fosfodiesterase) e a família das ecto5'-nucleotidases (revisador por Zimmermann, 2000).

Em humanos, oito diferentes genes para *ENTPD* codificam os membros da família das proteínas E-NTPDases que podem estar presentes na membrana, na forma extracelular ou intracelular (Revisado por Robson et al., 2006).

A cascata das Ectonucleotidases iniciada pelas E-NTPDases, hidrolizando nucleotídeos tri e difosfatados, pode ser terminada pelas ecto-5'-nucleotidases (EC 3.1.3.5.) com a hidrólise de nucleotídeos monofosfatados. Juntas, ecto 5'-nucleotidase e adenosina deaminase (EC 3.5.4.4.), outra ectoenzima que está envolvida na via de salvação de purinas que converte adenosina em inosina, intimamente regulam a concentração de nucleotídeo e adenosina local, extracelular e plasmática (Goding et al. 1998, Resta et al. 1998).

Essa família de proteínas tem membros não só dentro do Reino Protista, mas também têm representantes no grupo de leveduras, invertebrados, plantas e vertebrados (Pietrangeli et al. 1981; Bermudes et al., 1994; Handa e Guidotti, em 1996; Gao et al., 1999; Steinebrunner et al., 2000; Sun). Além disto, mais recentemente, as E-NTPDases foram descritas em bactérias causadoras de pneumonia (Sansom et al., 2008)

Especificamente para protozoários, trabalhos recentes sugerem uma correlação entre a capacidade de hidrólise de ATP extracelular e seus derivados e processos de virulência, sobrevivência intracelular e adesão celular (Fietto *et al.*, 2004; Marques-da-Silva *et al.*, 2008), via regulação da sinalização de purino receptores nas células hospedeiras.

Inicialmente foram catalogados 2 genes homólogos da família E-NTPDase no genoma de *L. major*, uma isoforma menor de aproximadamente 45 kDa (gi|45120584| putative NTPDase) e a isoforma maior de aproximadamente 75 kDa (gi|15487213| possible guanosine diphosphatase) Fietto *et al.*, 2004. Atualmente, já existe disponível no GenBank os genes de *L. braziliensis* e *L. infantum chagasi*. Utilizando oligonucleotídeos iniciadores desenhados inicialmente para os genes de *L. major* foi possível clonar os ortólogos de *L. chagasi* e *L. amazonensis*. Além destas clonagens gênicas, foi feita a expressão heteróloga da isoforma maior de *L. major* em sistema bacteriano (isoforma de 78,2 kDa). A proteína recombinante purificada foi utilizada em testes de ELISA em soro de cães onde foi possível observar que este antígeno tem potencial para uso em diagnóstico, pois dentre os soros analisados de cães infectados, não infectados e infectados com outra parasitose (doença de chagas) o antígeno mostrou promissora sensibilidade e especificidade (Francisco-De-Souza, 2009). Estes dados deram origem a um pedido de depósito de patente nacional (Anexo2) sobre o uso das proteínas recombinantes (o pedido de patente encontra-se depositado no INPI sob o número de registro PI 1003744-6 A2 e um pedido internacional de patente WO 2011/153602 A2 (Anexo3).

No presente trabalho, a E-NTPDase2 de *L. infantum*, de aproximadamente 43,9 kDa foi avaliada como potencial antígeno para aplicação no diagnóstico da LVC de um modo geral, inicialmente por ELISA e posteriormente por imunocromatografia.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS DE SORO

Parte dos soros de cães com Leishmaniose Visceral (LVC) utilizados nesse estudo foram gentilmente cedidos pela professora Dr^a. Maria Terezinha Bahia, Laboratório de Doença de Chagas da Universidade Federal de Ouro Preto. Foram cedidos um total de 48 soros positivos para infecção por *Leishmania* sp., 26 soros negativos e 30 soros positivos para infecção por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Os soros positivos se referem a amostras coletadas no município de Caratinga, estado de Minas Gerais, Brasil. O diagnóstico positivo para LVC foi dado pelo teste de imunofluorescência indireta (RIFI) e imunoabsorção ligado à enzima-ELISA (KITS BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ). A região de Caratinga é uma região endêmica para Leishmaniose Visceral. Os soros negativos referem-se a amostras de cães de região não endêmica (Ouro Preto-MG), criados no canil da UFOP.

2.2 ANIMAIS

Nesse estudo também foram utilizados soro e tecido de 48 cães diagnosticados positivamente para LVC cedidos pelo serviço de zoonoses do Município de Governador Valadares, estado de Minas Gerais, Brasil. O trabalho foi uma parceria com a médica veterinária Aimara da Costa Pinheiro do Centro de Controle de Zoonoses. O diagnóstico positivo foi dado de acordo com o teste de imunofluorescência indireta - RIFI e/ou ensaio de imunoabsorção ligado a enzima - ELISA ambos produzidos por Bio-manguinhos (KIT BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ), os cães foram encaminhados para eutanásia. Segundo Barata et al., (2011) a região de Governador Valadares é uma região endêmica para Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).

2.3 COLETA DE AMOSTRAS DE SANGUE

Aproximadamente 10 mL de amostra de sangue periférico foram coletados de cada cão infectado naturalmente na cidade de Governador Valadares (n=48). O sangue foi transferido para tubos sem anti-coagulante e

deixado em temperatura ambiente por 30min, em seguida os soros foram obtidos por centrifugação a 400 x g por 10 min e armazenado -20°C até o uso.

2.4 COLETA E ARMAZENAMENTO DOS TECIDOS

Para os exames parasitológicos, parte do fígado, baço e os linfonodos pré-escapulares foram removidos cirurgicamente e fixados em solução de formaldeído 4% em tampão PBS (pH 7,2), por aproximadamente 24h. Em seguida os tecidos foram armazenados em álcool 70% em temperatura ambiente até o uso.

2.5 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE NTPDase2

O gene codificante da proteína rNTPDase2 (1278 pares de bases - pb) de *Leishmania infantum* (*L. infantum*) foi clonado em pGEM[®]-T Easy Vector e, posteriormente, para subclonagem em pET-21b, foram retirados 123 pb do gene, referente ao peptídeo sinal (Borges-Pereira, 2010). A construção pET-21b insere na porção amino terminal 9 pb e 24 pb na carboxi terminal (Figura 1). Essa construção adiciona sequências codificantes de uma cauda de 6 histidinas (Hexa-His) para ser utilizada no processo de purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. *Escherichia coli*, cepa BL21 (DE3) códon plus, foi transformada com o plasmídeo recombinante. O crescimento foi feito em 5mL de meio Luria Bertani – LB com ampicilina (50ug/mL) a 37°C por 16h h em shaker a 180 rpm. A cultura foi então transferida para 500 mL de meio LB/ampicilina e as células foram incubadas até a $DO_{600nm}=0,6$. A expressão da proteína recombinante foi induzida por adição de 0,2 mM isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo – IPTG.

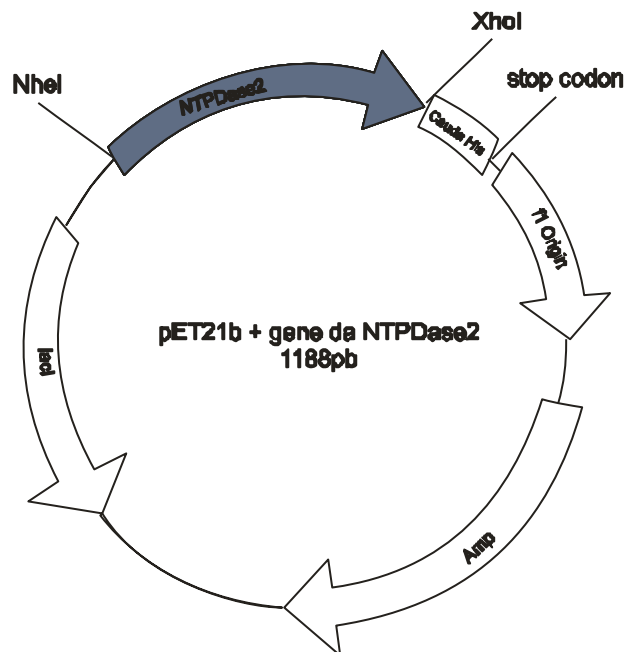


Figura 1 – Construção no vetor pET-21b(Novagen) contendo a região codificante da NTPDase2 de *L. infantum* . Mapa físico da construção indicando as principais regiões da construção bem como as características do vetor. f1 Origin= origem de replicação do plasmídeo; Amp= região codificante do gene de resistência a ampicilina a beta-lactamase;lacI= região codificante do repressor; Em azul= o gene da NTPDase2 flanqueado por sequências do sítio de restrição para NheI (Carboxi-terminal) e XhoI (Amino-terminal), seguido da cauda poli-His e o códon de parada.

Após duas hora de indução, as células foram recolhidas por centrifugação a 4000 x *g* a 4°C por 10 min em tubos de centrifuga de 50 mL e o *pellet* foi armazenado. Para purificação, a massa celular foi incubada no gelo por 15 min e resuspendida em 3 mL de tampão para lise celular (50 mM Tris pH 8,0, 100 mM de NaCl) contendo inibidores de protease (aprotinina 1 mg/mL, pepstatina 1 mg/mL, leupeptina 10 mg/mL e PMSF 1 mg/mL). Após a ressuspensão celular foi adicionada lisozima 1 mg/mL e o material foi homogeneizado e incubado no gelo por 30 min. Posteriormente a amostra foi sonicada em amplitude 20 em 6 ciclos de 10 segundos (seg) com intervalo de 10 seg entre cada sonicação. Em seguida a amostra foi centrifugada a 12000 x *g* a 4°C por 30 min. O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* (corpos de inclusão) foi recuperado. A proteína rNTPDase2 foi purificada a partir dos corpos de inclusão.

Os corpos de inclusão foram homogeneizados com 20mL de tampão (50 mM Tris, 500 mM de NaCl, 10 mM mercaptoetanol e 2 M uréia) e centrifugado à 12000 x *g* a 4°C por 30 min e o sobrenadante foi descartado. Esse procedimento foi repetido uma vez. O *pellet* formado dos corpos de inclusão (CI) foi então solubilizado em 10 mL de tampão (50 mM Tris, 500 mM de NaCl, 10 mM mercaptoetanol e 8 M ureia).

A purificação da rNTPDase2 foi feita por *batch* ou de forma automatizada em Fast Protein Liquid Chromatography – FPLC (Akta-Purifier UPC 100 da GE). Para o ensaio de purificação por *batch*, 10 mL dos corpos de inclusão solubilizados eram adicionados a 500 µL de resina de agarose Ni-NTA (HIS-Select™ Nickel Affinity Gel-SIGMA) e incubada por 1h a 4 °C, sobre agitação. Em seguida, a resina foi lavada com 5 mL do tampão contendo 50 mM Tris pH 8,0, 500 mM NaCl. As proteínas foram eluídas com 5mL do tampão contendo 50 mM de Tris pH 8,0, 300 mM NaCl e 250 mM de Imidazol. A purificação da proteína rNTPDase2 usando o FPLC (AKTA PURIFIER da GE Healthcare Life Sciences) foi feita utilizando duas colunas, a HIS TRAP FF CRUDE 1 mL e HIS PREP de 20 mL.

A quantificação da proteína recombinante foi feita pelo método de Bradford e o perfil protéico foi analisado em SDS-PAGE 10% (Sambrook et ai., 1989). Em seguida as amostras foram dialisadas. A proteína rNTPDase purificada foi submetida a eletroforese capilar para análise da pureza (Agilent 2100

Bioanalyzer), de acordo com a especificação do fabricante. A massa molecular teórica da proteína recombinante NTPDase2 é de 43,9 kDa.

2.6 DIAGNÓSTICO DIRETO

2.6.1 CITOLOGIA POR DECALQUE (“IMPRINT”)

Após a eutanásia dos cães, fragmentos de 1 a 2 cm do baço e do fígado de cada cão naturalmente infectado foram retirado e o excesso de sangue foi secado com auxílio de um papel toalha. O *imprint* foi feito em lâminas de microscopia em duplicata. Após a secagem do *imprint*, as lâminas foram submetidas à coloração em panótico rápido. As lâminas foram observadas em microscopia de luz em aumento de 100x utilizando óleo de imersão.

2.6.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após a eutanásia dos cães, os linfonodos pré-escapulares dos cães naturalmente infectados foram retirados e fixados 24h em formaldeído 4% em PBS (pH 7,2). Em seguida, foram colocados em álcool 70% e o material foi estocado. Para a análise histológica, os mesmos foram incluídos em Paraplast Plus[®] (Sigma). Para tanto, fragmentos seccionados longitudinalmente dos linfonodos foram retirados e submetidos à desidratação sequencial em álcool 70%, 80%, 90%, 100% duas vezes, por 1 h à temperatura ambiente (TA). Em seguida os tecidos foram diafanizados em xilol duas vezes por 45 min à TA e incluídos em Paraplast Plus[®] (Sigma). Os cortes histológicos foram realizados a 5µm de espessura em micrômetro de rotação LEICA. Para cada linfonodo dos 48 cães, seis cortes foram feitos, sendo dois para coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E), dois para coloração Giemsa e dois para imunohistoquímica.

2.6.2.1 Coloração Hematoxilina e Eosina (H&E)

Os cortes foram desparafinados, hidratados e montados nas lâminas. Para isso, os mesmos foram incubados em xilol à TA por 5 min, em seguida desidratados sequencialmente em álcool 100% e 90% à TA por 5 min e deixados em água corrente por 5 min. Os cortes foram coradas com hematoxilina Harris à TA por 1min e novamente deixados em água corrente por 5 min. Em seguida, foram submetidos à solução de HCl 0,5% até a intensidade desejada e deixados

em água corrente por 5 min. Os cortes foram corados com eosina 1% em solução alcoólica 70% por 20 seg. Em seguida, as lâminas foram incubadas em álcool 90% e 100% à TA por 3 min cada. As lâminas foram diafanizadas em xilol montadas com Entellan[®] entre lâmina e lamínula e observadas em microscópio óptico binocular ECLIPSE E600³.

2.6.2.2 Coloração por Giemsa lento

O meio de inclusão foi retirado por duas passagens em xilol de 30 minutos cada, sendo os cortes hidratados em soluções alcoólicas decrescentes (100%, 90%, 80% e 70%) e em água por 5 minutos. As lâminas foram recobertas em solução contendo o corante Giemsa (2 gotas para cada 10mL de água) durante 24 h. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada e passadas em solução saturada de carbonato de lítio e foram secas com papel filtro. As lâminas em seguida foram submetidas à solução de álcool absoluto e acetona (1:1) para diferenciação da coloração. Em seguida, os tecidos foram desidratados rapidamente em soluções crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e 100%) por 5 min cada. As lâminas foram diafanizadas em xilol montadas com Entellan[®] entre lâmina e lamínula e observadas em microscópio óptico binocular ECLIPSE E600³.

2.6.2.3 Imunohistoquímica

O meio de inclusão foi retirado e os cortes foram hidratados conforme descrito no parágrafo anterior. A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio metanólico 3%, durante 30 minutos à temperatura ambiente. Os cortes foram lavados duas vezes, durante 5 minutos cada, com PBS pH 7. Foi feita a digestão enzimática dos cortes utilizando-se tripsina 1 mg/mL em PBS pH 7,4 durante 10 minutos a 37°C.

Em seguida, os cortes foram cobertos com soro normal de cabra diluído a 1:10 em PBS pH 7,4 e incubados em câmara úmida durante 45 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, o excesso de soro foi enxugado evitando a secagem dos cortes e se colocou o anticorpo primário (soro de coelho anti-rNTPDase2), diluído a 1:2000 em PBS pH 7,4. Os cortes foram incubados durante 24 horas em câmara úmida a 4°C, posteriormente lavados três vezes com

PBS pH 7,4 durante cinco minutos cada e, em seguida, cobertos com o anticorpo secundário (IgG de cão anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase-Sigma), diluído a 1:10 em PBS 7,4.

Os cortes foram lavados novamente em PBS pH 7,4 durante 10 minutos e imediatamente colocados em solução reveladora recém preparada (1 mg de diaminobenzidina, 1 μ L de H₂O₂ 30v em 1 mL de PBS pH 7,4) durante 5 minutos. Finalmente, os cortes foram lavados por mais 5 minutos em PBS pH 7,4 e contra corados com hematoxilina de Harris diluída a 1:10 em PBS pH 7,4 durante 20 segundos, sendo em seguida desidratados em álcool, diafanizados em xilol e montados com Entellan[®] entre lâmina e lamínula. As lâminas foram montadas e observadas em microscópio óptico binocular ECLIPSE E600³.

2.7 DIAGNÓSTICO INDIRETO

2.7.1 ENSAIO DE IMUNOADSORÇÃO LIGADO À ENZIMA - ELISA

Para o ELISA indireto foram utilizadas placas de 96 poços (96 well Costar[®] High Binding EIA/RIA polystyrene plates-Corning Inc., 3590). O antígeno recombinante (0,5 μ g/100 μ L) foi diluído em tampão contendo 0,1 M de carbonato/bicarbonato pH 9,6 e 100 μ L desta solução foram adicionados em cada poço e as placas incubadas *overnight* a 4 °C. Em seguida, os sítios inespecíficos foram bloqueados incubando-se a placa com solução contendo 3% de BSA em PBS pH 7,6 por uma hora a 37 °C. Foram então adicionadas as amostras de soro na diluição de 1:40 em solução de BSA 1% em PBS pH 7,6 com posterior incubação por 1 hora a 37 °C. A placa foi lavada 4x com Tween 0,05% em PBS pH 7,6. Em seguida, anticorpo secundário anti-IgG de cão conjugado a peroxidase (Bethyl. Laboratories, INC, Montgomery-TX, USA) foi adicionado na diluição 1:5000. As placas foram incubadas por 1 hora a 37 °C e novamente lavada conforme descrito acima. A reação da proteína recombinante com anticorpos foi evidenciada através de revelação com 100 μ L de solução de substrato (3,75 mM de o-fenilenodiamina (OPD) e 0,01% H₂O₂), em tampão citrato-fosfato (ácido cítrico 0,1 M, fosfato de sódio 0,2 M, pH 5,0), por 15 min. A reação foi interrompida pela adição de 32 μ L de uma solução de 2,5 M H₂SO₄. A intensidade da reação é relacionada com a intensidade da coloração, sendo determinada pela leitura de absorbância a 492nm em leitora automatizada (Bio-

Tek®). A reprodutibilidade do teste de ELISA foi feito com 30% das amostras positivas e 50% das amostras negativas selecionadas randomicamente. O ensaio foi realizado em duplicata.

2.7.2 ENSAIO IMUNOCROMATOGRÁFICO

Em membrana de nitrocelulose (Whatman AE98 Fast), foi adsorvido o antígeno recombinante (0,5 µg) formando a linha teste e 2 µL de IgG de cão (SantaCruz Biotechnology), constituindo a linha controle.

O teste preliminar do ensaio imunocromatográfico foi feito utilizando uma amostra sorológica sabidamente positiva (amostra 33, de cão de Governador Valadares). Um total de 10 µL do soro foi diluído em 90 µL de tampão (0,15M NaCl; 0,01 M de fosfato de sódio pH 7,2; 5 mg/mL de albumina e 0,05% Tween 20) filtrado em membrana de 0,22 µm (TPP®). Em seguida, à solução, foi acrescida a proteína A conjugada com ouro coloidal 20 nm (Sigma). A proteína A conjugada com ouro coloidal foi testada utilizando 10, 40 e 80 µL. Após adicionar o soro ao tampão contendo proteína A conjugada com ouro coloidal, a solução foi incubada por 30 min a TA. A extremidade da membrana adsorvida com o antígeno recombinante e o IgG de cão foi colocada em contato com a solução em posição diagonal facilitando a capilaridade por aproximadamente 10min e em seguida foi seca a TA. Para análise da membrana, a imagem foi digitalizada.

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A sensibilidade e especificidade dos testes foram calculadas utilizando o software GraphPad Prism (versão 5 para Windows). Valor preditivo positivo= $TP / (TP + FP) \times 100$, valor preditivo negativo= $TN / (TN + FN) \times 100$ e Precisão= $TP + FN / (TP + FP + TN + FN)$. TN representa verdadeiro negativo, TP verdadeiro positivo, FN falso negativo e FP falso positivo.

Concordância entre os testes foi avaliada usando o coeficiente Kappa (k) (Faria et al., 2011, apud Cohen, 1968) e interpretados de acordo com a seguinte escala: 0,00-0,20, insignificante; 0,21-0,40, fraco; 0,41-0,60, moderada; 0,61-0,80, bom e 0,81-1,00 e excelente (Faria et al., 2011, apud Landis et al., 1977).

O cut-off foi estabelecido utilizando a curva ROC calculada com o software GraphPad Prism (versão 5 para Windows).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PURIFICAÇÃO DA NTPDase2 RECOMBINANTE

3.1.1 PADRONIZAÇÃO DA PURIFICAÇÃO DA NTPDase2 RECOMBINANTE DE *L. infantum*: PREPARAÇÃO DOS CORPOS DE INCLUSÃO

A rNTPDase2 testada como antígeno no imunodiagnóstico de LVC foi produzida de forma heteróloga em *E. coli*. A clonagem para expressão foi descrita anteriormente (Borges-Pereira, 2010), portanto iniciamos este trabalho na padronização da purificação do antígeno recombinante afim de consegui-lo em alto grau de pureza.

Após a expressão e solubilização dos corpos de inclusão (CI) com tampão contendo 8M de uréia, a amostra foi submetida à ultracentrifugação por 100.000 x g, garantindo que apenas proteínas solúveis ficassem no sobrenadante. Sendo assim, logo após à centrifugação, o sobrenadante foi coletado e o *pellet* armazenado e analisado por SDS-PAGE 10%. Esses resultados são visualizados no perfil eletroforético da figura 2.

Nota-se que no processo de lavagem com 2M de uréia, pouca proteína é perdida (figura 2, colunas 2 e 3) e com a ultracentrifugação, a fração insolúvel contendo os CIs que foram solubilizados com tampão contendo 8M de ureia apresenta muito menos contaminada com outras proteínas (figura 2, coluna 5).

3.1.2 TESTE DA CONCENTRAÇÃO DE IMIDAZOL E DA CONCENTRAÇÃO DE URÉIA NO RENDIMENTO DE PURIFICAÇÃO

Para purificação da proteína recombinante no FPLC, o método editado no UNICORN 5.1 (software do FPLC) para a eluição com imidazol foi inicialmente feito em passo, com objetivo de determinar qual a melhor concentração de imidazol para eluição da proteína recombinante. Também buscou-se verificar se a presença de uréia em diferentes concentrações nos tampões A e B, iria interferir na purificação da rNTPDase2. A uréia é um dos agentes caotrópicos mais utilizados na solubilização de proteínas por aumentar a solubilidade em função do rompimento das interações hidrofóbicas. Sendo assim, foi traçado um

experimento contendo três concentrações de uréia nos tampões A e B conforme visto na tabela 1.

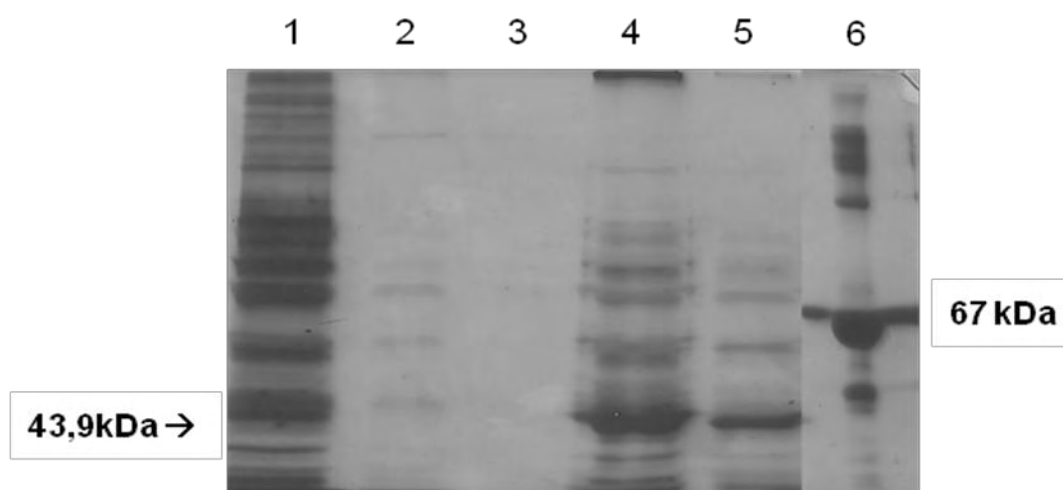


Figura 2- Análise do teste de solubilidade dos CI em SDS-PAGE 10% corado com prata. (1) fração solúvel; (2) 1ª lavagem dos corpos de inclusão (CI); (3) 2ª lavagem dos CI; (4) CI total; (5) CI solubilizado em 8M de uréia, ultracentrifugado a 100000 x g; (6) BSA como marcador molecular 67kDa.

Tabela 1- Concentrações de uréia utilizada nos tampões A e B

Concentração de Uréia	Tampão/ Concentração/pH
2M Uréia	A – 5mM Imidazol, 50mM Tris, 500mM NaCl, pH 8,3; B – 300mM Imidazol, 50mM Tris, 500mM NaCl, pH 8,3
4M Uréia	A – 5mM Imidazol, 50mM Tris, 500mM NaCl, pH 8,3; B – 300mM Imidazol, 50mM Tris, 500mM NaCl, pH 8,3;
8M Uréia	A – 5mM Imidazol, 50mM Tris, 500mM NaCl, pH 8,3; B – 300mM Imidazol, 50mM Tris, 500mM NaCl, pH 8,3;

Procedeu-se então, à purificação da NTPDase2 presentes nos CI por cromatografia de afinidade utilizando a coluna HIS TRAP FF CRUDE 1 mL. Do total de 6 mL de amostra, 2 mL foram analisados com os tampões contendo 2 M de uréia, 2 mL com os tampões contendo 4 M de uréia e 2 mL com os tampões contendo 8 M de uréia. Os resultados são apresentados nos perfis cromatográficos da figura 3A, 3B e 3C, respectivamente. A utilização da uréia nas diferentes concentrações a fim de aumentar a solubilidade das proteínas, visualmente parece ter sido mais eficiente na concentração de 8 M de uréia (figura 3C). O pico de eluição da proteína rNTPDase visualizada no cromatograma da figura 3C em comparação com os outros (figura 3A e 3B), apresenta uma base definida, não tão larga. Com relação à concentração do imidazol, é possível observar que a grande parte da proteína recombinante é eluída quando é passado 50% do competidor imidazol (figura 3A, 3B e 3C). Assim foi padronizada a utilização de 8 M de uréia nos tampões A e B, objetivando desfazer os possíveis agregados para maior acessibilidade da proteína recombinante à resina, como também foi verificando por Vasconcellos (2010). Para purificação da proteína recombinante a partir daqui, o método no UNICORN 5.1 (software do FPLC) foi editado para passagem do imidazol na concentração de 50% em um único passo, para a eluição da proteína recombinante.

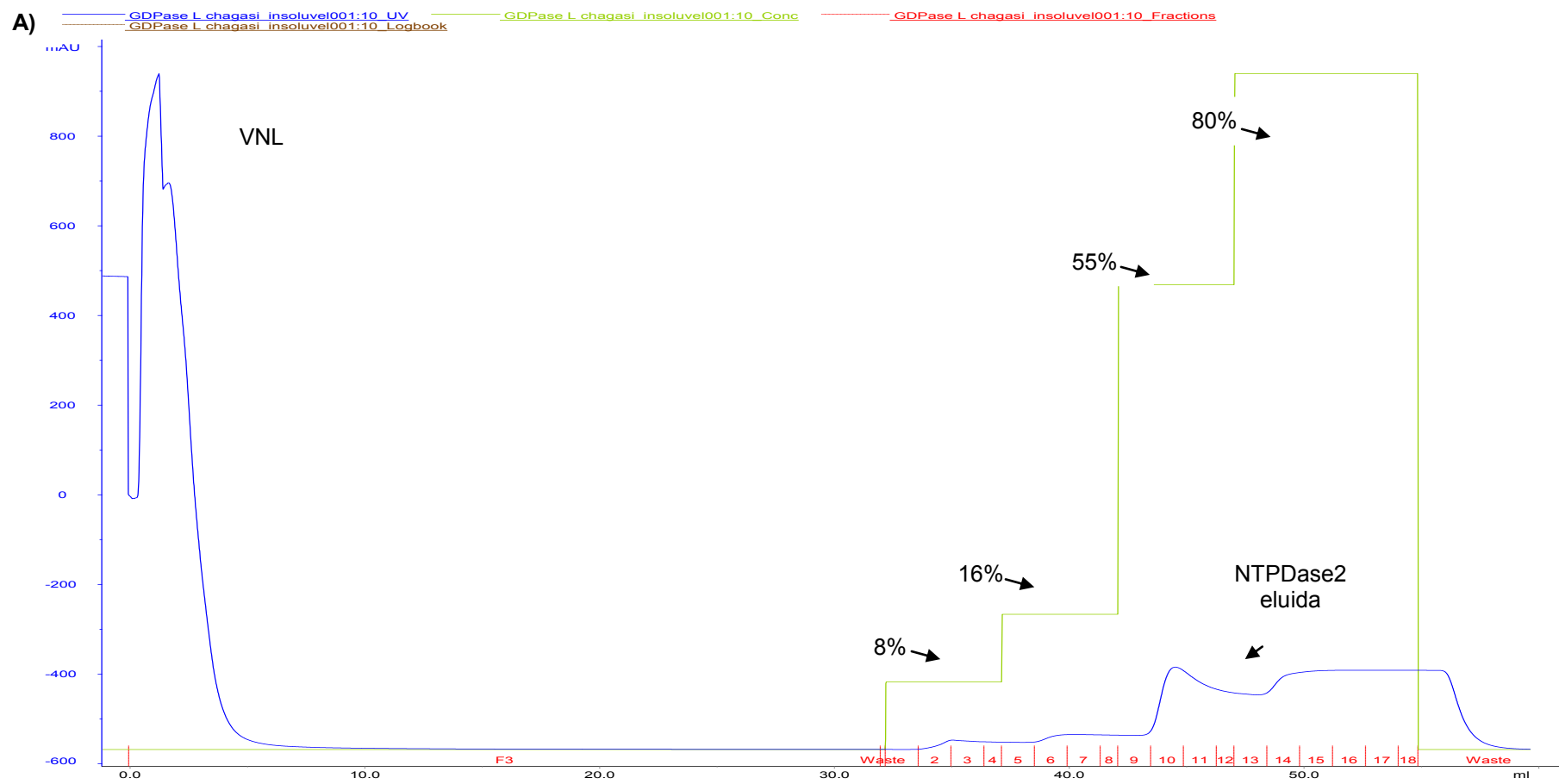


Figura 3- Perfis cromatográficos da purificação da rNTPDase2 de *L. infantum* a partir das CI solubilizados e purificados do extrato de *E. coli* BL21 (DE3). (A) Perfil cromatográfico utilizando tampões contendo 2M de uréia. (B) Perfil cromatográfico utilizando tampões contendo 4M de uréia. (C) Perfil cromatográfico utilizando tampões contendo 8M de uréia. VNL= volume não ligado; --- Absorbância a 280nm; --- concentração de imidazol no processo de purificação; --- frações coletadas.

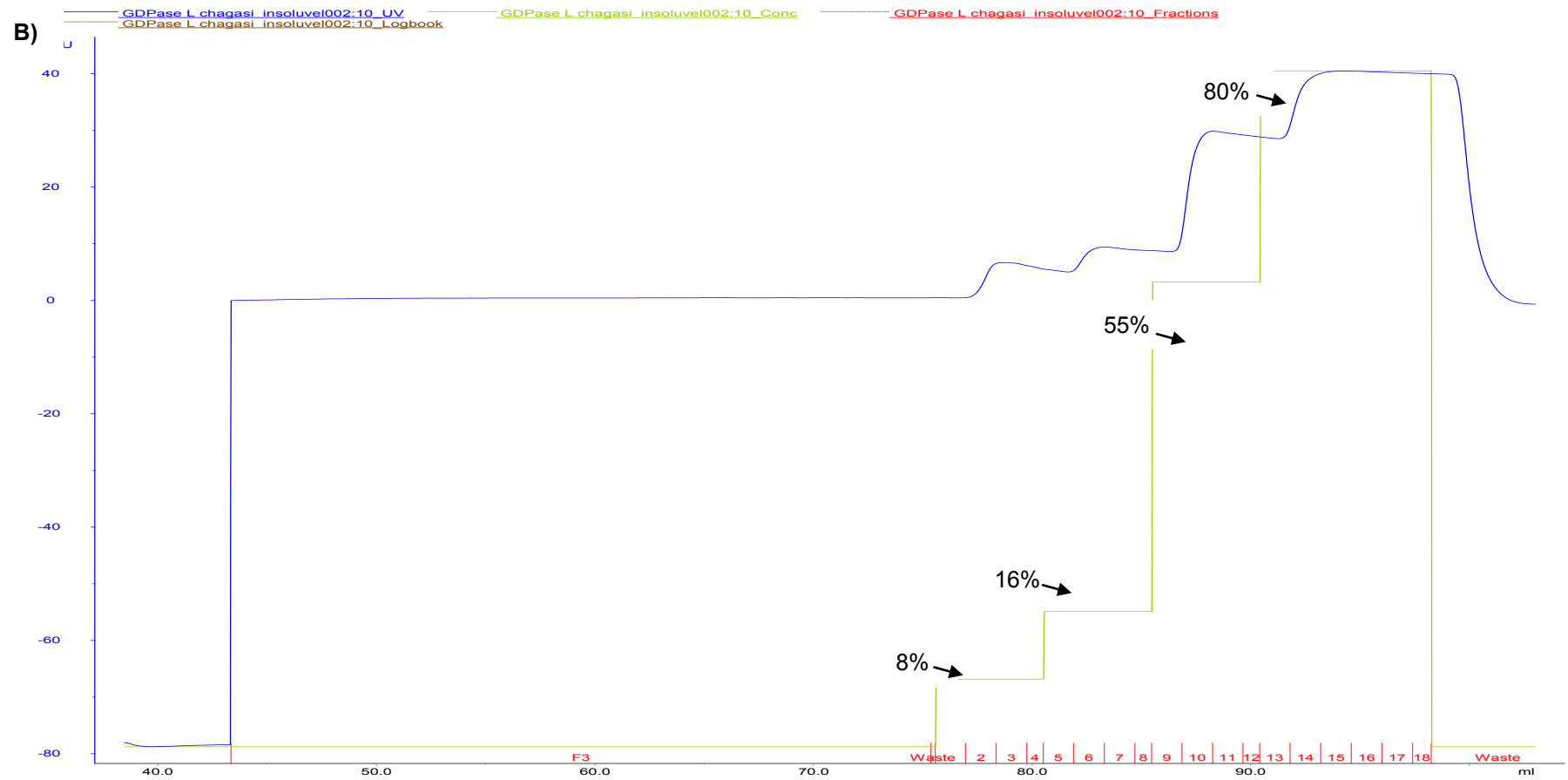


Figura 3- Perfis cromatográficos da purificação da rNTPDase2 de *L. infantum* a partir das CI solubilizados e purificados do extrato de *E. coli* BL21 (DE3). (A) Perfil cromatográfico utilizando tampões contendo 2M de uréia. (B) Perfil cromatográfico utilizando tampões contendo 4M de uréia. (C) Perfil cromatográfico utilizando tampões contendo 8M de uréia. VNL= volume não ligado; ---- Absorbância a 280nm; ---- concentração de imidazol no processo de purificação; ---- frações coletadas.

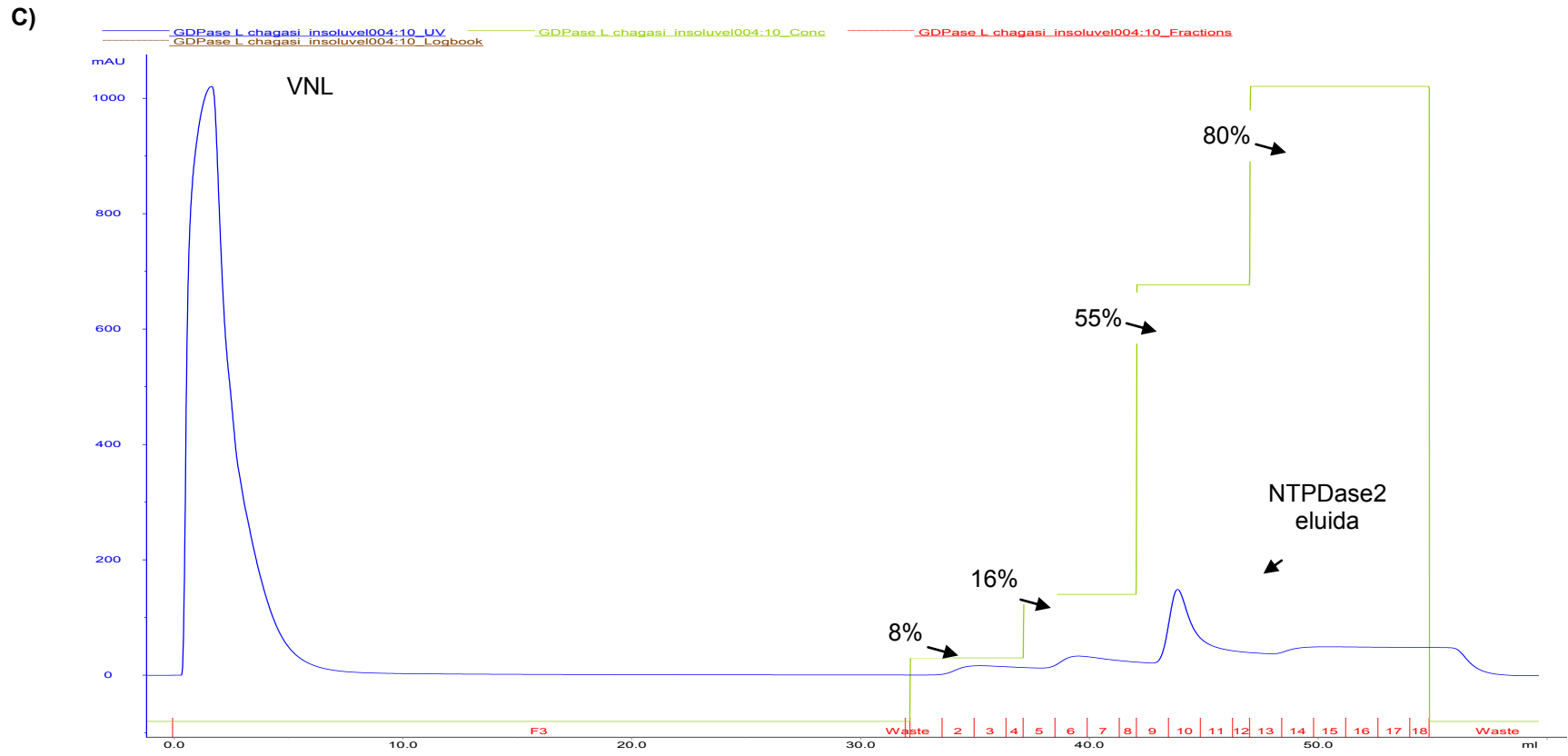


Figura 3- Perfis cromatográficos da purificação da rNTPDase2 de *L. infantum* a partir das CI solubilizados e purificados do extrato de *E. coli* BL21 (DE3). (A) Perfil cromatográfico utilizando tampões contendo 2M de uréia. (B) Perfil cromatográfico utilizando tampões contendo 4M de uréia. (C) Perfil cromatográfico utilizando tampões contendo 8M de uréia. VNL= volume não ligado; --- Absorbância a 280nm; --- concentração de imidazol no processo de purificação; --- frações coletadas.

3.1.3 TESTE DA CONCENTRAÇÃO DE NaCl E DITIO TREITOL NO RENDIMENTO DE PURIFICAÇÃO

Outro teste feito no processo de purificação foi a variação do NaCl entre 500 e 100mM nos tampões A e B permanecendo as demais condições estabelecidas nos itens anteriores. A razão da diminuição de sal principalmente aqui foi tentar aumentar a ligação da proteína recombinante na resina, visto que as interações dependem de forças que são afetadas pela concentração de íons nos tampões. Também para uma visão industrial, a diminuição dos custos até mesmo para unidade em mM é significativa. Foi testado, também, se a adição do agente redutor ditioneitol (DTT) interferiria na ligação da rNTPDase2. O DTT foi usado variando a sua concentração na amostra solubilizada em 2 e 5mM. O propósito deste teste é ver se o rompimento de pontes de sulfeto tornaria as proteínas mais disponíveis para a ligação na coluna, já que a rNTPDase2 possui várias cisteínas que podem formar pontes de sulfeto.

Como foi observado que a maior quantidade de proteína é eluída a partir da passagem de 50% do tampão B, conforme visto nos resultados dos perfis cromatográficos (figura 3A, 3B e 3C), o método no software UNICORN 5.1 foi editado para passar 50% do competidor imidazol em passo único, logo após a lavagem. Seguindo, então, o procedimento anterior, a amostra, depois de solubilizada em tampão contendo 8 M de uréia e ultracentrifugada a 100000 x g, foi analisada em cromatografia de afinidade em coluna HIS TRAP FF CRUDE 1 mL. Do total de 10 mL de amostra, 2 mL foram analisados com os tampões contendo 500 mM de NaCl, 500 µL com o tampão contendo 100 mM de NaCl, 500µL com o tampão contendo 100 mM de NaCl e 2 mM de DTT e 500 µL com o tampão contendo 100 mM de NaCl e 5 mM de DTT. O perfil cromatográfico desse resultado é visto na figura 4. Os picos foram coletados em frações de 1 mL ou 1,5 mL sendo, posteriormente, analisados por eletroforese em SDS-PAGE 10% conforme a figura 5. As frações obtidas foram quantificadas e o rendimento para cada procedimento foi calculado, exceto para os resultados onde se utilizou a combinação de NaCl e 5 mM de DTT. O resultado do rendimento pode ser visualizado na tabela 3.

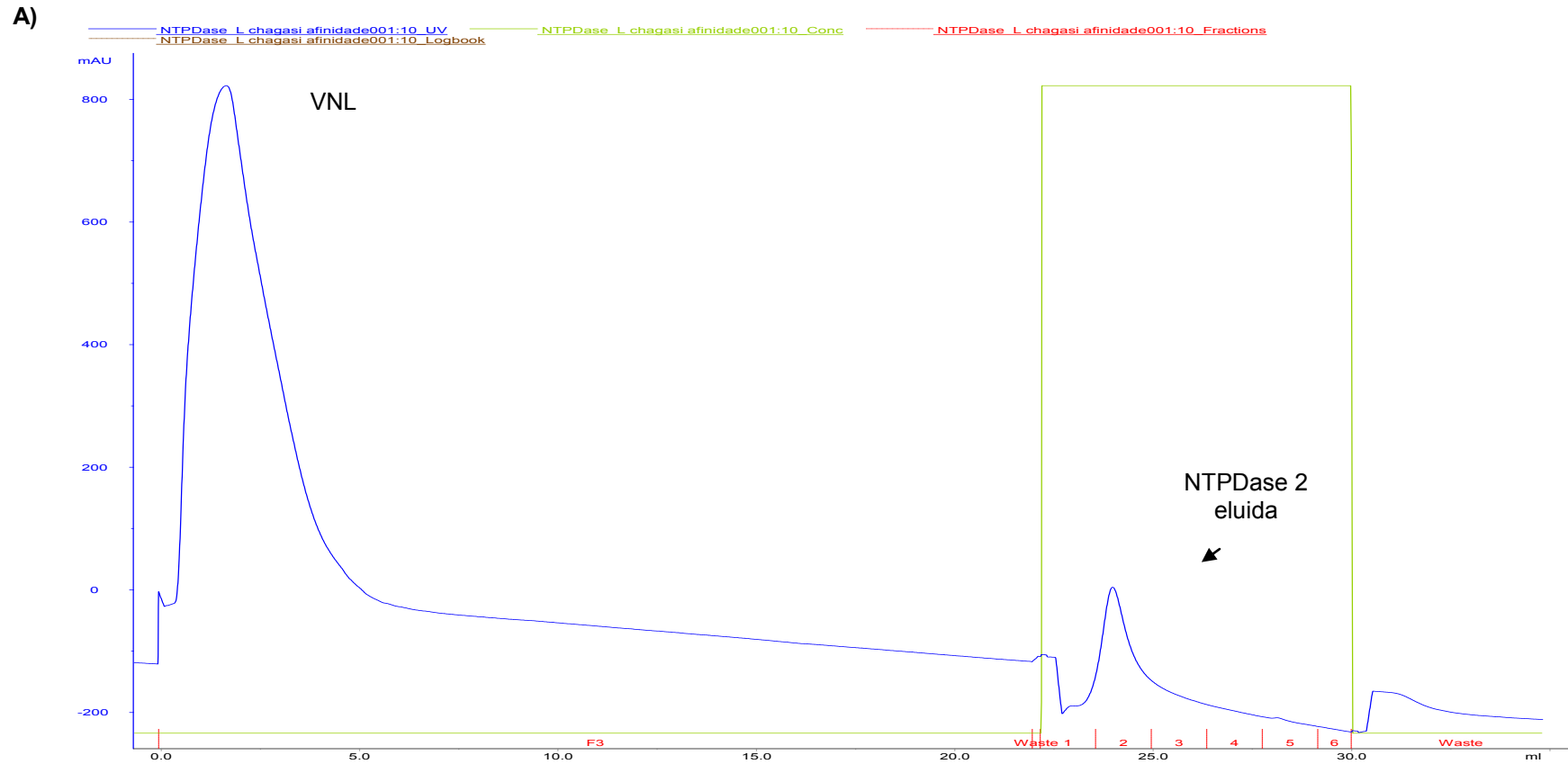


Figura 4- Perfis cromatográficos da purificação da rNTPDase2 de *L. infantum* a partir de CIs solubilizados e purificados do extrato de *E. coli* BL21 (DE3). (A) Perfil cromatográfico utilizando tampões contendo 500mM de NaCl. (B) Perfil cromatográfico utilizando tampões contendo 100mM de NaCl. (C) Perfil cromatográfico utilizando tampões contendo 100mM de NaCl e 2mM de DTT. (D) Perfil cromatográfico utilizando tampões contendo 100mM de NaCl e 5mM de DTT. VNL= volume não ligado; --- Absorbância a 280nm; --- concentração de imidazol no processo de purificação; --- frações coletadas.

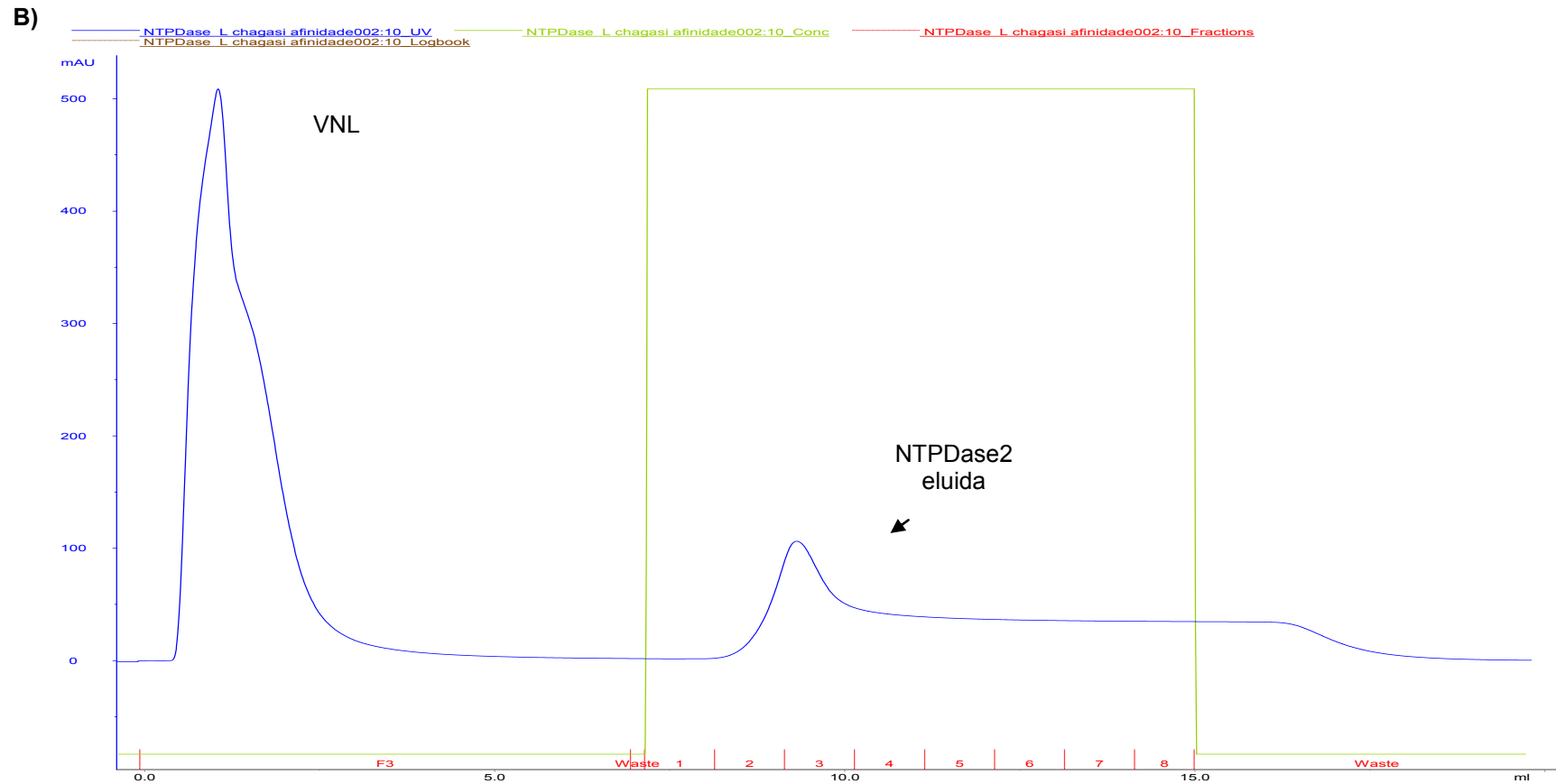


Figura 4- Perfis cromatográficos da purificação da rNTPDase2 de *L. infantum* a partir de CIs solubilizados e purificados do extrato de *E. coli* BL21 (DE3). (A) Perfil cromatográfico utilizando tampões contendo 500mM de NaCl. (B) Perfil cromatográfico utilizando tampões contendo 100mM de NaCl. (C) Perfil cromatográfico utilizando tampões contendo 100mM de NaCl e 2mM de DTT. (D) Perfil cromatográfico utilizando tampões contendo 100mM de NaCl e 5mM de DTT. VNL= volume não ligado; --- Absorbância a 280nm; --- concentração de imidazol no processo de purificação; --- frações coletadas.

c)

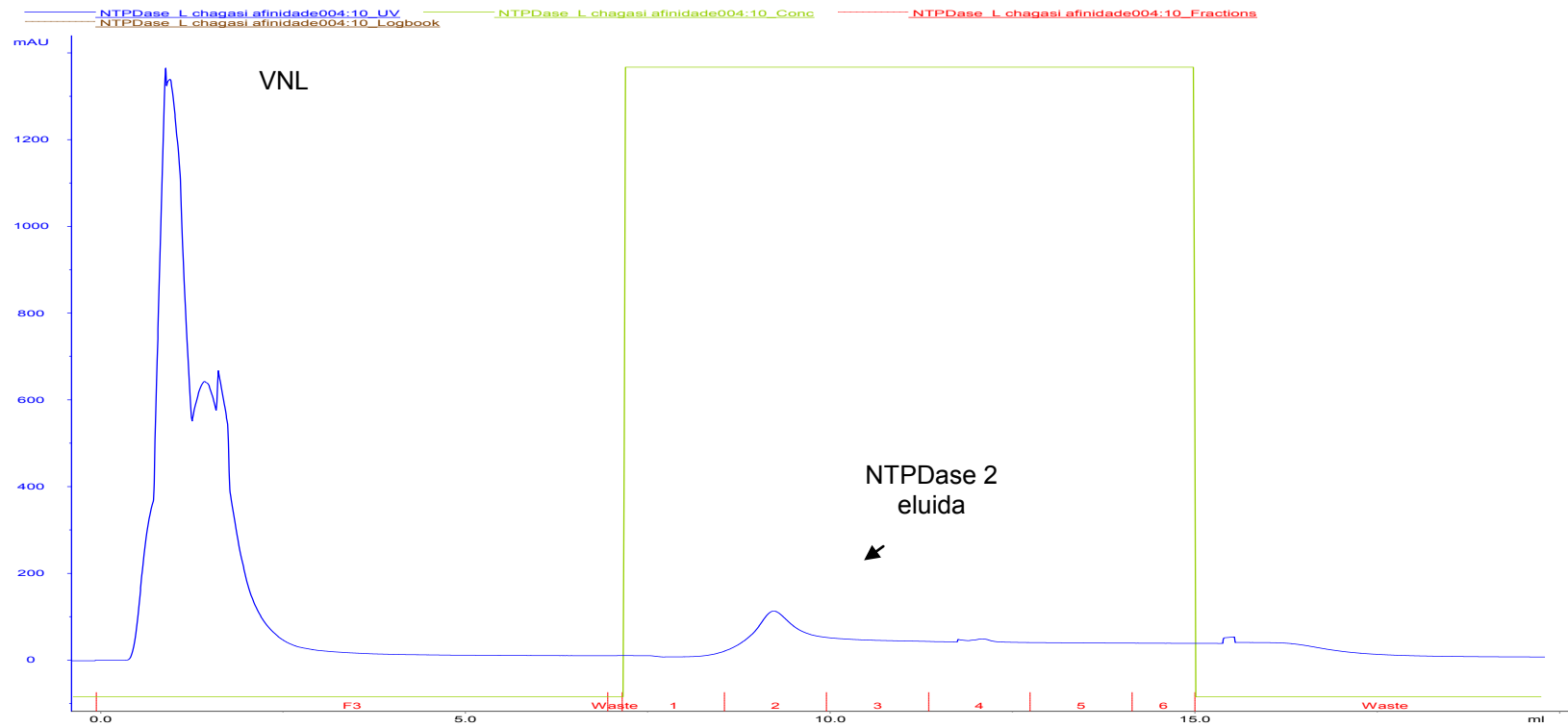


Figura 4- Perfis cromatográficos da purificação da rNTPDase2 de *L. infantum* a partir de CIs solubilizados e purificados do extrato de *E. coli* BL21 (DE3). (A) Perfil cromatográfico utilizando tampões contendo 500mM de NaCl. (B) Perfil cromatográfico utilizando tampões contendo 100mM de NaCl. (C) Perfil cromatográfico utilizando tampões contendo 100mM de NaCl e 2mM de DTT. (D) Perfil cromatográfico utilizando tampões contendo 100mM de NaCl e 5mM de DTT. VNL= volume não ligado; --- Absorbância a 280nm; --- concentração de imidazol no processo de purificação; ---- frações coletadas.

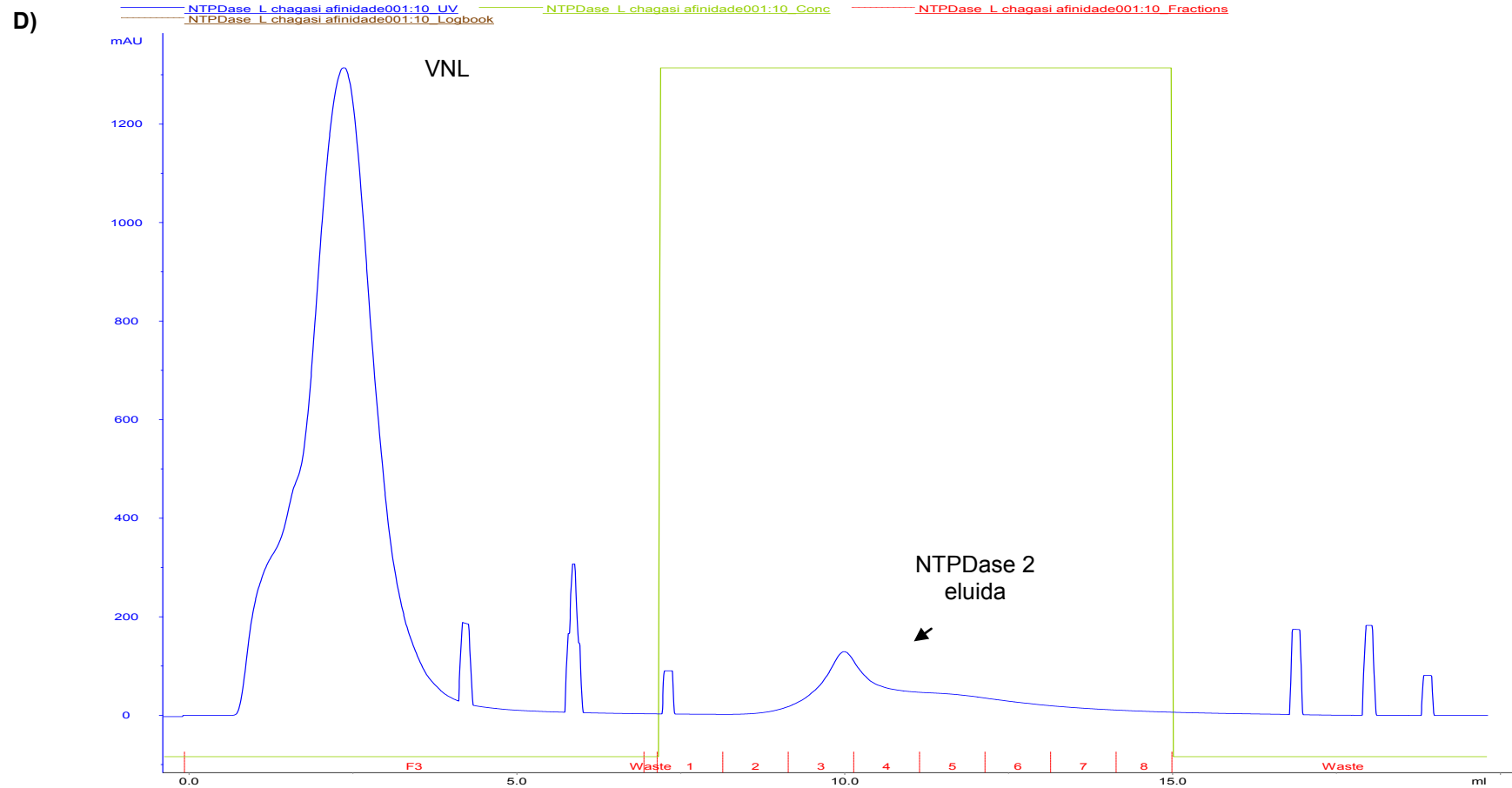


Figura 4- Perfis cromatográficos da purificação da rNTPDase2 de *L. infantum* a partir de CIs solubilizados e purificados do extrato de *E. coli* BL21 (DE3). (A) Perfil cromatográfico utilizando tampões contendo 500mM de NaCl. (B) Perfil cromatográfico utilizando tampões contendo 100mM de NaCl. (C) Perfil cromatográfico utilizando tampões contendo 100mM de NaCl e 2mM de DTT. (D) Perfil cromatográfico utilizando tampões contendo 100mM de NaCl e 5mM de DTT. VNL= volume não ligado; --- Absorbância a 280nm; --- concentração de imidazol no processo de purificação; --- frações coletadas.

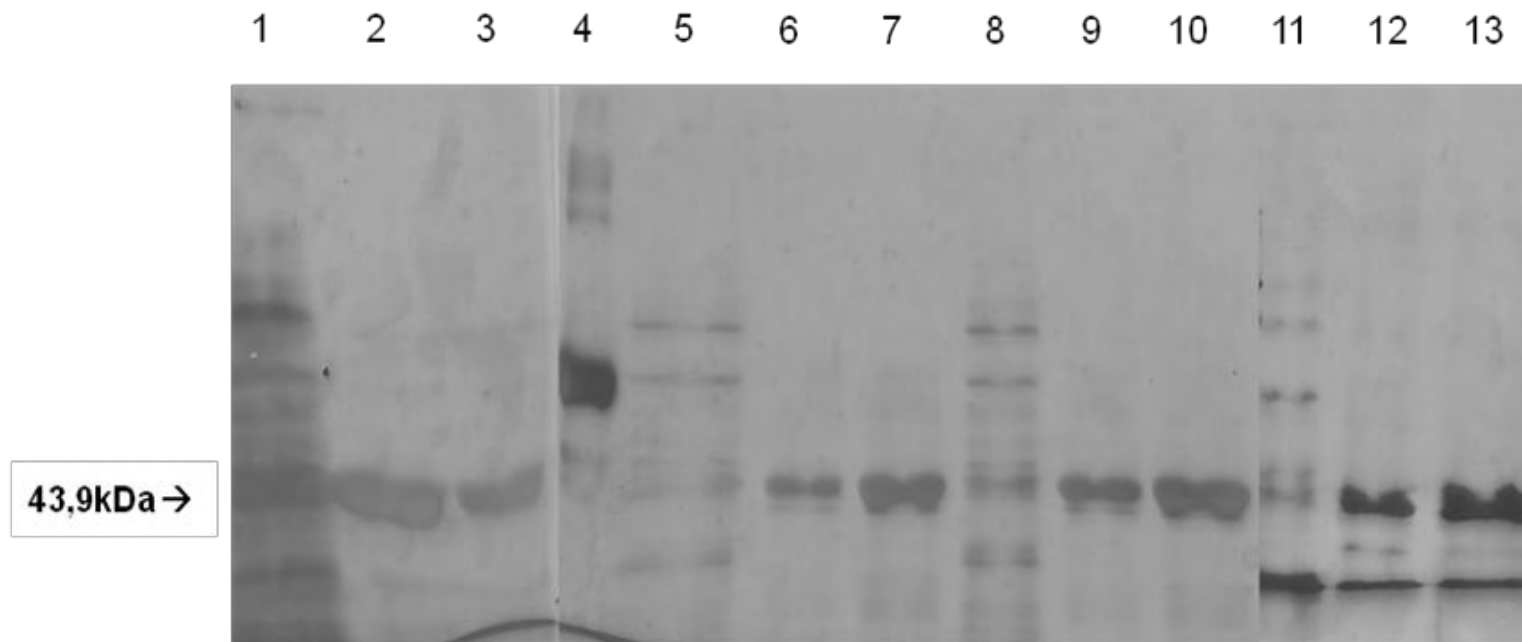


Figura 5- Análise da purificação da rNTPDase2 em SDS-PAGE 10% corado com prata. (1) volume não ligado-500mM NaCl ; (2) fração 2-500mM NaCl; (3) fração 3-500mM NaCl; (4) BSA como marcador molecular 67 kDa; (5) volume não ligado-100mM NaCl; (6) eluição de 100mM NaCl; (7) eluição de 100mM NaCl. (8) volume não ligado-100mM NaCl e DTT 2mM; (9) eluição de 100mM NaCl e DTT 2mM; (10) eluição de 100mM NaCl e DTT 2mM; (11) volume não ligado-100mM NaCl e DTT 5mM; (12) eluição de 100mM NaCl e DTT 5mM; (13) eluição de 100mM NaCl e DTT 5mM;

Tabela 2- Cálculo do rendimento para cada metodologia de purificação

TRATAMENTO	APLICADO	FATOR	FRAÇÃO (mL)	PROTEÍNA µg total	RENDIMENTO µg/mL
500mM de NaCl	2mL	1	3	193,3	64,4
100mM de NaCl	500µL	4	2	106,29	212,5
100mM de NaCl e 2mM de DTT	500µL	4	2	104,31	208.6

A grande maioria das proteínas que não se ligam na coluna (figura 4A, 4B, 4C e 4D), são proteínas produzidas constitutivamente pela *E. coli* BL21 (DE3), visto que a rNTPDase não é observada no volume não ligado (figura 5, canaletas 5, 8 e 11). A presença de 500mM de NaCl diminui a ligação da rNTPDase2 (figura 5, canaleta 1). A adição de DTT não aumentou a disponibilidade da proteína purificada, como pode ser visto no perfil eletroforético na figura 5 (canaletas 9-10 e 12-13). Como pode ser visto na tabela 2, o melhor procedimento para se purificar a rNTPDase, foi aquele onde se utilizaram tampões contendo 8M de uréia e 100 mM de NaCl, sendo estes escolhidos para os procedimentos de purificação da rNTPDase2.

Determinado o protocolo, 2 mL de amostra foram analisados por cromatografia por afinidade agora em coluna HIS PREP de 20 mL. O resultado do cromatograma pode ser visto na figura 6. Os picos foram coletados em frações de 1 mL sendo posteriormente analisados por eletroforese em gel de SDS-PAGE 10% conforme a figura 7.

Como pode ser visto na canaleta 2 (figura 7) a proteína rNTPDase2 ligou-se quase que completamente à coluna.

Todas as amostras eluídas foram, então, unidas e dialisadas. Com objetivo de visualizar o grau de pureza, após a diálise a rNTPDase foi analisada por eletroforese capilar conforme a figura 8.

Conforme visualizado no perfil eletroforético, a proteína rNTPDase2 dialisada apresentou 91,6% de pureza, estando nesse estágio pronta para a utilização nos testes de imunodiagnóstico da LVC. O percentual de contaminação foi baixo, o que, inclusive, pode ser um produto de degradação da própria proteína recombinante. A proteína rNTPDase foi então aliqüotada em frações de 1 mL e armazenada a -20°C até o uso.

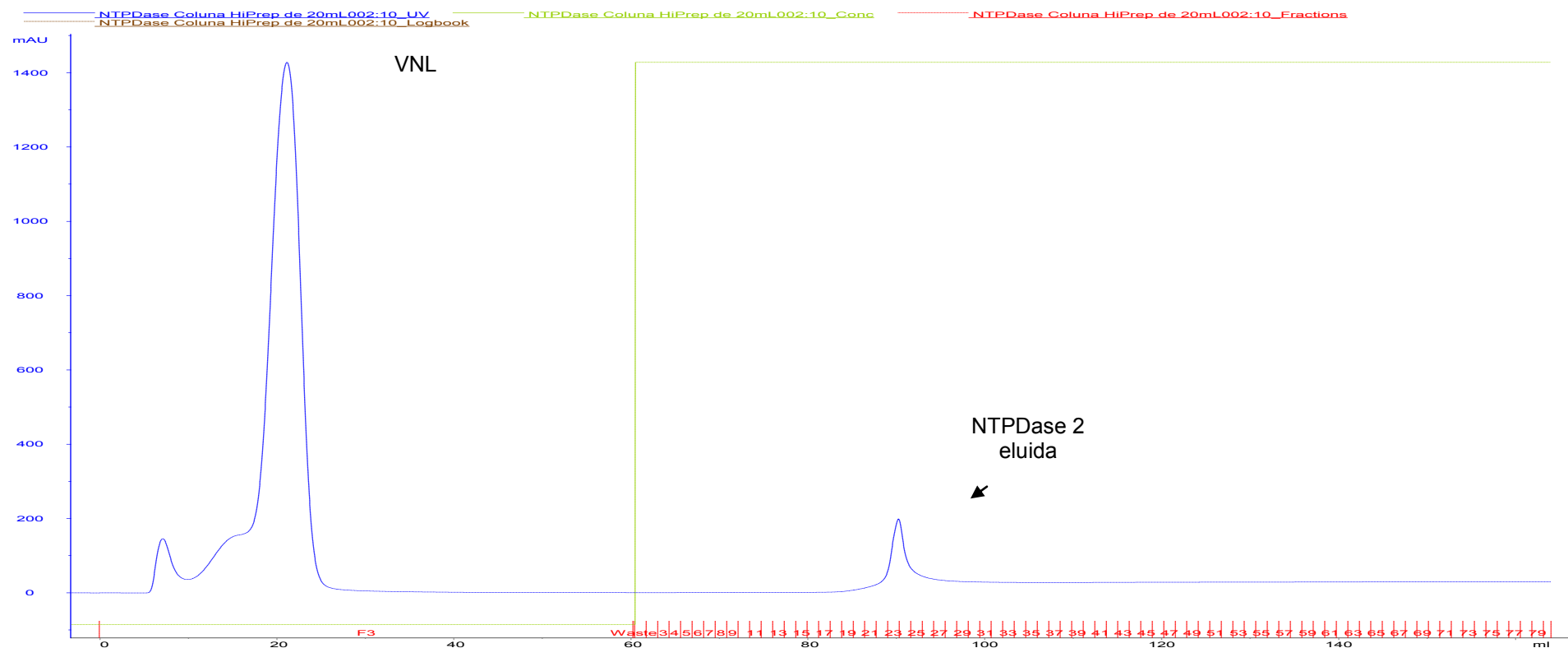


Figura 6- Perfil cromatográfico da purificação da rNTPDase 2 *L. infantum* a partir de CIs solubilizados e purificados do extrato de *E. coli* BL21 (DE3). VNL= volume não ligado; --- Absorbância a 280nm; --- concentração de imidazol no processo de purificação; --- frações coletadas.

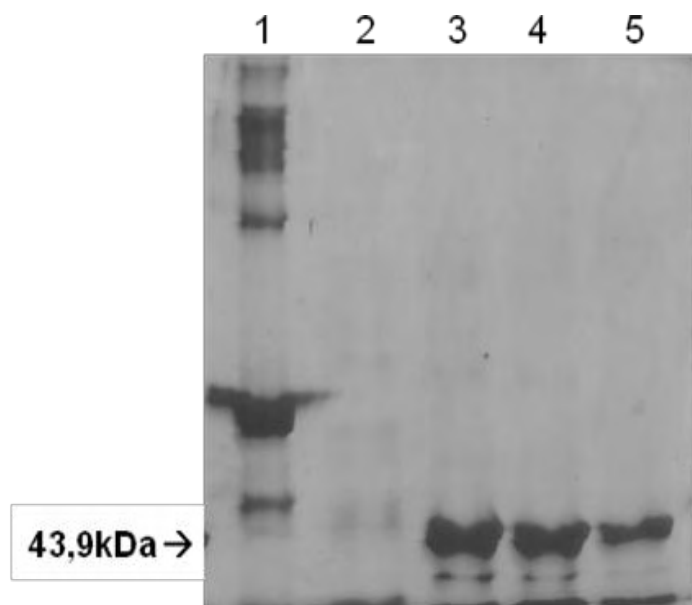


Figura 7- Análise da purificação da rNTPDase2 em SDS-PAGE 10% corado com prata. (1) BSA como marcador molecular 67 kDa; (2) volume não ligado; (3) fração 23; (4) fração 24; (5) fração 25.

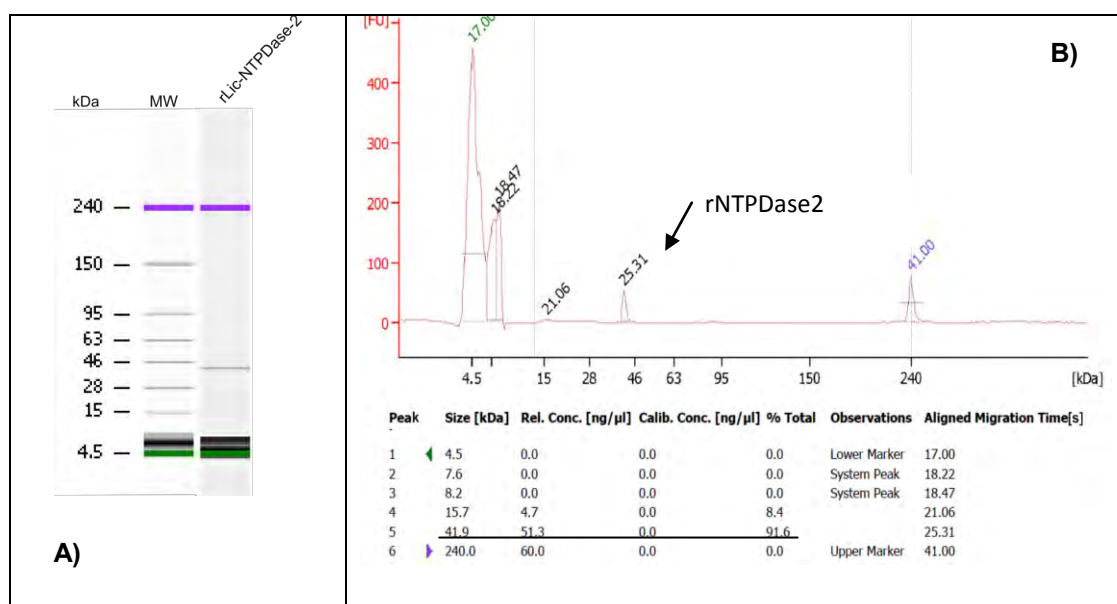


Figura 8- Análise do grau de pureza da rNTPDase2 por eletroforese capilar. O padrão do grau de pureza da rNTPDase2 foi analisado usando amostra na concentração de 51,3 ng/μL em LabChip® Agilent Protein 230 Kit (Agilent 2100 Bioanalyzer). A) Demonstra a corrida eletroforética da rNTPDase2 com uma leve contaminação. B) Demonstra a resultado da quantificação e a banda da rNTPDases representa 91.6 % do total da amostra de proteína.

3.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE USO DA rNTPDase2 NO IMUNODIAGNÓSTICO DE LVC POR ELISA

3.2.1 TESTE DA QUANTIDADE DA NTPDase2 RECOMBINANTE

Para avaliar o potencial de uso da rNTPDase2 no diagnóstico de LVC, a proteína purificada foi usada para sensibilizar as placas de ELISA. O primeiro passo nessa abordagem foi avaliar a concentração do antígeno recombinante para ser usado nos ensaios de ELISA. Para tanto foram testadas três concentrações do antígeno 0,25, 0,5 e 1 µg usando 3 amostras sorológicas positivas e 3 negativas, todas na diluição de 1:40. O resultado do ELISA indireto pode ser visualizado na figura 9.

Conforme pode ser visualizado (figura 9), o resultado demonstra uma distinção clara das amostras de cães contaminados dos não contaminados por *Leishmania*, utilizando as três concentrações da rNTPDase2. Assim, o dado obtido aponta que a rNTPDase2 parece ser promissora para ser usada como antígeno para detecção da leishmaniose canina. Visto que em todas as concentrações utilizadas houve distinção de positivo e negativo, determinou-se a utilização do antígeno na concentração de 0,5 µg para evitar os resultados falsos negativos em amostras positivas com baixa carga parasitária.

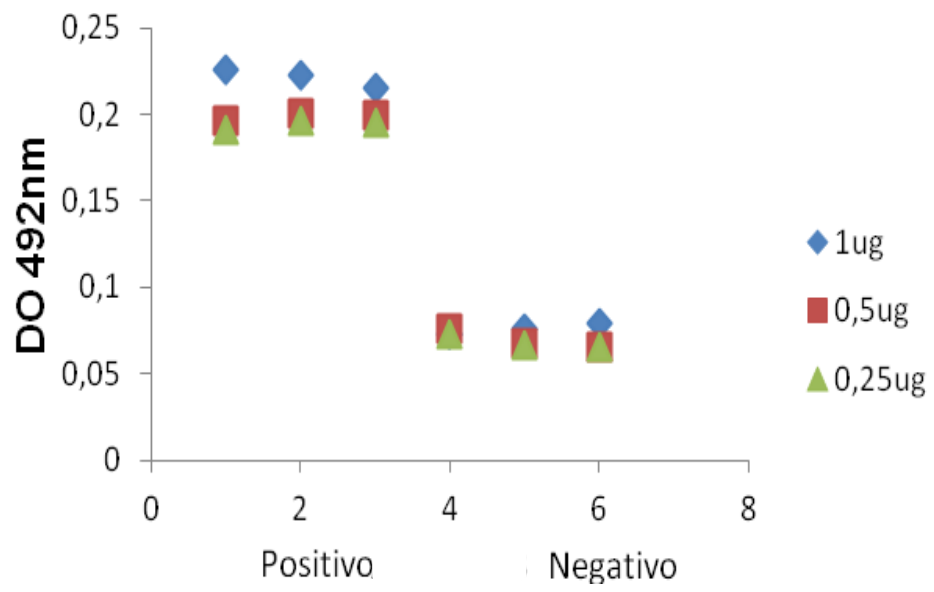


Figura 9 – ELISA indireto da rNTPDase 2 em diferentes concentrações e com soros na diluição de 1:40.

3.2.2 ELISA EM SOROTECA USANDO rNTPDase2: AMOSTRAS DE CARATINGA – REGIÃO ENDÊMICA DE LV HUMANA

O potencial da rNTPDase2 para ser usada como antígeno no diagnóstico da LVC foi testado utilizando 0,5 µg da proteína recombinante no banco de soros contendo 48 soros positivos de cães naturalmente infectados (16 assintomáticos, 16 oligossintomáticos e 16 sintomáticos, classificados de acordo com Mancianti *et al*, 1988), 26 negativos e 30 soros de cães infectados por *Trypanosoma cruzi*. O valor de “cut-off” foi determinado pela curva ROC (GraphPad Prism software, version 5 for Windows). O resultado demonstrou que os 48 soros verdadeiramente positivo reagiram 100% sobre a linha do cut-off (figura 10A e tabela 3). Nesse ensaio, as amostras de soro foram testadas em duplicata e a proteína usada na adsorção foi produzida manualmente por *batch*. Em seguida, foi feito um ensaio de validação (teste de reprodutibilidade) realizado usando 30% das amostras positivas LVC e 50% das amostras negativas em duplicata, usando a proteína recombinante purificada pelo FPLC. Como verificado nas figuras 10A e B, os resultados com o antígeno recombinante apresentou uma sensibilidade de 100% (intervalo de confiança - IC 95%: 92.60% a 100.0%) e especificidade de 100% (IC 95%: 86.77% a 100.0%) e o índice de concordância foi excelente ($k= 1$) como visualizado na tabela 3.

A utilização da rNTPDase2 demonstra uma nítida distinção entre os soros dos animais infectados dos não infectados (figura 10A). O resultado de reprodutibilidade do experimento pode ser visualizado na figura 10B. Considerando que o foco de muitas pesquisas (Rosário *et al.*, 2005; Mettler *et al.*, 2005; Boarino *et al.*, 2005) tem sido aumentar a sensibilidade e especificidade dos testes por ELISA, esses achados demonstram ser de grande importância para aplicação no campo epidemiológico. Para analisar se existia alguma relação entre os estágios da LVC e o ensaio de ELISA usando a rNTPDase2, as 48 amostras positivas para LVC foram separadas pelas formas clínicas segundo Mancianti *et al.*, (1988). Na figura 11 é possível observar que a média dos valores de absorbância foram 0.391, 0.375 e 0.415 para os grupos de amostras assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos respectivamente. Os resultados não demonstraram nenhuma diferença significativa entre os resultados

positivos pelo teste de comparação de média de Tukey ($P < 0,001$). Nesse contexto o seu uso no diagnóstico da LVC pode ajudar na prevenção da permanência dos cães que permanecem assintomáticos nas áreas endêmicas e que servem como reservatório do parasito, o que é fundamental para o controle epidemiológico desta doença e esse é um dos principais problemas enfrentados quando se utiliza rK39 (Porrozzi et al. 2007).

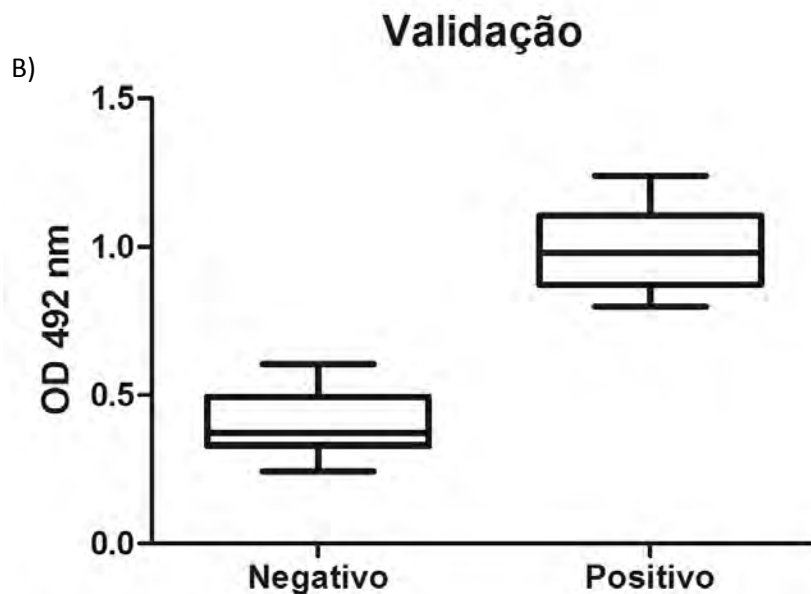
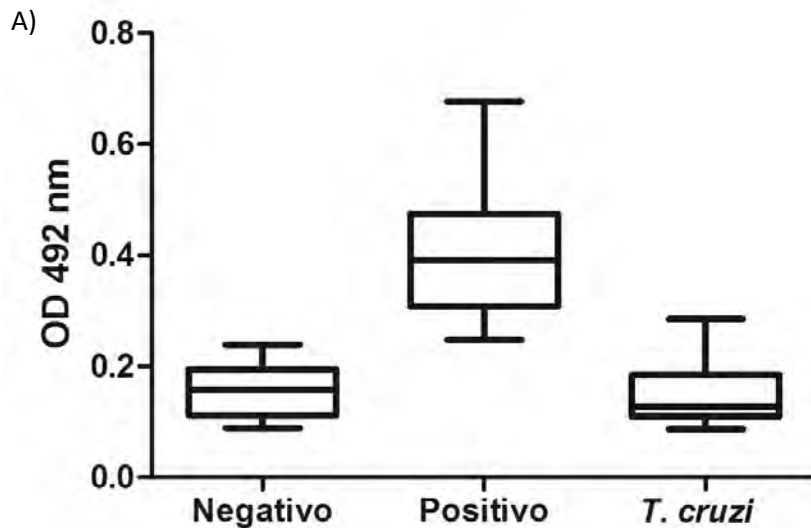


Figure 10. Ensaio de ELISA em soroteca canina usando rNTPDase2 como antígeno. A) Ensaio de ELISA usando proteína recombinante purificada por *batch* e banco de soros contendo amostras negativas (n=26), amostras positivas para CVL de área endêmica (n=48) e amostras de cães negativas para CVL mas infectados de *T. cruzi* de área não endêmica (n=48). B) Ensaio de reprodutibilidade (validação) realizado usando proteína recombinante purificada por FPLC e 30% das amostras positivas e 50% de amostras negativas escolhidas aleatoriamente e realizados em triplicata. Todos os soros foram utilizados na diluição de 1:40 e ensaiados usando 0.5 µg da rNTPDase2 purificada.

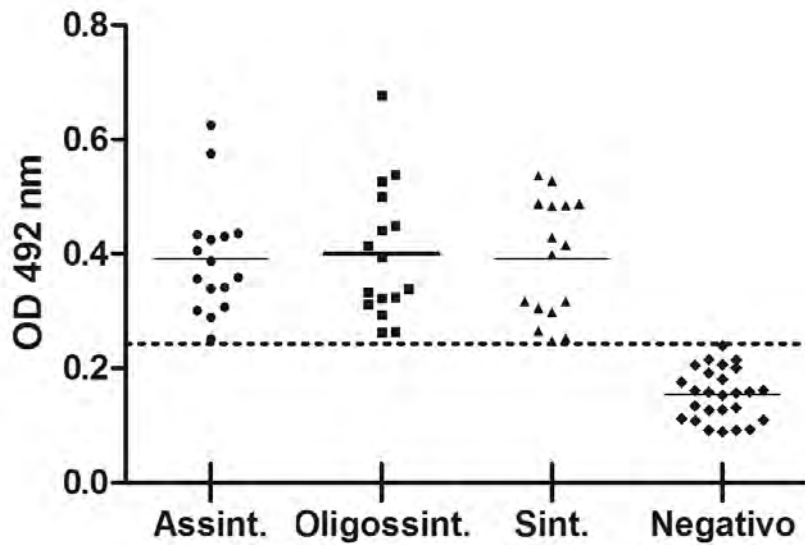


Figura11 . Análise e correlação do ensaio de ELISA usando a rNTPDases2 e a progressão da LVC. Os resultados obtidos foram separados pelo estágio LVC em assintomático (sem sintomas), oligossintomáticos e sintomático de acordo com Mancianti et. al., (1988). As amostras de soro foram diluídas 1:40 e analisadas em duplicata, utilizando 0,5 µg da rNTPDase2 purificada. A linha tracejada representa o “cut-off” determinada pela curva ROC. Não foram observadas diferenças significantes entre os estágios da LVC. As análises foram feitas utilizando o software GraphPad Prism (Versão 5 para Windows). Assint.= assintomático; Oligossint.= oligossintomático e Sint.= sintomático

Table 3. Análise de sensibilidade e especificidade do ensaio de diagnóstico da LVC com o antígeno rNTPDase2 de *L (L) infantum* por ELISA

Testes	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP* (%)	VPN*	Kappa
Soros UFOP	100	100	100	100	1
Validação	100	100	100	100	1

*VPP (Valor Preditivo Positivo) e VPN (Valor Preditivo Negativo).

3.2.3 ELISA EM SOROTECA USANDO rNTPDase2: AMOSTRAS DE GOVERNADOR VALADARES – REGIÃO ENDÊMICA PARA LTA

O potencial da rNTPDase2 para ser usado como antígeno no diagnóstico da LVC foi testada utilizando 0,5µg da proteína recombinante no banco de soros contendo 48 soros positivos de cães naturalmente infectados e 23 negativos de região não endêmica para LVC. O banco de soro foi construído a partir de amostras de soro de cães eutanasiados pelo serviço de vigilância epidemiológica de Governador Valadares, uma região conhecida por ser endêmica para Leishmaniose Tegumentar Americana-LTA (Barata et. al., 2011). O valor de “cut-off” foi determinado pela curva ROC (GraphPad Prism software, version 5 for Windows).

Conforme visualizado na figura 12, o antígeno é capaz de diferenciar amostras positivas de negativas. No entanto, algumas amostras positivas estão abaixo da linha de “cut-off”. O resultado demonstrou uma sensibilidade de 91,67% (IC 95%: 80,02% a 97,68%) e especificidade 100% (IC 95%: 85,18% a 100,0%), conforme visualizado na tabela 4.

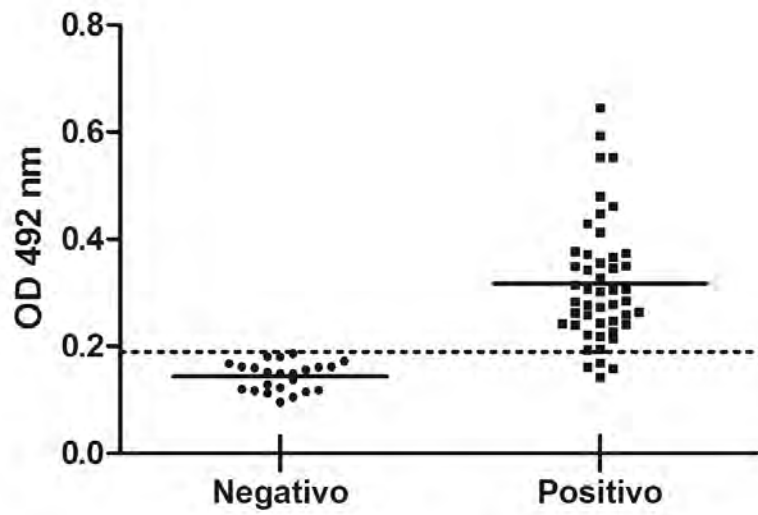


Figure 12. Ensaio ELISA realizado usando proteína rNPDase2 purificada por FPLC e soros positivos em duplicata. Todos soros foram utilizados na diluição de 1:40 e ensaiados usando 0.5 μ g da rNTPDase2 purificada.

A fim de aumentar a sensibilidade, foi ensaiado um experimento variando a concentração do antígeno recombinante para 1 a 2 µg. Os resultados podem ser visualizados na tabela 3. Com o antígeno utilizado na concentração de 1 µg é possível observar a diminuição das amostras falso positivas, no entanto, utilizando 2 µg os resultados não apresentaram nenhuma mudança (Figura 13 e tabela 4).

O aumento da concentração do antígeno para 1 µg resultou em aumento da sensibilidade para 95,35% (IC 95%: 84,19% a 99,43%) e a especificidade permaneceu inalterada 100% (IC 95%: 85,18% a 100,0%). No entanto, o aumento para 2 µg do antígeno não apresentou melhora em nenhum dos dois parâmetros 91,67% (IC 95%: 80,02% a 97,68%) e especificidade 100% (IC 95%: 85,18% a 100,0%) em relação a quando se utilizou 0,5 µg do antígeno. A diminuição desses resultados de sensibilidade utilizando rNTPDase2 para as amostras sorológicas de Caratinga pode ser explicada pelo tipo de agente infectante. A região de Governador Valadares é predominantemente de caso autóctones para LTA causada pela *L. braziliensis*. A comparação das sequências das NTPDases entre *L. infantum* e *L. braziliensis* apresentam 79,29% de identidade (ANEXO2). Essa diferença molecular pode explicar essa diminuição na sensibilidade, no entanto, esse fato precisa ser melhor pesquisado e avaliado.

Embora a sensibilidade do teste (tabela 4) tenha diminuído os resultados ainda mantém uma excelente concordância ($k > 0,8$). O que aponta a proteína recombinante NTPDase2 como um novo e promissor antígeno recombinante para ser utilizado no diagnóstico da LVC.

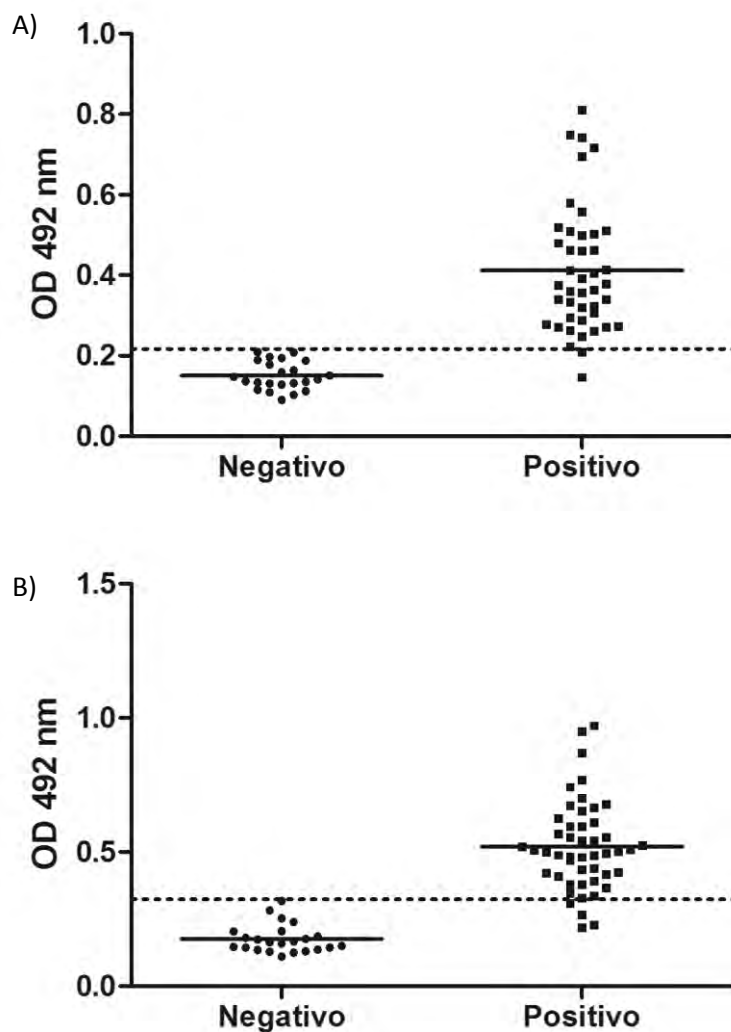


Figura 13. Ensaio ELISA realizado usando proteína recombinante purificada por FPLC e soros positivos em duplicata, na diluição de 1:40. A) 1 µg da rNTPDase2 purificada. B) 2 µg da rNTPDase2 purificada.

Tabela 4. Diagnóstico realizado com o antígeno rNTPDase2 em diferentes concentrações em soroteca de cães positivos para leishmaniose de região endêmica para LTA.

Testes e []Ag	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP* (%)	VPN* (%)	Kappa
Soros GV(0,5ug)	91,67	100	100	100	0,87
Soros GV(1,0ug)	95,35	100	100	100	0,93
Soros GV(2,0ug)	91,67	100	100	100	0,87

GV= Governador Valadares; *VPP= (Valor Preditivo Positivo) e VPN= (Valor Preditivo Negativo).

3.3 ANÁLISE PARASITOLÓGICA DAS AMOSTRAS DE GOVERNADOR VALADARES

Para melhor controle do banco de amostras da região de Governador Valadare, foi realizado o exame parasitológico nas amostras de tecidos dos 48 cães eutanasiados. Um dos métodos parasitológicos utilizados foi o *imprint*. O *imprint* é uma modalidade que se baseia na remoção de células superficiais de uma lesão ou da superfície de corte de um órgão, por intermédio do contato da superfície em questão com uma lâmina de microscopia. É uma técnica muito utilizada para confirmação do diagnóstico de suspeitas levantadas com resposta rápida. Segundo Famadas (1985), o estudo citológico pelo *imprint* é de grande importância para complementar o histopatológico. Assim, após as secções dos tecidos do fígado e baço, o excesso de sangue era contido e em seguida, era feito o *imprint* nas lâminas. Para cada tecido foram feitas duas lâminas. As lâminas foram coradas posteriormente pelo método do ácido panótico rápido. As fotos das lâminas podem ser visualizadas no anexo 1. Nesse trabalho, foi observada ocorrência de 79,16% (38/48) de positividade para presença de amastigotas em pelo menos um dos dois tecidos analisados (figura 14). Os dados de *imprint* foram obtidos da leitura das lâminas de fígado e baço, que são as mais importantes do ponto vista da infecção.

Ainda como métodos diretos de diagnóstico da leishmaniose, são empregados a histopatologia em cortes, corados com Hematoxilina e Eosina (H&E), o método imunohistoquímico e coloração por Giemsa (Tafuri et al., 2003). Assim, todas as quarenta e oito amostras de tecidos foram fixadas em formaldeído, incluídos em Paraplast Plus[®] e coradas com hematoxilina e eosina (H & E) para o diagnóstico histopatológico, para coloração de Giemsa e análise imunohistoquímica. No entanto, a amostra 2 para a coloração com Giemsa e a amostra 48 para H & E precisam ser refeitas pois não ficaram adequadas para análise.

Os resultados para coloração de Giemsa são representados na figura 15. Esses dados estão em concordância com os dados sorológicos de Biomanguinhos, onde nas 47 amostras foi possível visualizar amastigotas infectando macrófagos (anexo1).

Nas 47 amostras coradas por H&E foi possível visualizar necrose, formação de colágeno, edema e perda de funcionalidade tecidual (anexo1). Esses dados estão em concordância com os dados sorológicos da Biomanguinhos conforme visualizados na figura 16.

		BIOMANGUINHOS		
		+		
IMPRINT	+	38	38 (79,16%)	
	-	10		

Figura 14. Comparação entre os resultados de sorologia e *imprint* em 48 amostras de cães naturalmente infectado com *Leishmania* de Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil.

		BIOMANGUINHOS		
		+		
GIEMSA	+	47	47 (100%)	
	-	0		

Figura 15. Comparação entre os resultados de sorologia e coloração por Giemsa em 47 amostras de cães naturalmente infectado com *Leishmania* de Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil.

		BIOMANGUINHOS		
		+		
H&E	+	47	47 (100%)	
	-	0		

Figura 16. Comparação entre os resultados de sorologia e coloração por H & E em 47 amostras de cães naturalmente infectado com *Leishmania* de Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil.

Nos resultados de imunomarcção (IHQ), das 48 amostras foi possível visualizar a marcação do anticorpo policlonal da anti-rNTPDase2 em apenas 43 amostras. Um fato interessante foi visualizar em uma mesma lâmina macrófagos infectados por amastigotas marcados e não marcados (Anexo 1, 45). Segundo Tafuri et al., (2004) a técnica de imunohistoquímica aumenta a detecção das formas amastigotas de *Leishmania* em muitos órgãos. A comparação com dados sorológicos de Biomanguinhos (figura 17) demonstram uma concordância de 89,5%, onde apenas 43 amostras apresentaram-se marcadas.

A tabela 5 sumariza os resultados parasitológicos e sorológico por ELISA, bem como a classificação dos cães da amostragem segundo a classificação de Mancianti *et al*, (1988).

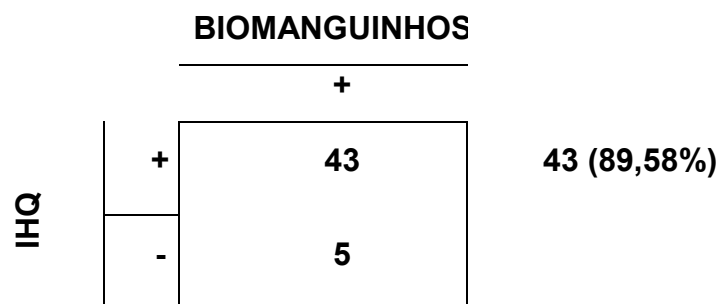


Figura 17. Comparação entre os resultados de sorologia e coloração por imunohistoquímica em 48 amostras de cães naturalmente infectados com *Leishmania* de Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil.

Tabela 5 – Características dos cães sorológicos positivos para Leishmaniose de área endêmica para LTA e resultados sumarizados da análise parasitológica e ELISA com rNTPDase2 em diferentes concentrações

ID	Sexo: (F) e (M)	Classificação: (S), (O) e (A)	PARASITOLÓGICO				ELISA		
			Imprint	Giemsa	H&E	IHQ	0,5 µg	1 µg	2 µg
1	F	O	+	+	+	+	+	+	+
2	F	O	+	“+”	+	+	+	+	+
3	F	S	+	+	+	+	+	+	+
4	F	S	+	+	+	+	+	+	+
5	F	S	+	+	+	+	+	+	+
6	M	S	+	+	+	+	+	+	+
7	F	O	-	+	+	+	+	+	+
8	F	O	+	+	+	+	+	-	-
9	F	S	+	+	+	+	+	+	+

ID	Sexo: (F) e (M)	Classificação: (S), (O) e (A)	PARASITOLÓGICO				ELISA		
			Imprint	Giemsa	H&E	IHQ	0,5 µg	1 µg	2 µg
10	F	O	-	+	+	+	-	+	+
11	F	O	-	+	+	+	+	+	-
12	F	S	+	+	+	+	+	+	+
13	F	O	+	+	+	+	+	+	+
14	F	A	+	+	+	+	+	+	+
15	F	S	+	+	+	+	+	+	+
16	F	S	+	+	+	+	+	+	+
17	F	O	+	+	+	+	-	+	-
18	F	S	+	+	+	+	+	+	+
19	F	S	-	+	+	+	+	+	+
20	-	S	+	+	+	+	+	+	+
21	F	A	+	+	+	+	+	+	+
22	M	A	+	+	+	+	+	+	+
23	M	O	-	+	+	+	+	+	+
24	M	O	+	+	+	+	+	+	+
25	M	S	+	+	+	+	+	+	+
26	M	O	+	+	+	+	+	+	+
27	M	O	+	+	+	+	+	+	+
28	M	A	-	+	+	+	+	+	+
29	M	O	-	+	+	+	+	+	+
30	M	A	+	+	+	-	+	+	+

ID	Sexo: (F) e (M)	Classificação: (S), (O) e (A)	PARASITOLÓGICO				ELISA		
			Imprint	Giemsa	H&E	IHQ	0,5 µg	1 µg	2 µg
31	M	O	+	+	+	+	+	+	+
32	M	O	-	+	+	+	-	+	+
33	M	O	+	+	+	+	+	+	+
34	M	O	+	+	+	-	+	+	+
35	M	S	+	+	+	+	+	+	+
36	F	O	-	+	+	+	+	+	+
37	M	S	+	+	+	+	+	+	+
38	M	S	+	+	+	+	+	+	+
39	M	S	+	+	+	+	+	+	+
40	M	S	+	+	+	-	+	+	+
41	M	S	+	+	+	+	+	+	+
42	M	S	+	+	+	+	+	+	+
43	M	S	-	+	+	-	-	-	-
44	M	S	+	+	+	+	+	+	+
45	M	S	+	+	+	+	+	+	+
46	M	O	+	+	+	+	+	+	+
47	M	S	+	+	+	+	+	+	+
48	F	A	+	+	**	+	+	+	+

F= fêmea; M= macho; A= assintomático; O= oligossintomático; S= sintomático; += presença de amastigota de *Leishmania*; - = ausência de amastigota de *Leishmania*; "**" = sem resultado.

Apesar de muitos autores afirmarem que os resultados do kit da Biomanguinhos podem não ser conclusivos, nessa amostragem ele se mostrou eficaz (Tabela 5). A baixa na sensibilidade do teste nas amostras de Governador Valadares, poderia estar relacionada com a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção, que não a *Leishmania infantum*. Como pode ser observada, a lâmina 43 tem a presença do parasito dado pela coloração giemsa, no entanto não há marcação na imunohistoquímica e os resultados sorológicos são negativos para todas concentrações do antígeno utilizado. É observado também que em uma mesma lâmina amastigotas presentes em macrófagos estão marcadas enquanto outras em outros macrófagos não se encontram marcadas (Anexo 1, lâminas 41 e 45 de imunohistoquímica). Diniz (2010) pontua que as ocorrências das infecções por *Leishmania* em Governador Valadares são causadas pela espécie *Leishmania braziliensis*. Visto que a menor identidade entre as proteínas codificadas pelos genes homólogos das NTPDases dos gêneros de *Leishmania* é apresentada na espécie de *L. braziliensis* isso poderia explicar a não marcação nas lâminas de imunohistoquímica (Anexo 1) bem como a diminuição da sensibilidade no exame sorológico.

3.4 ENSAIO IMUNOCROMATOGRÁFICO

O teste em questão (imunocromatográfico) é um teste qualitativo de fácil execução e resultado rápido, que tem como objetivo detectar anticorpos para leishmaniose em soros de cães. No teste preliminar, em cada ensaio, 10, 40 e 80 µL do ouro coloidal conjugado com proteína A foi diluído em tampão contendo 10 µL de soro de cão positivo para LVC da região de Governador Valadares. Conforme se observa na figura 18, o melhor ensaio foi aquele onde se usou 40 µL do ouro conjugado com a proteína A. Com 2 µL de IgG de cão utilizado (controle positivo), não foi possível visualizar banda em nenhum dos ensaios.

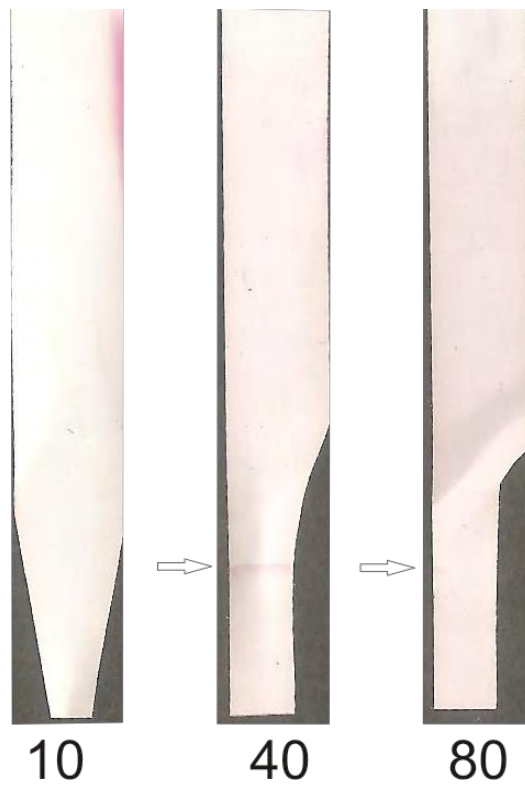


Figura 18. Teste imunocromatográfico. Ensaio preliminar utilizando várias quantidades do ouro coloidal conjugado à proteína A (10, 40 e 80 μL). As setas indicam a reatividade do soro de cão leishmaniótico com Ag absorvido na membrana de nitrocelulose.

Segundo Safenkova (2012), vários fatores podem influenciar nos ensaios imunocromotográficos, dentre eles o tamanho da nano partícula de ouro, a concentração do anticorpo, o pH da conjugação, as características da membrana e etc. Assim, ainda é preciso testar esses parâmetros para melhorar a detecção da linha teste bem como solucionar o não aparecimento da linha controle.

4. CONCLUSÃO

Nesse trabalho pode-se concluir que o processo melhor para se obter a proteína rNTPDase2 com maior rendimento é quando se usa os tampões contendo ureia na concentração de 8M. O processo de purificação da proteína recombinante em sistema de automatizado – FPLC, possibilitou alcançar uma pureza de aproximadamente 92%.

O uso da proteína recombinante NTPDase2 de *L. infantum* no diagnóstico imunológico de LVC mostrou o seu grande potencial no reconhecimento dos cães leishmanióticos o que poderá abrir novas fronteiras, como utilizá-lo em abordagens de diagnóstico da leishmaniose visceral humana e também em inquéritos epidemiológicos ou desenvolvimento de uma nova vacina recombinante, assim contribuindo para o controle desta doença negligenciada.

Os ensaios histológicos das amostras de Governador Valadares frente a utilização da proteína recombinante pela imunohistoquímica levou a hipótese da infecção por outra espécie no caso *L. braziliensis.*, no entanto essa hipótese precisa ser verificada.

Apesar da reatividade da proteína recombinante NTPDase2 ter tido ótimo resultados no ensaios de ELISA indireto, para os ensaios imunocromatográficos é necessário verificar o não aparecimento da linha controle dado pela inserção do IgG total de cão e validar essa metodologia nos bancos de amostras sorológicas utilizados nos experimentos de ELISA.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. A. O., JESUS, E. E. V., SOUSA-ATTA, M. L. B., ALVES, L. C., BERNE, M. E. A., ATTA, A. M. (2005). Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania L. chagasi*. **Vet. Parasitol.** 127, 227–232

ALVES, W.A., BEVILACQUA, P. D. (2004). Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cad Saude Publica**, 20: 259–265.

BANETH, G., A. F. KOUTINAS, L. SOLANO-GALLEGO, P. BOURDEAU, AND L. FERRER. (2006). Canine leishmaniosis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends Parasitol.** 24:324–330.

BARBOSA-DE-DEUS, R., DOS MARES-GUIA, M.L., NUNES, A. Z., COSTA, K.M., JUNQUEIRA, R.G., MAYRINK, W., GENARO, O., TAVARES, C. A. 2002. *Leishmania major*-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol** 9: 1361-1366.

BARATA, R. A., PAZ, G. F., BASTOS, CARDOSO, M., ANDRADE, R. C. O., BARROS, D. C. M., SILVA, F. O. L., MICHALSKY, É. M., PINHEIRO, A. C., DIAS, E. S. (2011). Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in Governador Valadares, a transmission area for American tegumentary leishmaniasis in State of Minas Gerais, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 44(2):136-139.

BAUZER, L. G., SOUZA, N. A., MAINGON R. D., PEIXOTO, A. A. (2007). *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A mini-review. **Mem Insti Oswaldo Cruz.**

BERMUDES, D., PECK, K. R., AFIFI, M., BECKERS, C. J. M., JOINER, K. A. (1994). Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. **J Biol Chem**, 269: 29252– 29260.

BOARINO, A., SCALONE, A., GRADONI, L., FERROGLIO, E., VITALE, F. (2005). Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin Diag Lab Immun** 12: 647–653.

BOELAERT M., S. EL-SAFI, A. HAILU, M. MUKHTAR, S. RIJAL, S. SUNDAR, M. WASUNNA, A. ASEFFA, J. BUI, J. MENTEN, P. DESJEUX, R.W. PEELING. 2008. Diagnostic tests for kala-azar: a multi-centre study of the freeze-dried DAT, rK39 strip test and KAtex in East Africa and the Indian subcontinent. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 102:32–40.

BORGES-PEREIRA, L. (2009). CLONAGEM, EXPRESSÃO HETERÓLOGA, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAIS DE DUAS APIRASES DE *Leishmania*. 47f. **Monografia (Graduação em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa.**

BURNS JR., J.M., SHREFFLER, W.G., BENSON, D.R., GHALIB, H.W., BADARÓ, R., REED, S.G., 1993. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 90, 775–779.

CARVALHO, F. A., CHAREST, H., TAVARES, C. A. P., MATLASHEWSKI, G., VALENTE, E. P., RABELLO, A. 2002. Diagnosis of visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. **Diagn Microbiol Infect Dis** 2002; 43: 289-95

CHAPPUIS F., SUNDAR S., HAILU A., GHALIB H., RIJAL S., PEELING R. W., ALVAR J., BOELAERT M. (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Microbiol.** Nov;5(11):873-82.

CHAPPUIS, F., MUELLER, Y., NGUIMFACK, A., RWAKIMARI, J.B., COUFFIGNAL, S., BOELAERT, M., CAVAILLER, P., LOUTAN, L., PIOLA, P. (2005). Diagnostic accuracy of two rK39 antigen-based dipsticks and the formal gel test for rapid diagnosis of visceral leishmaniasis in northeastern Uganda. **Journal of Clinical Microbiology**, **43**: 5973-5977.

DINIZ, D. S. (2010). Caracterização epidemiológica em relação ao tratamento dos pacientes com leishmaniose tegumentar americana atendidos no creden-pes em governador valadares, MG. **Dissertação de Mestrado - Universidade Vale do Rio Doce.**

FAMADAS, L. C. (1985). Subsídios para o estudo citológico do linfonodo pelo "imprint" / Subsidies for the cytological study of the lymph node using the imprint. **Bol Soc Bras Hematol Hemoter.** 7(134):137-45.

FARIA A. R., COSTA M. M., GIUSTA M. S., GRIMALDI G. JR., PENIDO M. L., GAZZINELLI R. T., ANDRADE H. M. (2011). High-throughput analysis of synthetic peptides for the immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis.** Sep;5 (9):e1310.

FIETTO J. L. R., DEMARCO R., NASCIMENTO I. P., CASTRO I. M., CARVALHO TMU, ET AL. (2004) Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. **Biochem Biophys Res Commun** 316(2): 454-460.

FRANCISCO-DE-SOUZA, R. (2009). EXPRESSÃO HETERÓLOGA, PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO USO DA E-NTPDASE (GDPASE) DE *Leishmania major* COMO ANTÍGENO RECOMBINANTE NO DIAGNÓSTICO DA

LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA. 74f. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa.**

GAO X. D., KAIGORODOV V., JIGAMI Y. N. D. (1999). A homologue of GDA1, encodes membrane-bound apyrase required for golgi N- and O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, 274: 21450–21456.

GRADONI, L. (2002). The diagnosis of canine leishmaniasis. In: Canine leishmaniasis: moving toward a solution. Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis **Forum, Intervet international bv, Boxmeer**; p. 7–14.

GONTIJO, C. M. F., MELO, M. N. (2004). Visceral leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 7: 338-349.

HANDA, M., GUIDOTTI, G. (1996). Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanumtuberosum*). **Biochem Biophys Res Commun**, 218:916–923.

LIMA, V. M. F., ALVES, M. E., IKEDA, F. A., LUVIZOTTO, M. C. R., FEITOSA, M. M.(2003). Anti-Leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 36, 485–489.

LIMA , V. M. F., FATTORI, K. R., FÁTIMA , A. M., NETO, L. S., VASCONCELOS, R. (2010). Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology** 173, 330–333.

LUVIZOTTO, M. C. R. (2008). Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC). In: Leishmune: **manual técnico. Fort Dodge.**

MANCIANTI, F., GRAMICCIA, M., GRADONI, L., PIERI, S. 1988. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of

canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 82: 566-567.

MANNA, L. (2008). Real-time PCR assay in Leishmania-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. **Vet. J**, 177: 279–282.

MAURICIO, I.L., STOTHARD, J. R., MILES, M. A. 2000. The strange case of *Leishmania infantum*. **Parasitol Today** 16: 188-189.

MARQUES-DA-SILVA, E. A., OLIVEIRA, J. C., FIGUEIREDO, A. B., LIMA, D. S. J., CARNEIRO, C. M., FIETTO, J. L. R., AFONSO L. C. C. (2008). Extracellular nucleotide metabolism in Leishmania: influence of adenosine in the establishment of infection. **Microbes and Infection**, 10: 850 e 857.

MARTINEZ-MORENO, A., MORENO, T., MARTINEZ-MORENO, F.J., COSTA, I., HERNANDEZ, S. (1995). Humoral and humoral immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 48: 209-220

METTLER, M., GRIMM, F., CAPELLI, G., CAMP, H., DEPLAZES, P. (2005). Evaluation of enzyme-Linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic Leishmania infections in dogs. **J Clin Microbiol** 43(11): 5515–5519.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2006) **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Editora MS., 122p.

NOLI, C. AND AUXILIA, S. T. (2005). Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. **Vet. Dermatol**, 16: 213–232.

PORROZZI R., COSTA M.V., TEVA, A., FALQUETO, A., FERREIRA, A. (2007). Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude

and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. **Clin Vacc Immunol** 14: 544–548.

PIETRANGELI, C. E., SKAMENE, E., EDELSON, P. J., KONGSHAVN, P. A. L. (1981). Measurement Of 5'-Nucleotidase In Mouse Peritoneal Macrophages In Listeriosis. **Infection And Immunity**, 1206-1210.

ROBSON, S. C., SÉVIGNY J., ZIMMERMANN, H.(2006). The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, 2: 409–430.

ROSÁRIO E. Y., GENARO, O., FRANÇA-SILVA, J. C., DA COSTA, R. T., MAYRINK, W. (2005). Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 100: 197–203.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. (1989). Molecular Cloning: A laboratory manual, second edition. **Cold Spring Harbor Press, Cold Spring, NY.**

SAFENKOVA, I., ZHERDEV, A. AND DZANTIEV, B. (2012). Factors influencing the detection limit of the lateral-flow sandwich immunoassay: a case study with potato virus X. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. DOI: 10.1007/s00216-012-5985-8

SANSOM, F. M., P. RIEDMAIER, H. J. NEWTON, M. A. DUNSTONE, C. E. MULLER, H. STEPHAN, E. BYRES, T. BEDDOE, J. ROSSJOHN, P. J. COWAN, A. J. D'APICE, S. C. ROBSON, AND E. L. HARTLAND. (2008). Enzymatic properties of an ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase from *Legionella pneumophila*: substrate specificity and requirement for virulence. **J. Biol. Chem.** 283: 12909–12918.

SANTOS, R. F., POSSA, M. A., BASTOS, M. S., GUEDES, P. M., ALMEIDA, M. R., DEMARCO, R., VERJOVSKI-ALMEIDA, S., BAHIA, M. T., FIETTO, J. L. 2009. Influence of Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase Activity on *Trypanosoma cruzi* Infectivity and Virulence. **PloS Negl Trop Dis** 3: e387.

SIDDIG, M., GHALIB, H., SHILLINGTON, D. C., PETERSEN, E. A. (1988). Visceral leishmaniasis in the Sudan: comparative parasitological methods of diagnosis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 82:66–8.

SMITH, T. M., KIRLEY T. L. (1999). Site-directed mutagenesis of a human brain ecto-apyrase: evidence that the E-type ATPases are related to the actin/heat shock 70/sugar kinase superfamily. **Biochemistry**, 38: 321–328.

STEINEBRUNNER, I., JETER, C., SONG, C., ROUX, S. J. (2000). Molecular and biochemical comparison of two different apyrases from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol Biochem**, 38: 913–922.

SUNDAR, S., REED, S. G., SINGH, V. P., KUMAR, P. C., MURRAY, H. W. (1988). Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. **Lancet**, 351:563–5.

SUNDAR, S., RAI, M. (2002). Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol** 9: 951-958.

SUNDAR, S., PAI, K., SAHUM, M. (2003). Immunochromatographic strip test detection of anti K39 antibody in indian visceral leishmaniasis. **Ann Trop Med Parasitol**; 96: 19-23.

TAFURI, W. L., SANTOS, R. L., ARANTES, R. M. E., GONÇALVES, R., MELO, M.N., MICHALICK, M. S. M. (2003). An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **J. Immunol. Methods.**, v. 292(1-2), p. 17-23.

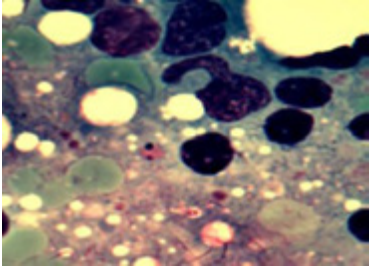
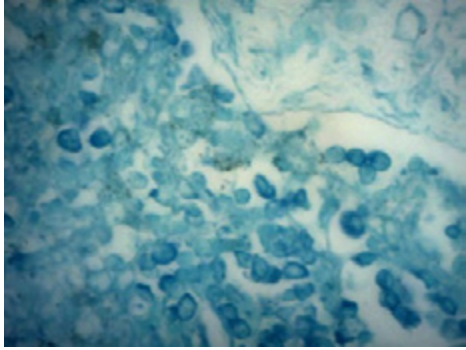
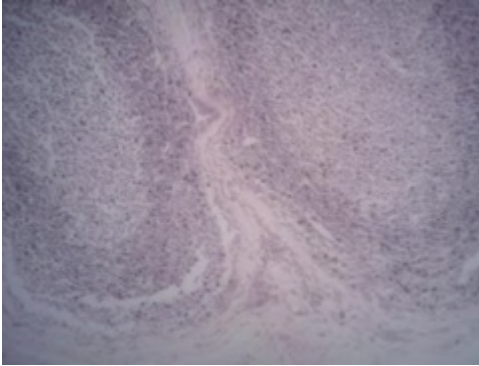
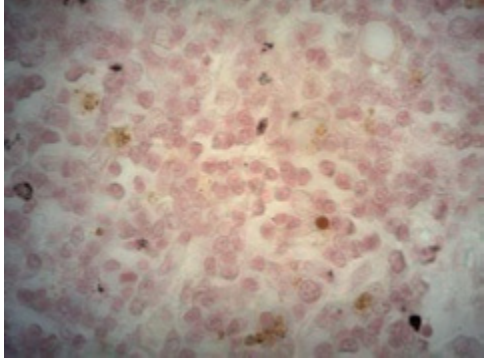
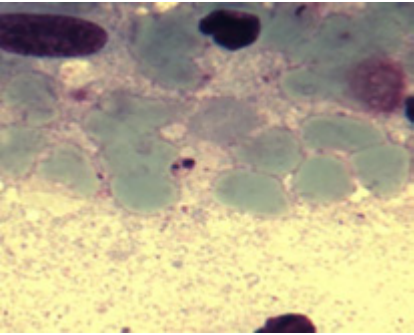
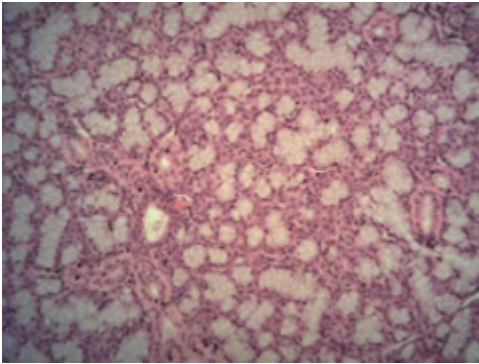
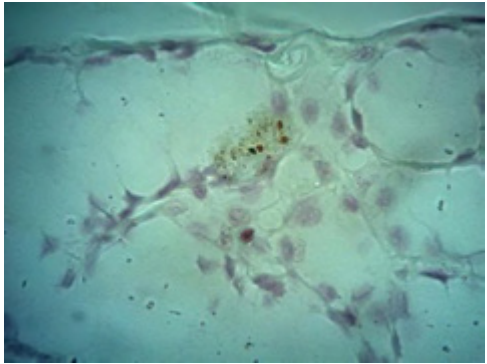
VASCONCELOS, E. G., S. T. FERREIRA, T. M. CARVALHO, W. SOUZA, A. M. KETTLUN, M. MANCILLA, M. A. VALENZUELA, AND S. VERJOVSKI-ALMEIDA. 1996. Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*. Immunological cross-reactivities with potato apyrase and *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase. **J. Biol. Chem.** 271:22139–22145.


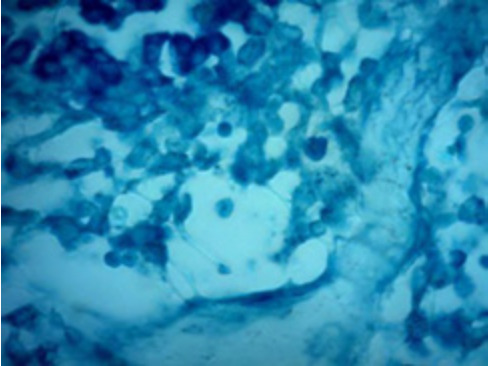
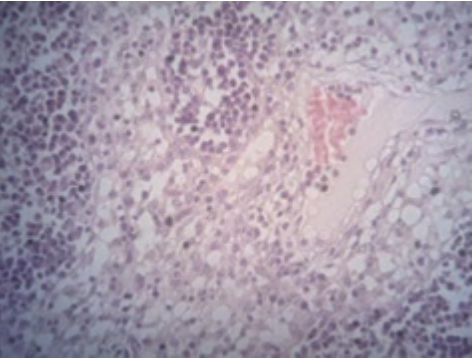
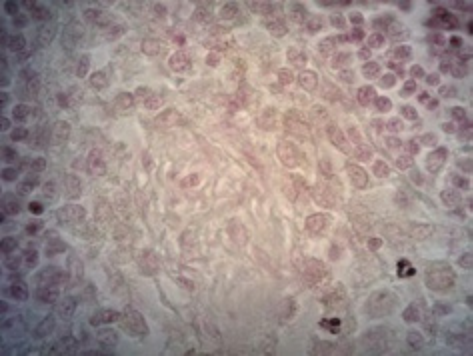
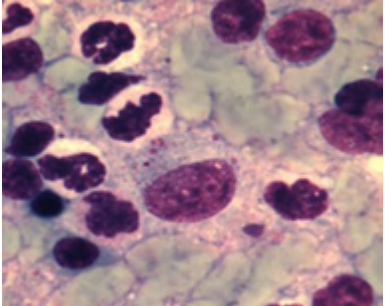
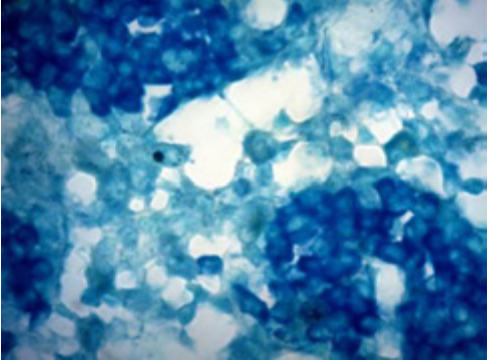
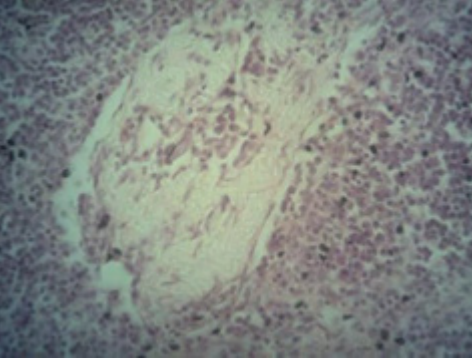
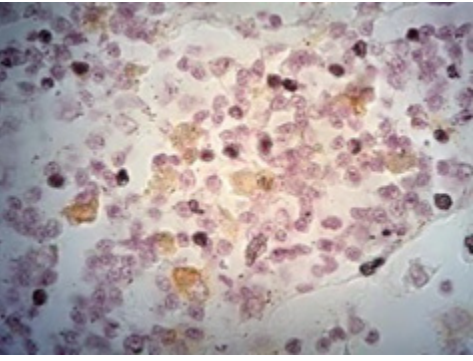
WHO (World Health Organization). (2010). **Control of the Leishmaniasis**. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/WHO_CDS_NTD_IDM_2007.3_eng.pdf>. 14h 21 min. 30-11-2010.

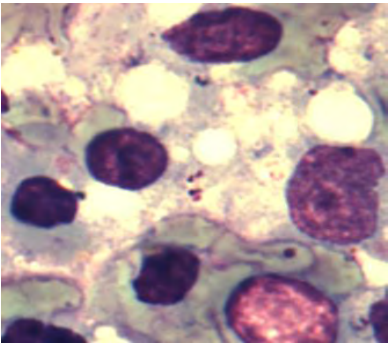
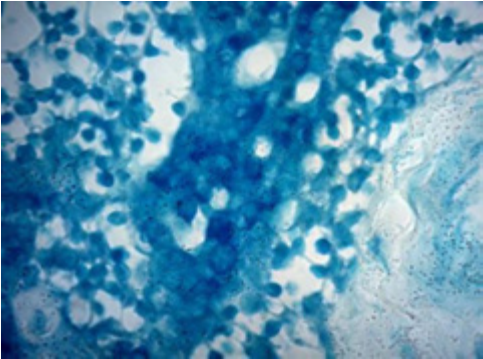
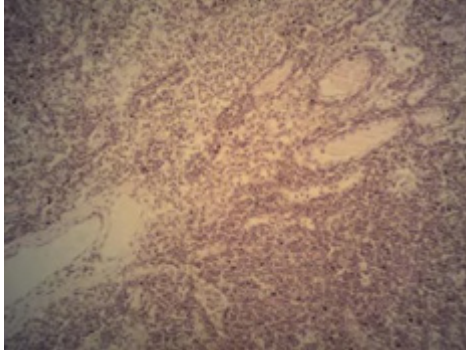
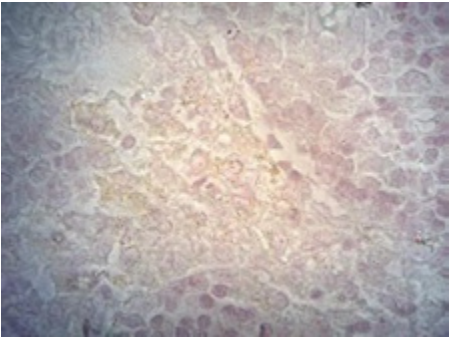
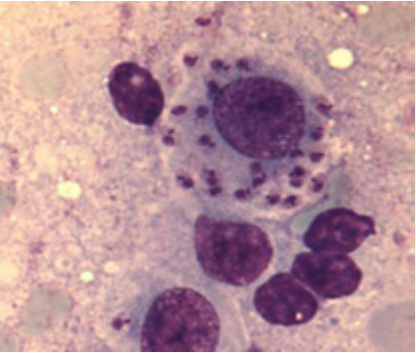
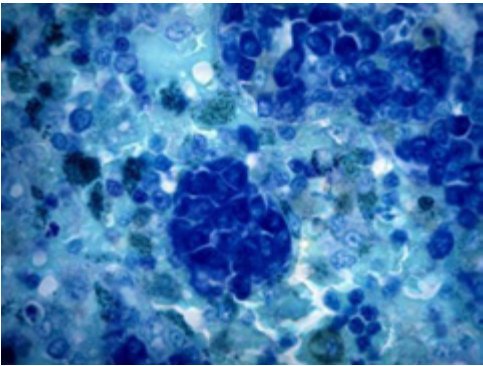
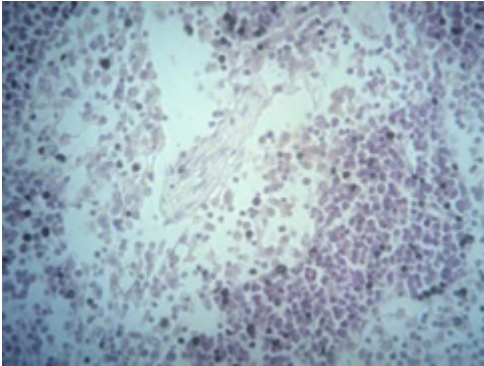
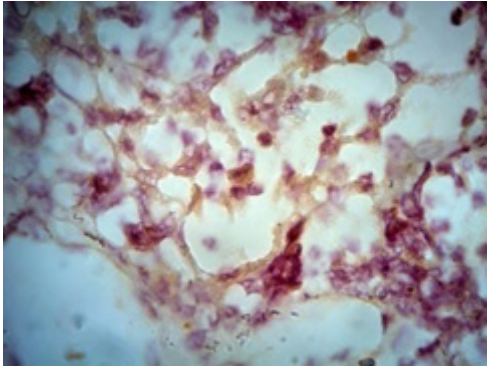
ZIMMERMANN, H. (2000). Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, 362: 299–309.

ANEXOS

ANEXO1

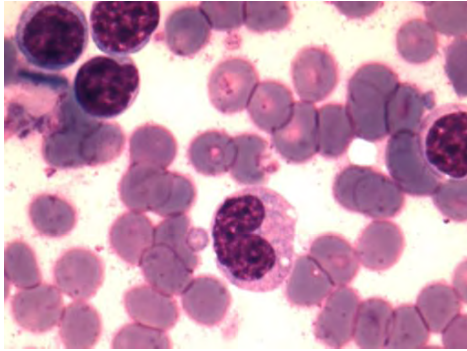
	AMOSTRAS B-BAÇO OU F-FÍGADO IMPRINT	AMOSTRAS DE LINFONODOS		
ID	IMPRINT	GIEMSA	H&E	IMUNOHISTOQUÍMICA
1	 <p style="text-align: center;">B</p>			
2	 <p style="text-align: center;">B</p>			

3	 <p data-bbox="392 667 414 699">B</p>			
4	 <p data-bbox="392 1212 414 1244">B</p>			

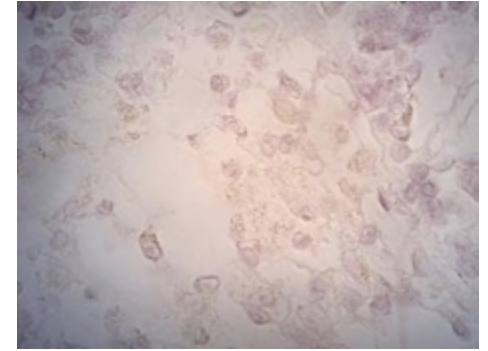
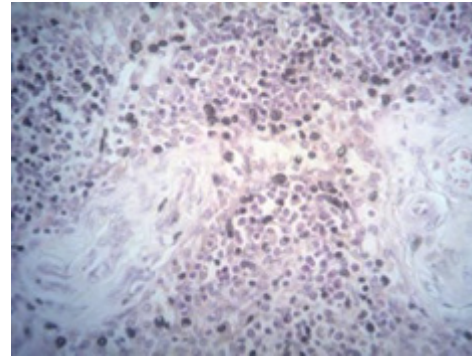
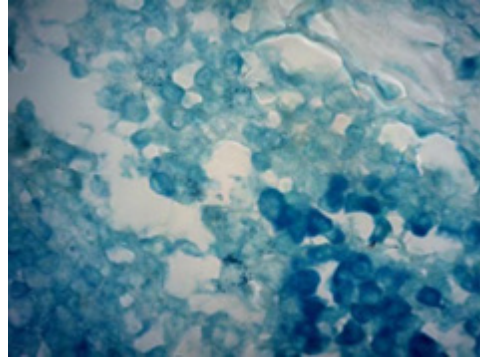
5	 <p>B</p>			
6	 <p>B</p>			

7

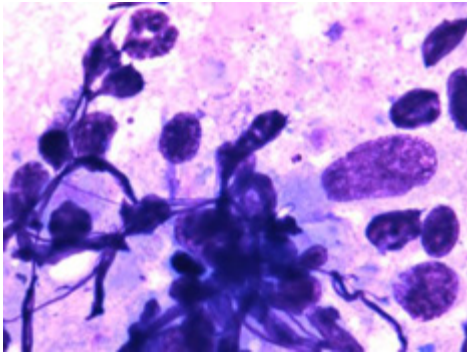
Ausente



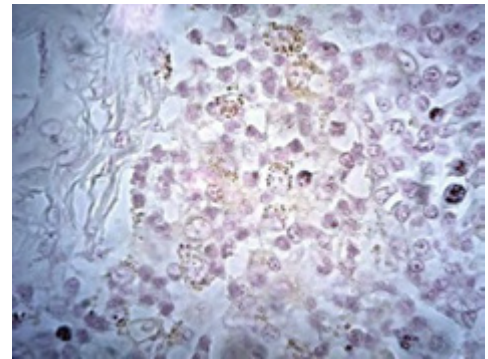
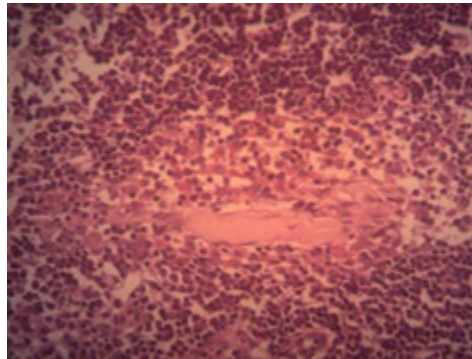
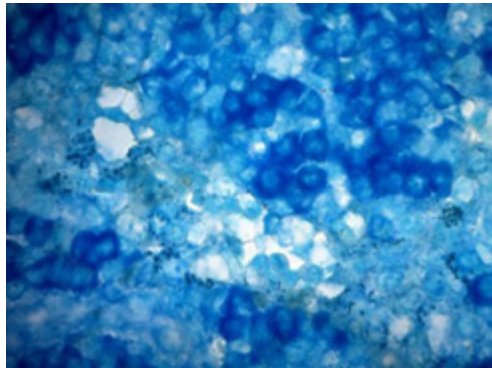
B



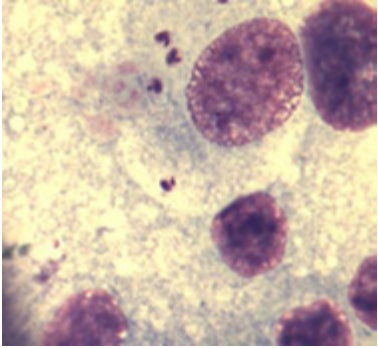
8



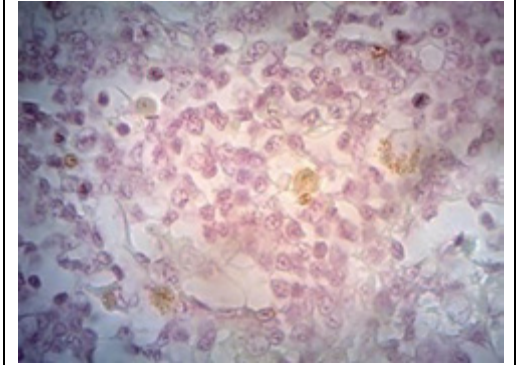
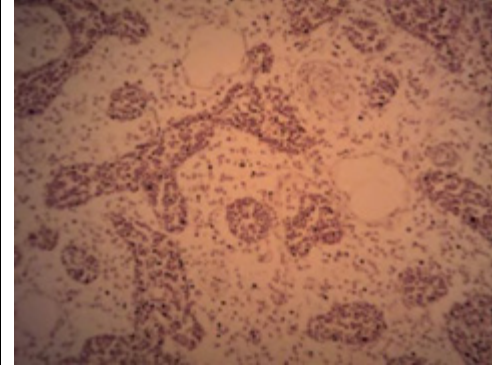
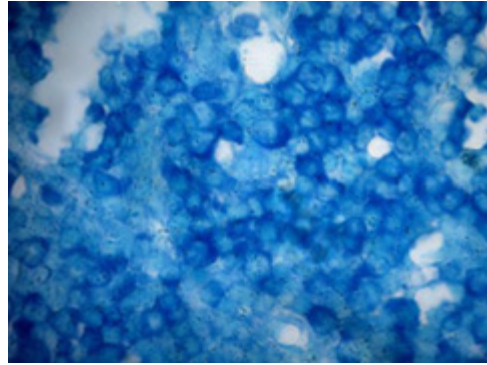
B



9

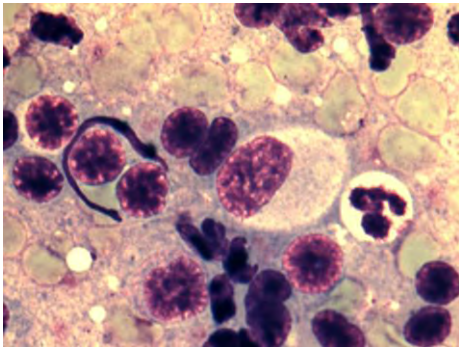


B

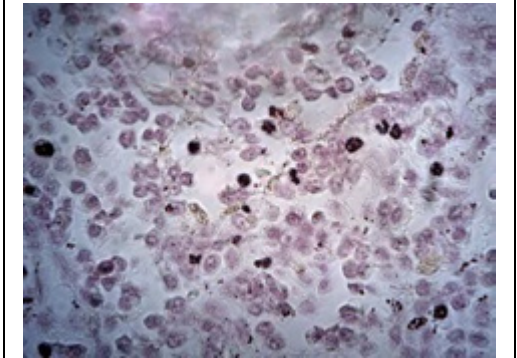
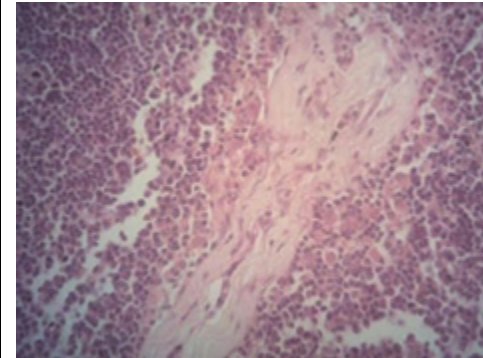
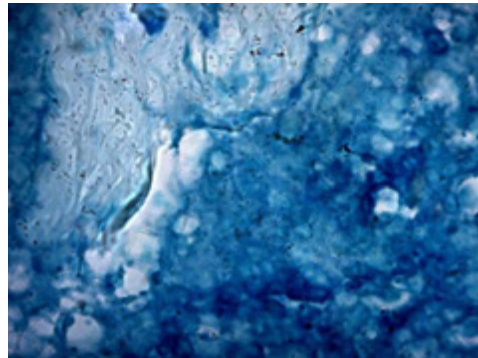


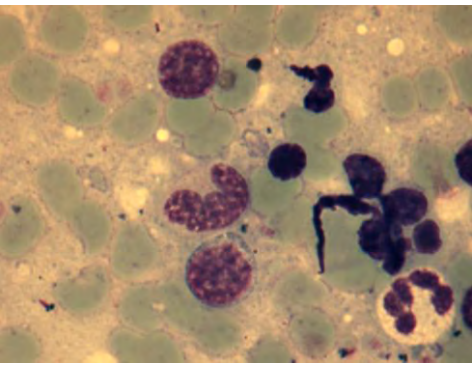
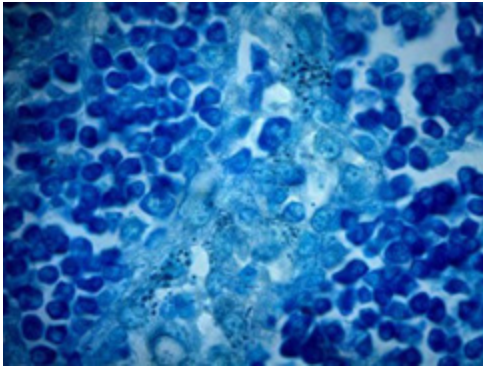
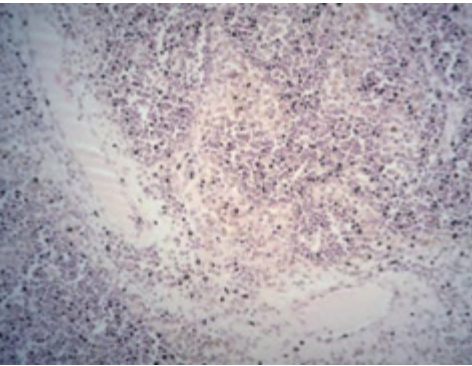
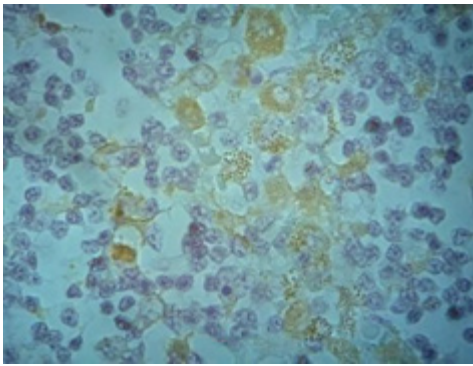
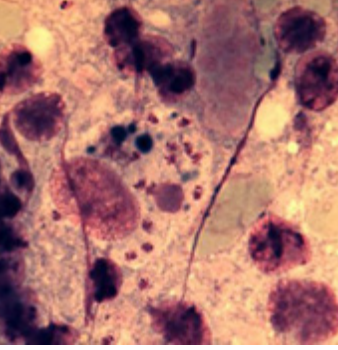
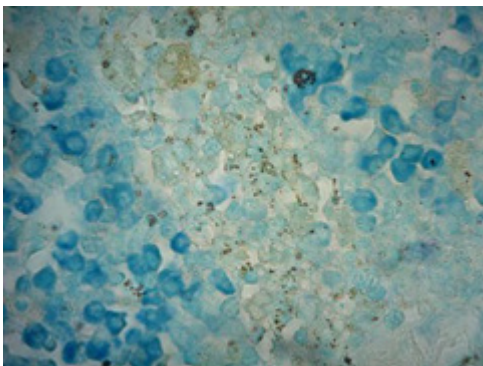
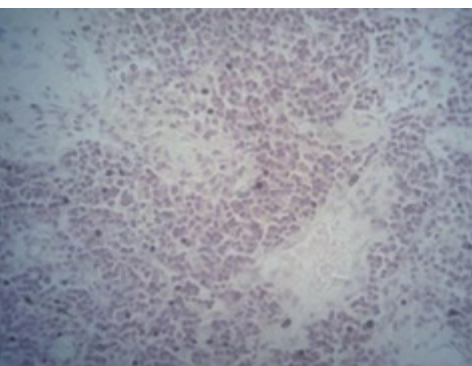
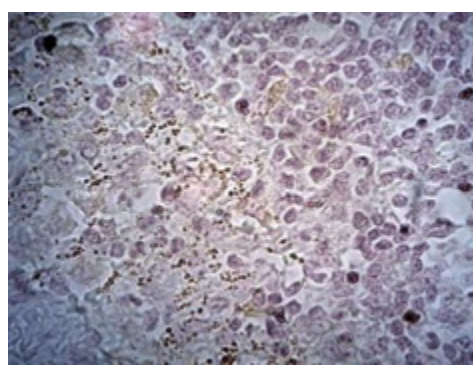
10

Ausente

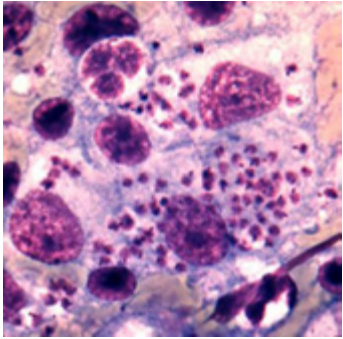


B-F

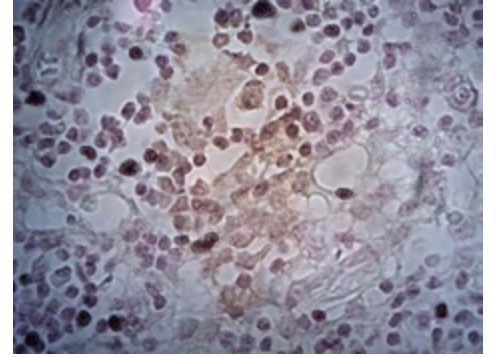
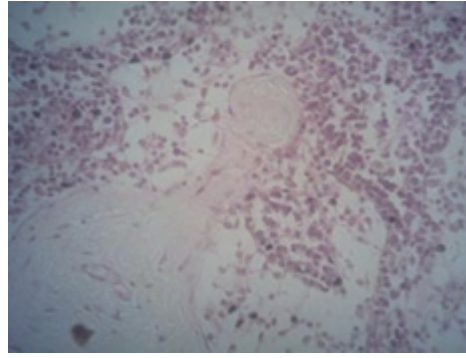
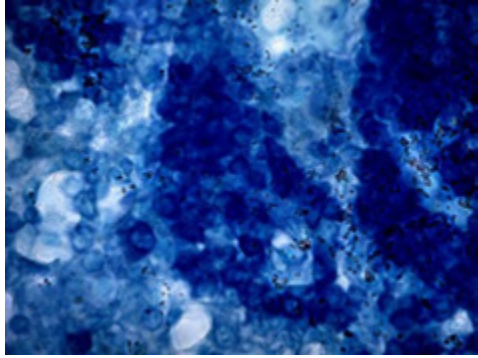


11	<p>Ausente</p>  <p>B-F</p>			
12	 <p>B</p>			

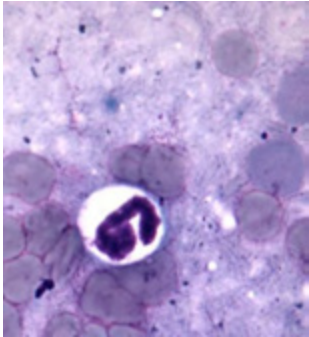
13



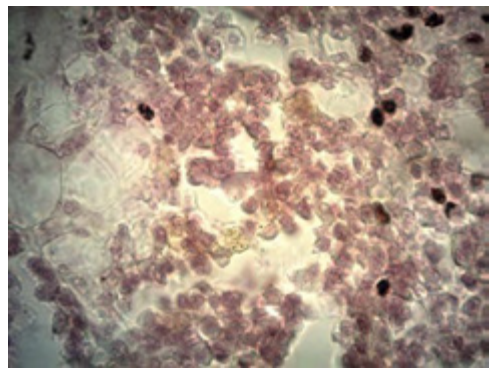
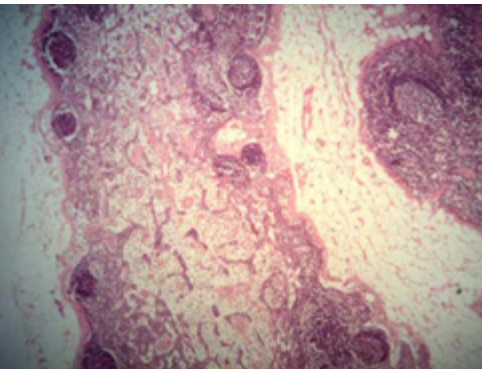
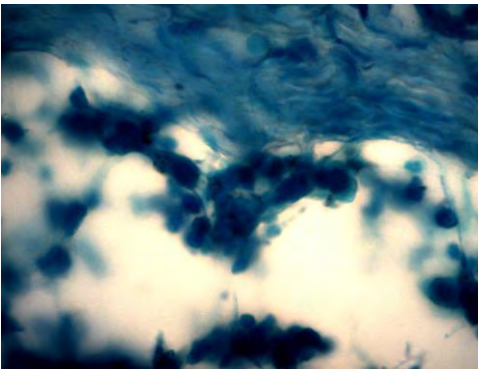
B



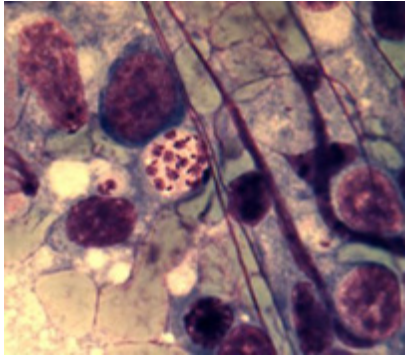
14



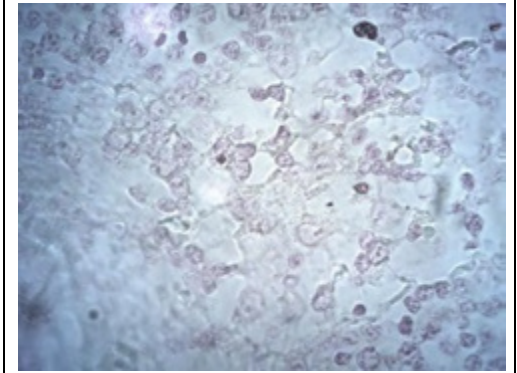
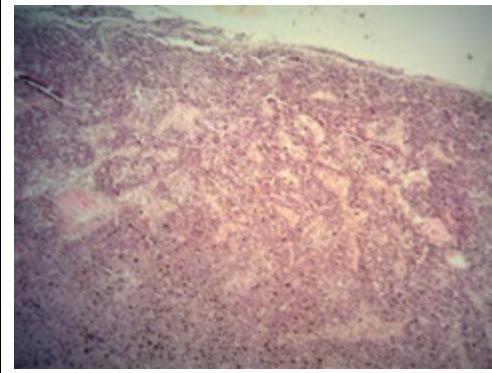
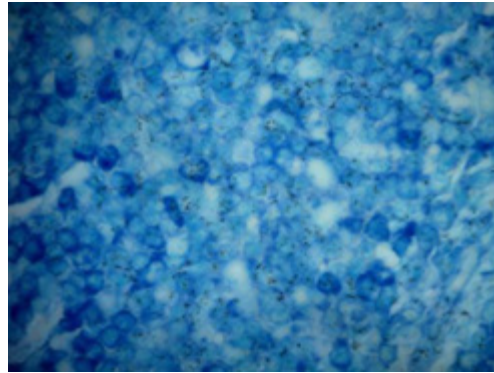
B



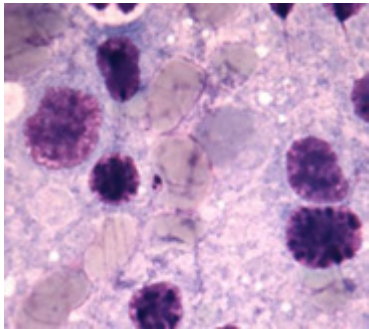
15



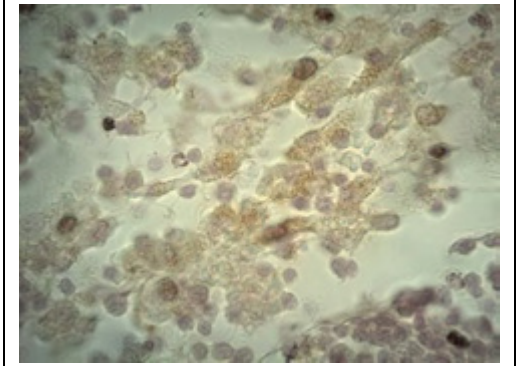
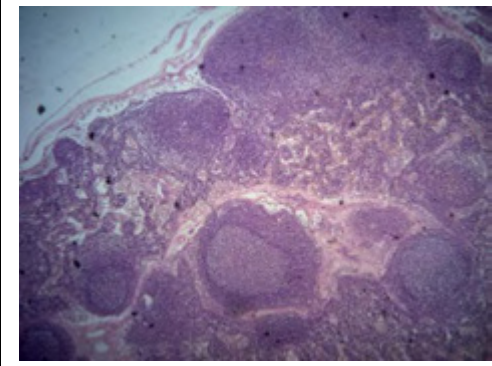
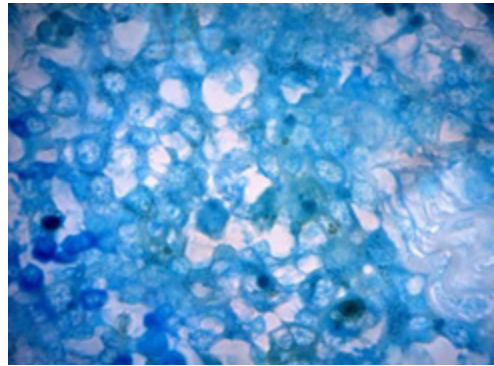
B



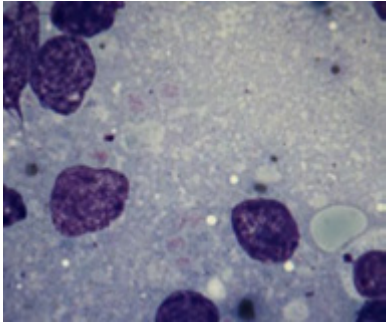
16



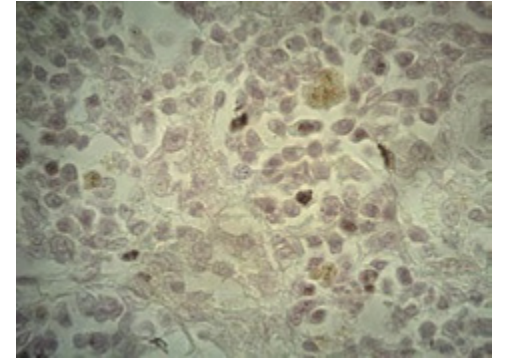
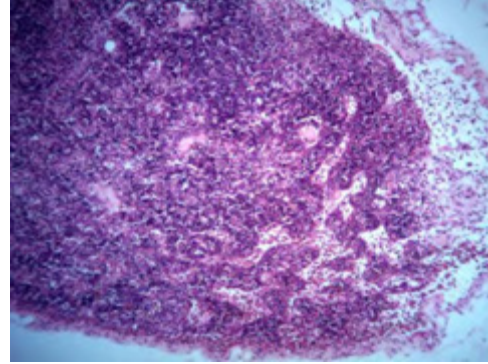
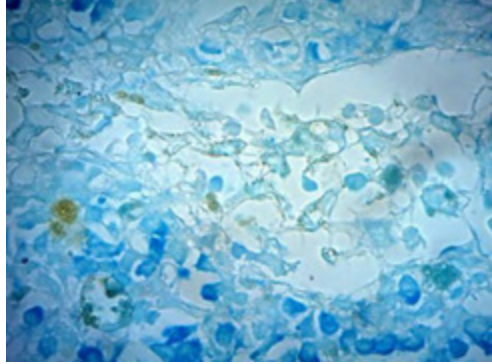
B



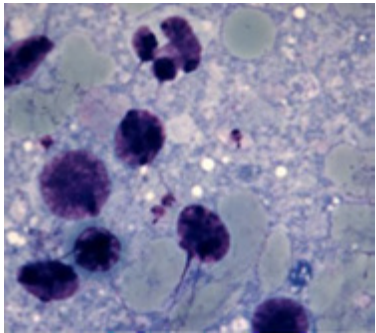
17



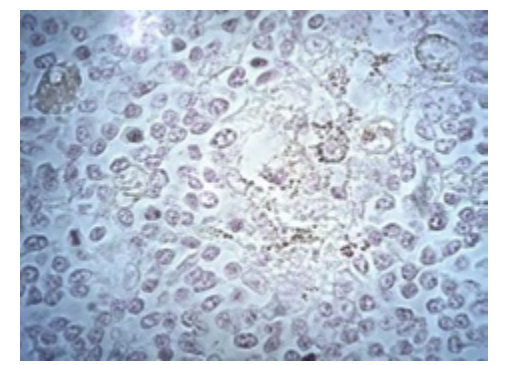
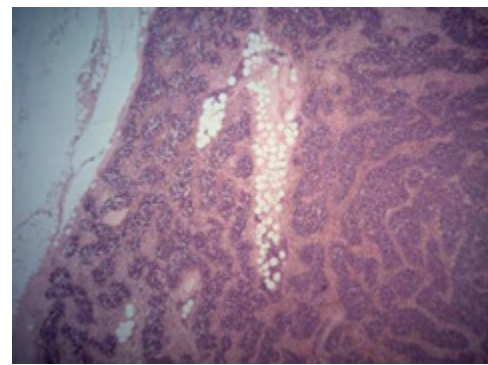
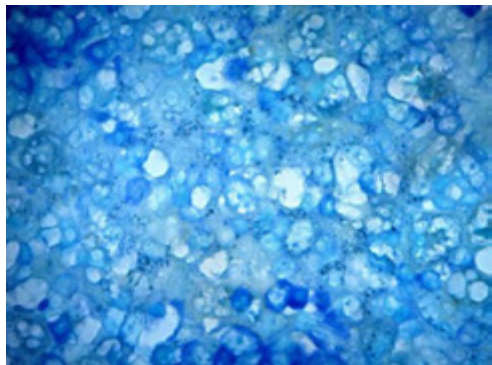
B

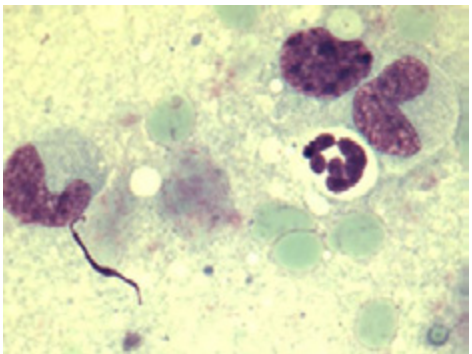
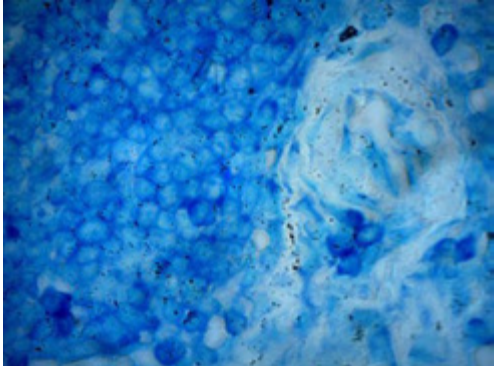
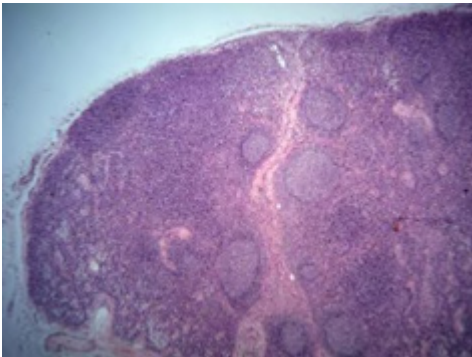
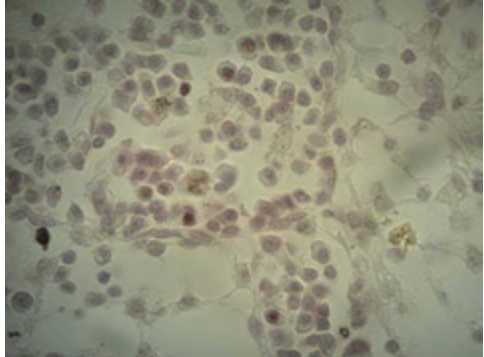
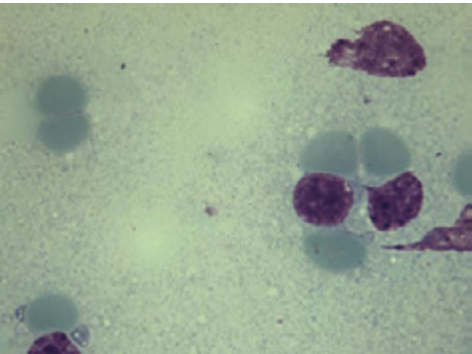
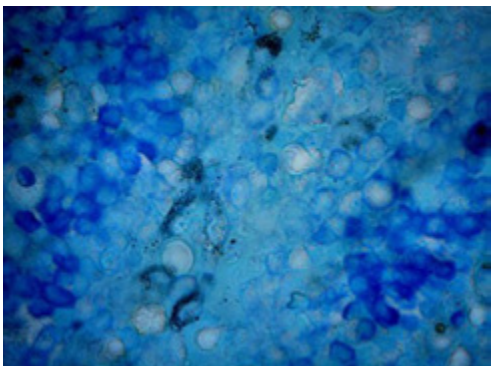
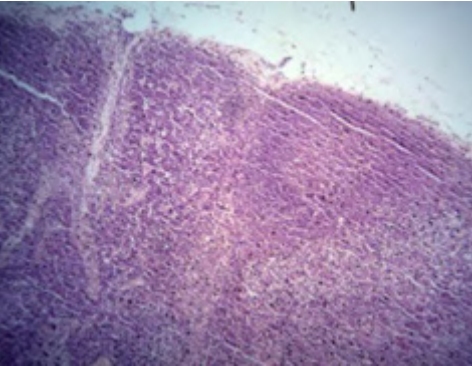
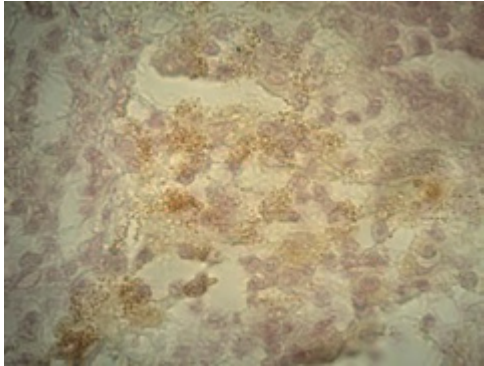


18

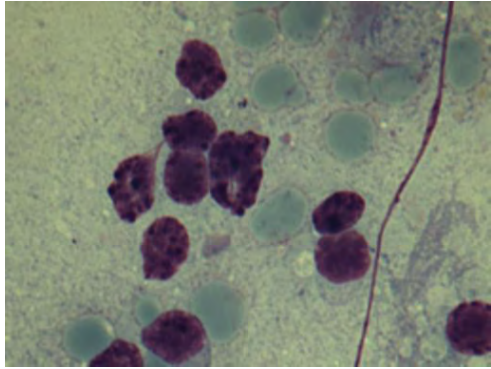


B

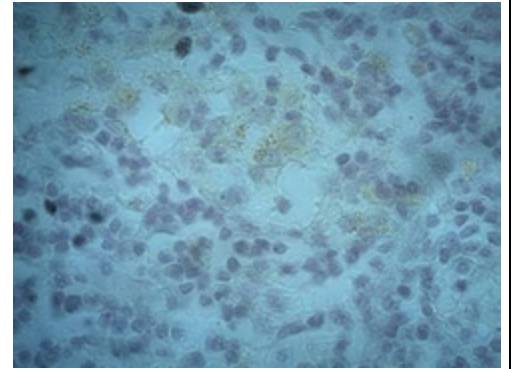
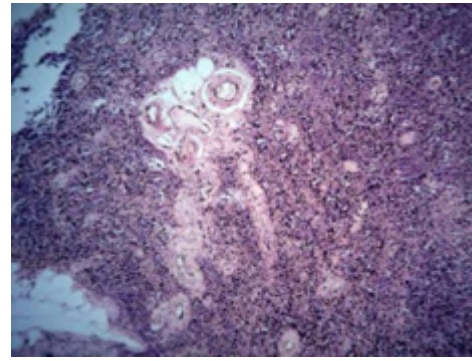
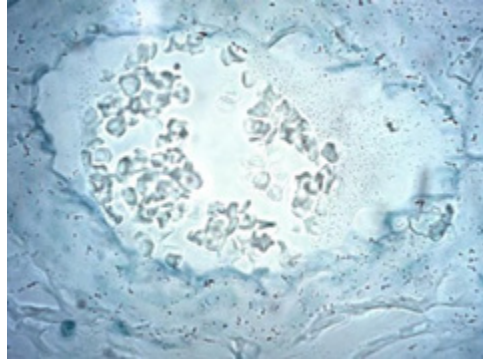


19	<p>Ausente</p>  <p>B</p>			
20	 <p>B</p>			

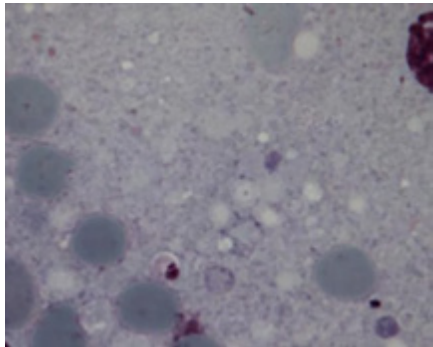
21



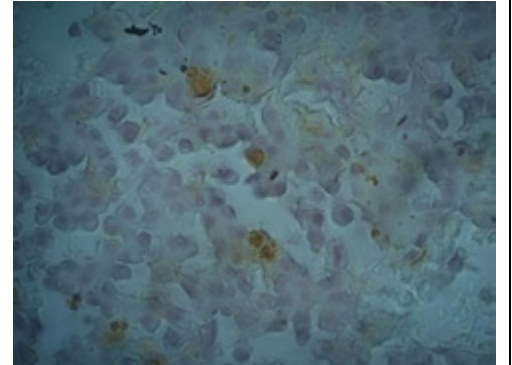
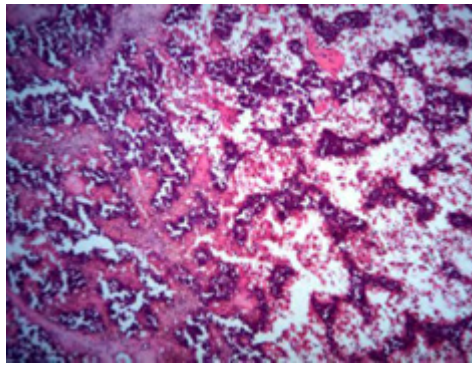
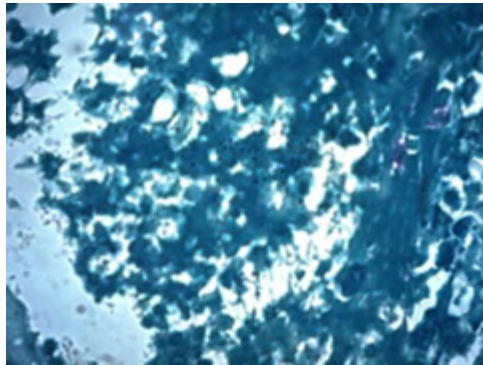
B

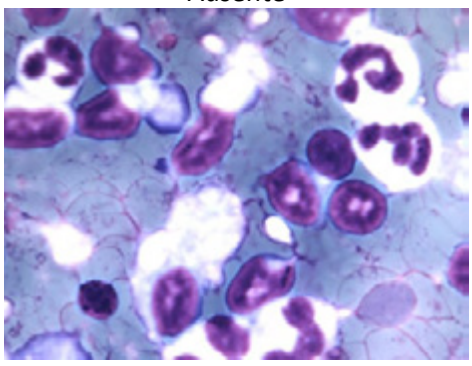
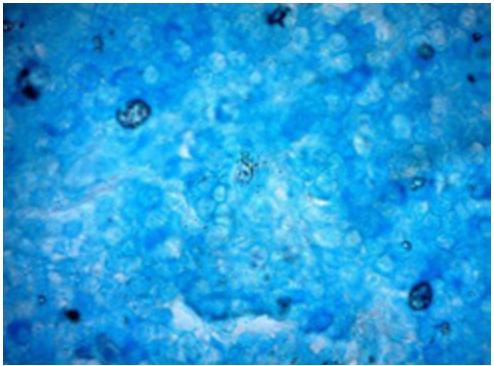
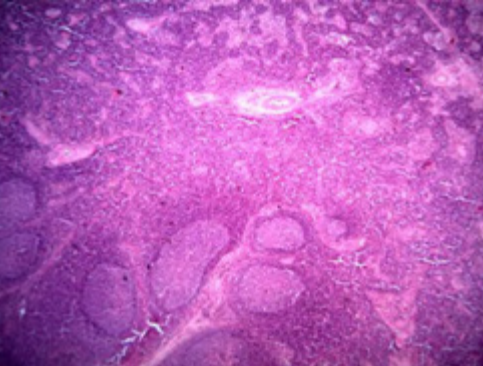
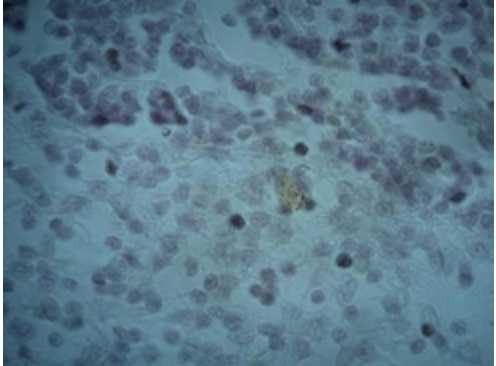
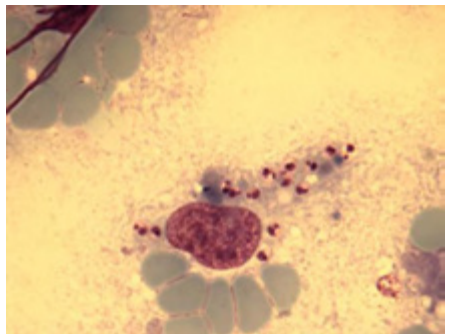
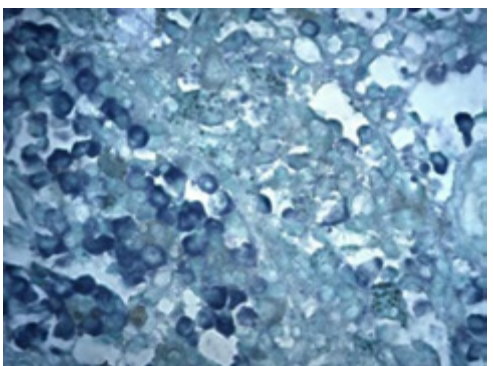
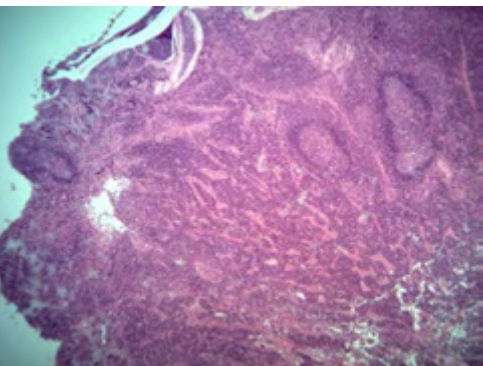
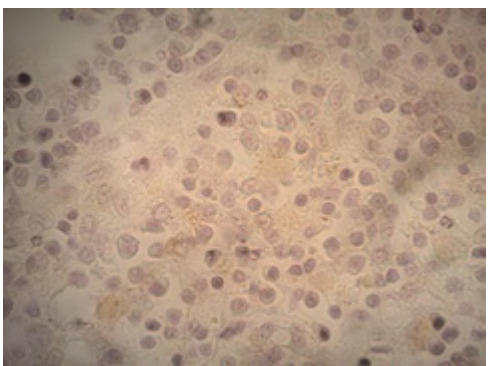


22

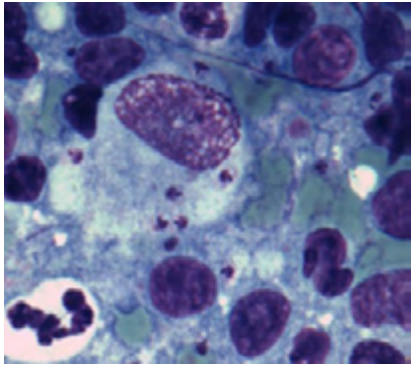


B

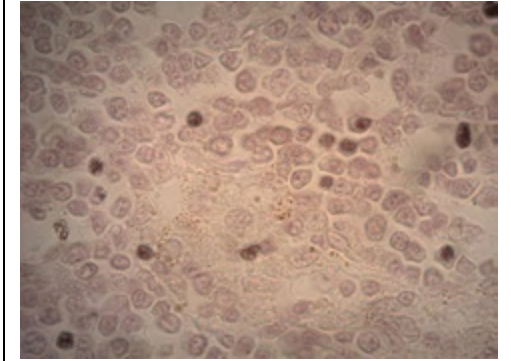
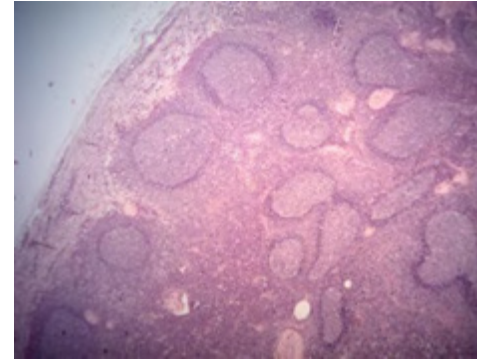
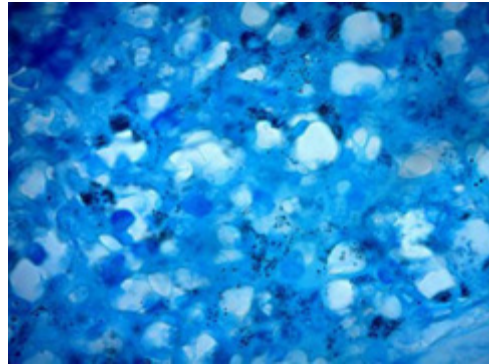


23	<p>Ausente</p>  <p>F-B</p>			
24	 <p>B</p>			

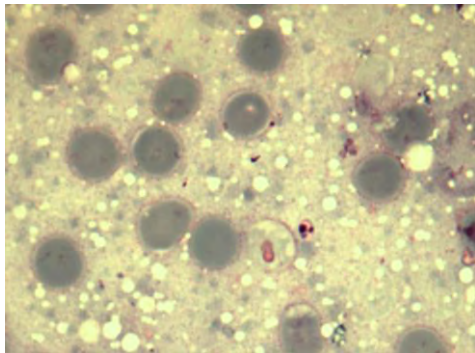
25



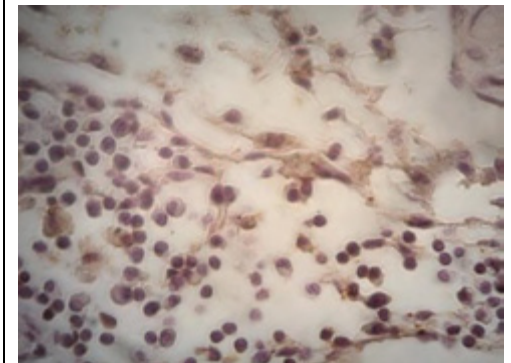
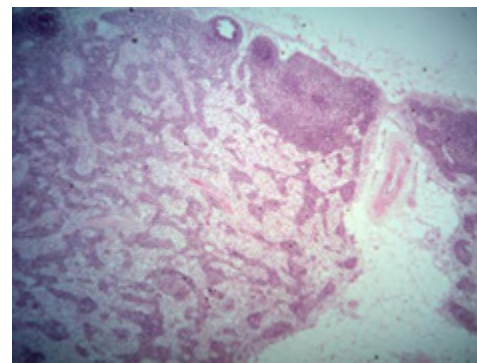
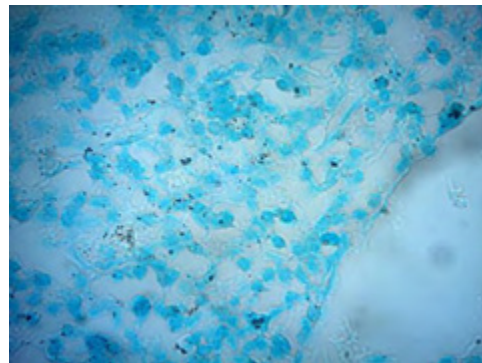
B

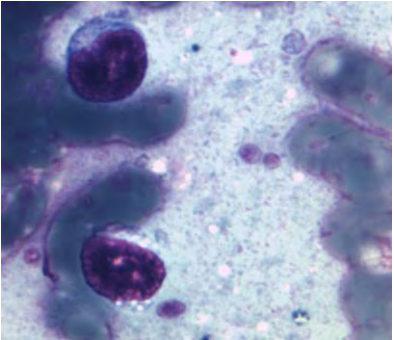
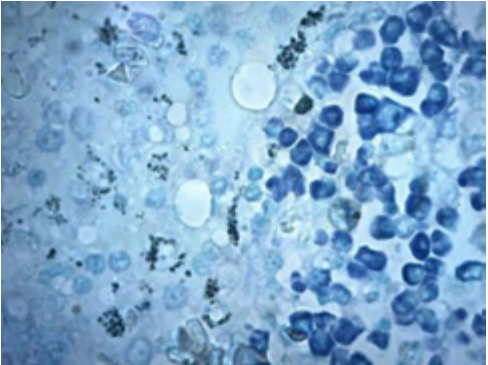
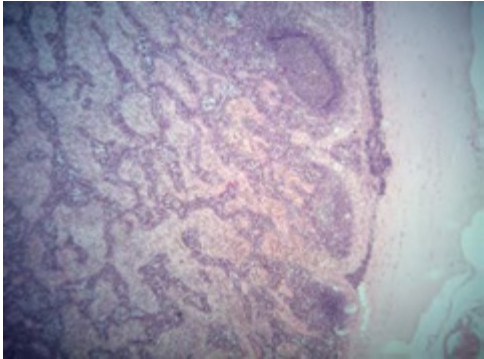
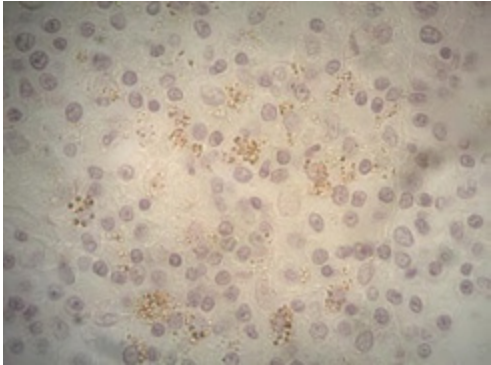
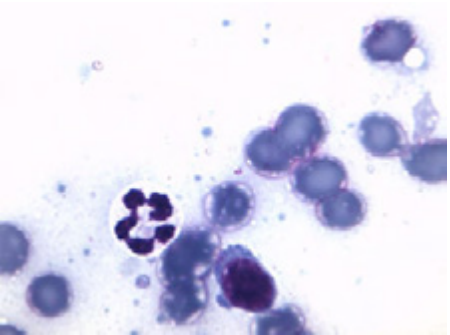
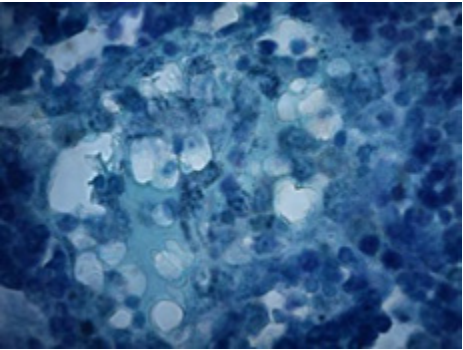
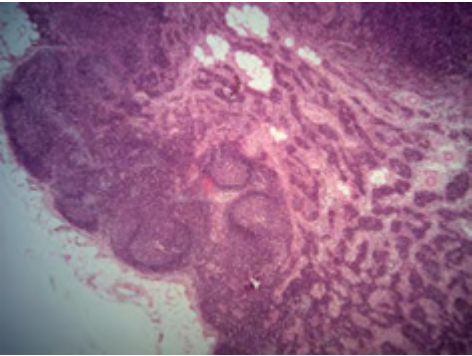
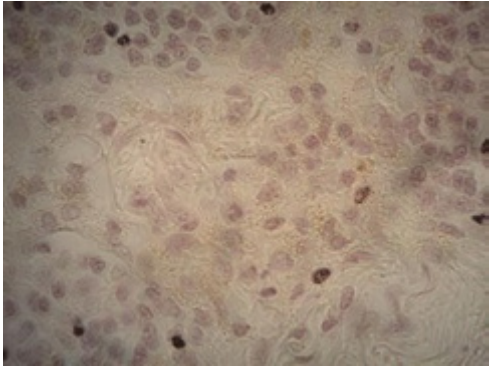


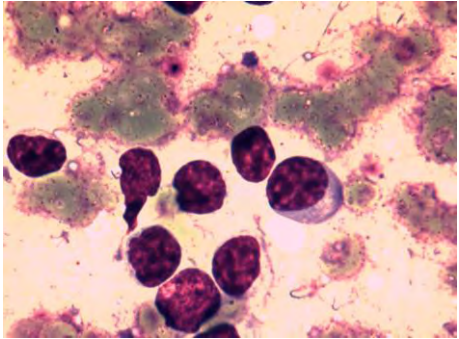
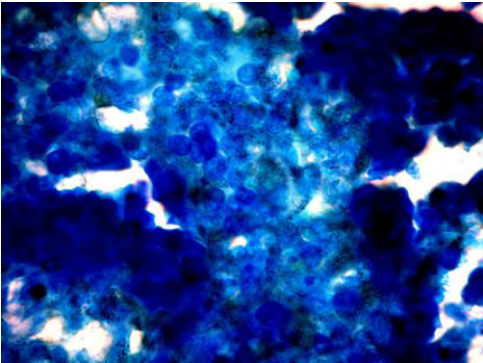
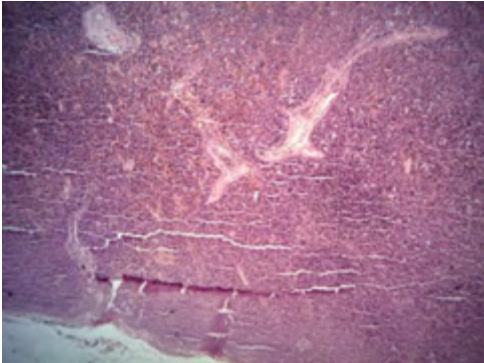
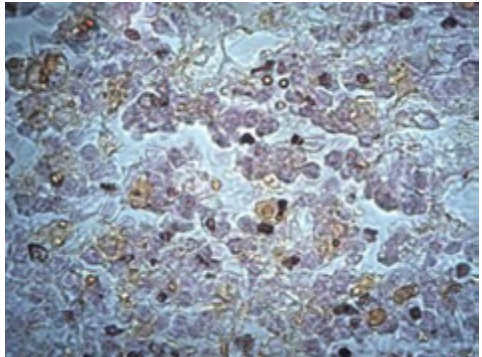
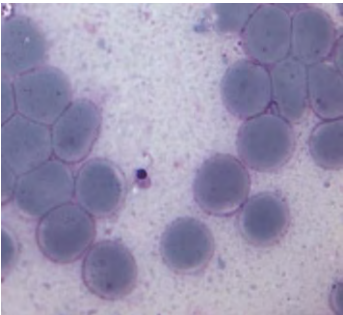
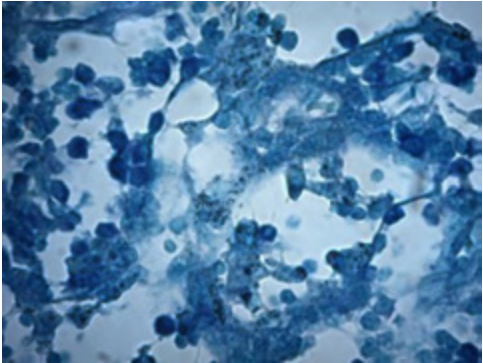
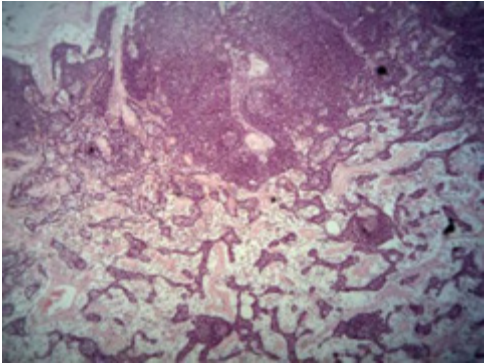
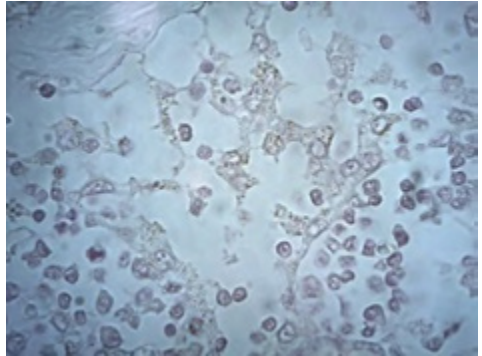
26

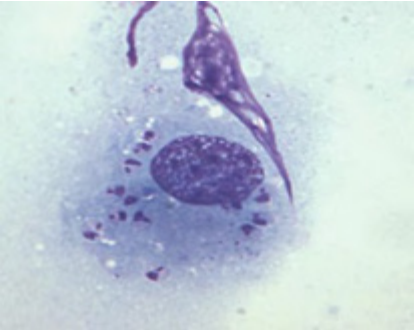
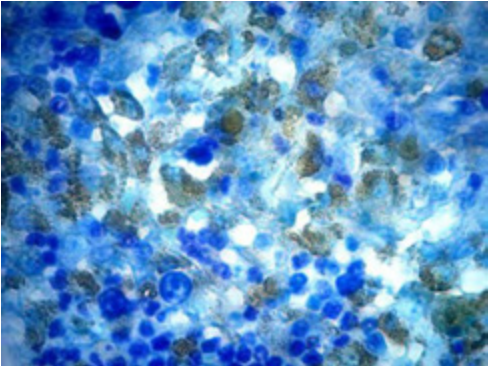
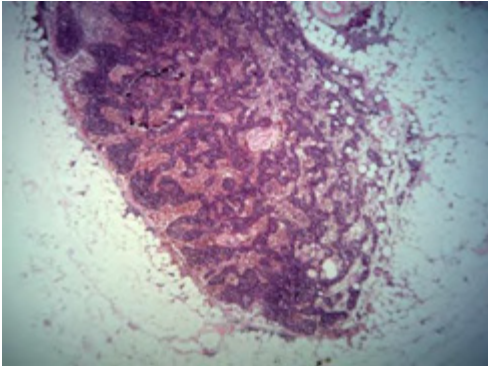
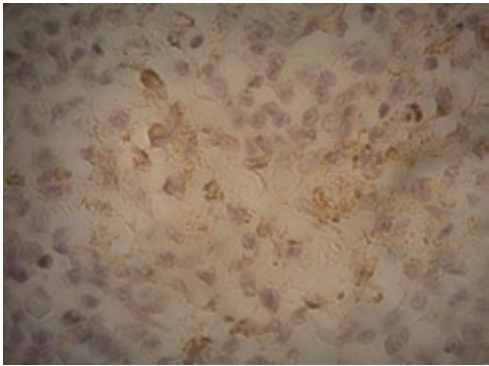
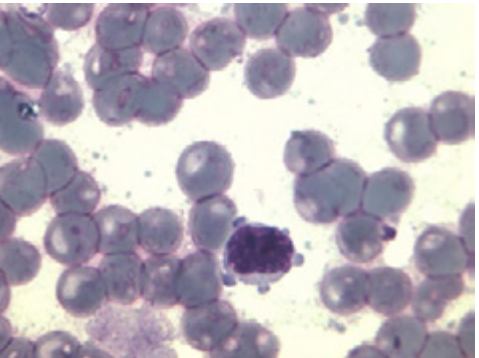
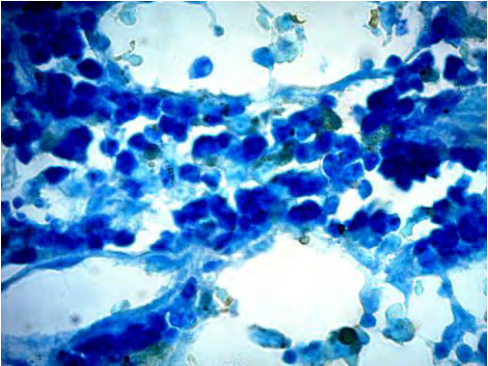
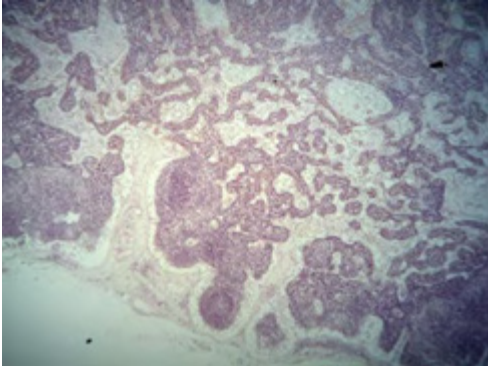
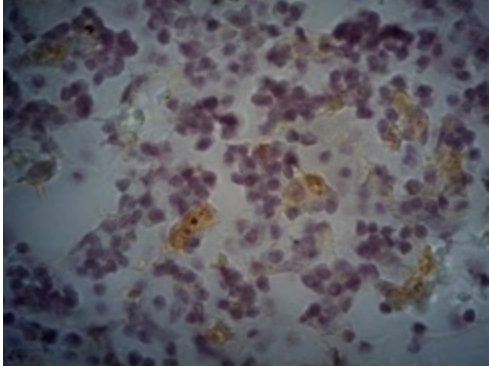


B-F

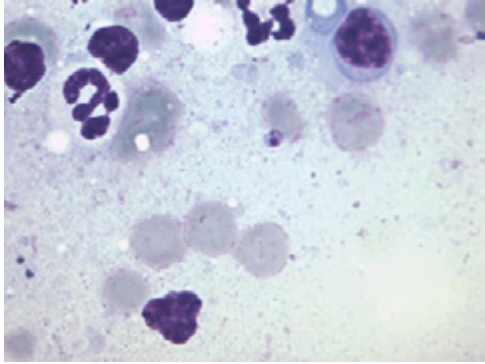


27	 <p>F</p>			
28	<p>Ausente</p>  <p>F-B</p>			

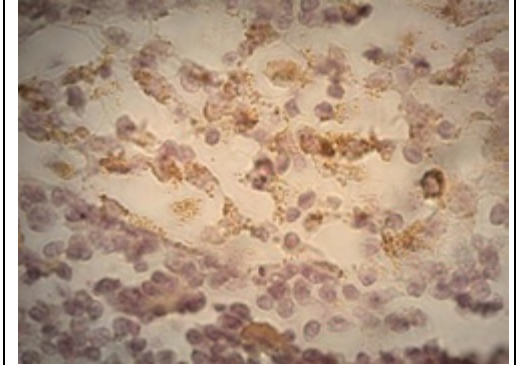
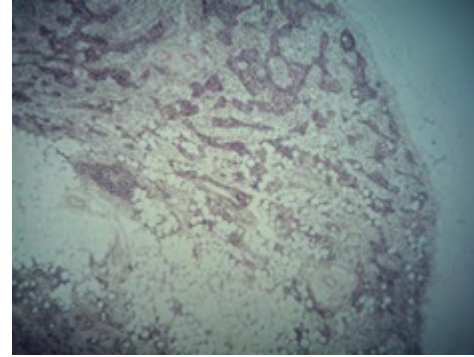
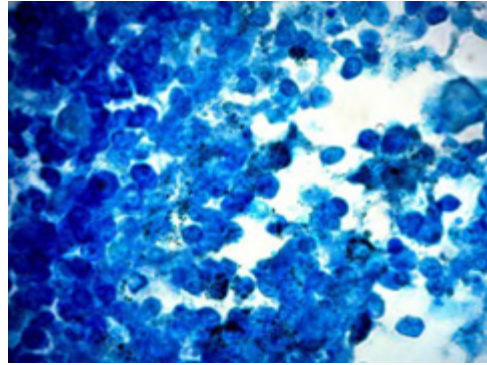
29	<p>Ausente</p>  <p>F-B</p>			
30	 <p>F-B</p>			

31	 <p>F</p>			
32	<p>Ausente</p>  <p>F-B</p>			

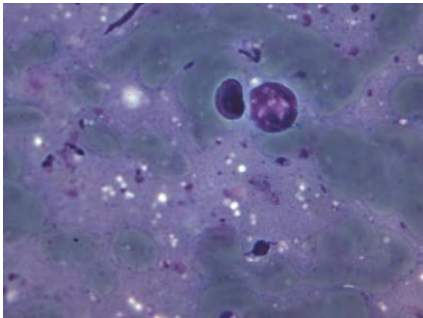
33



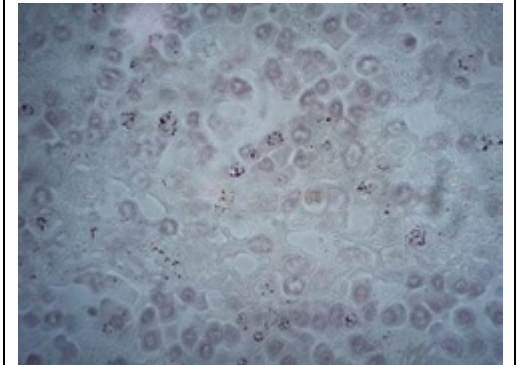
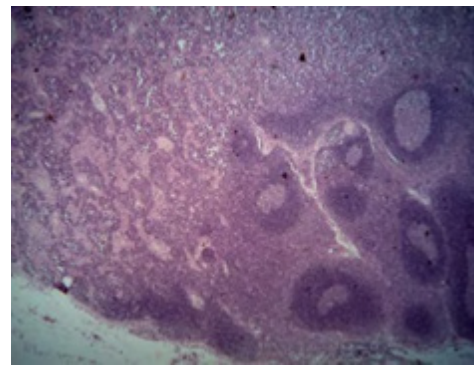
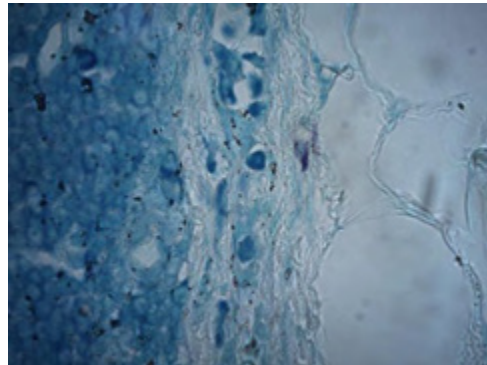
F



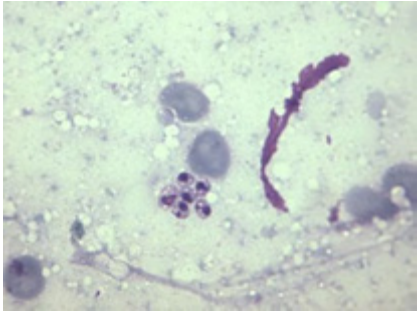
34



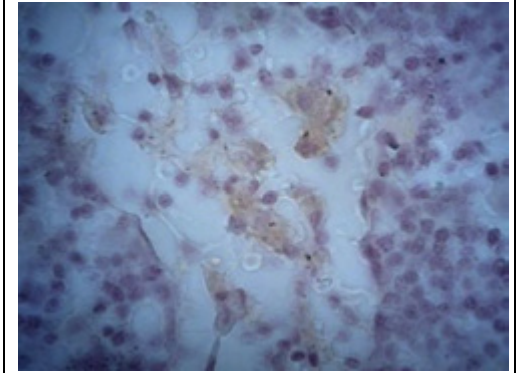
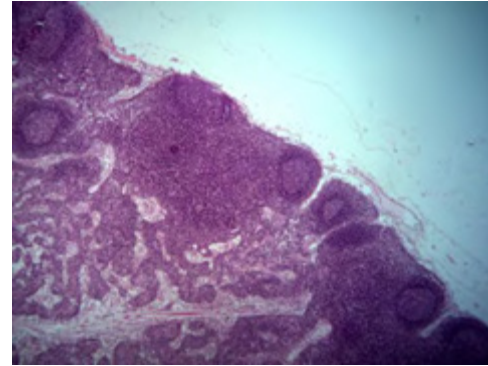
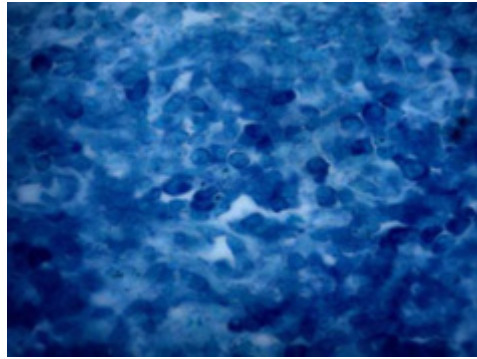
F



35

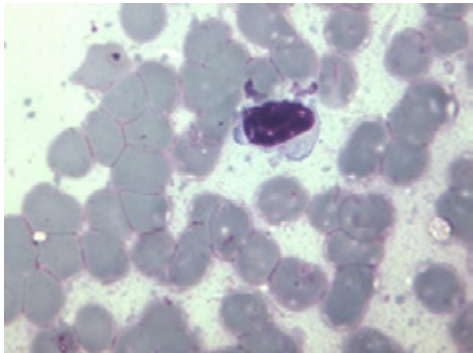


F

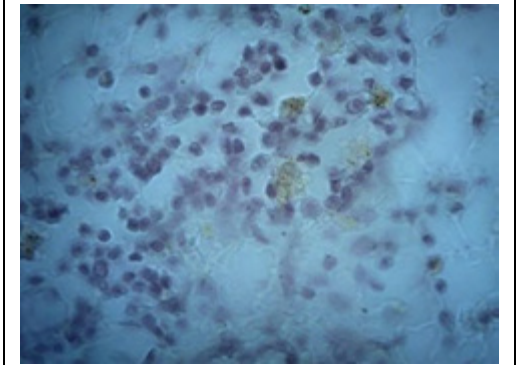
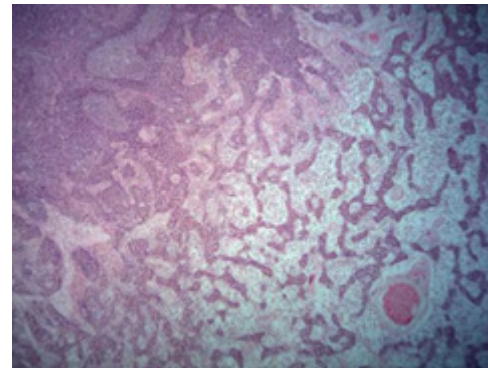
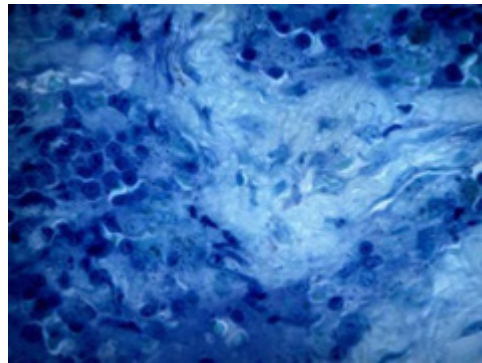


36

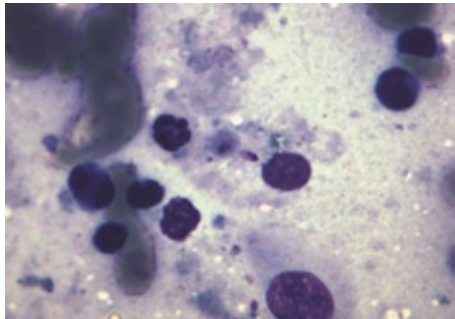
Ausente



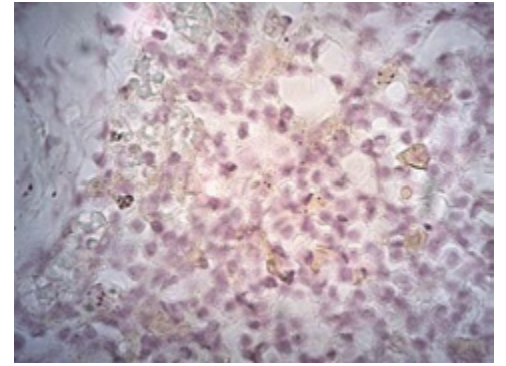
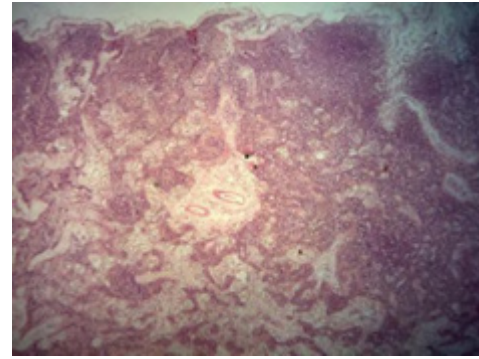
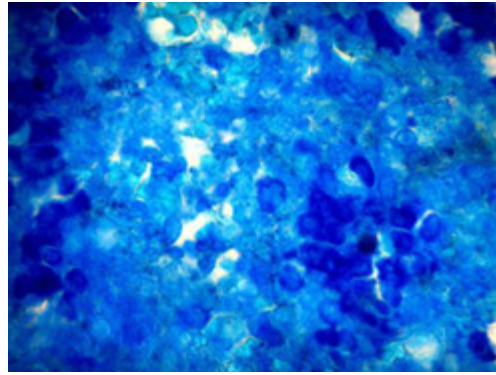
F-B



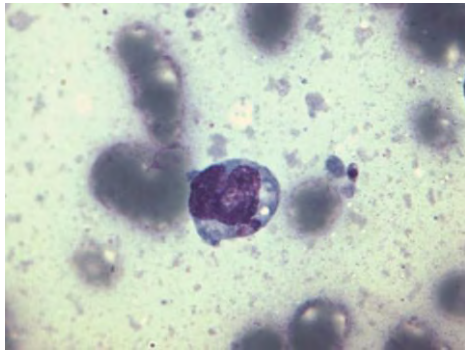
37



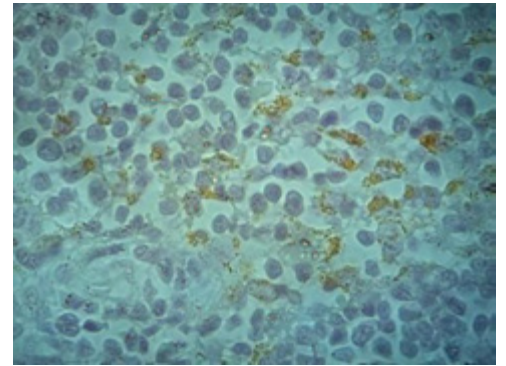
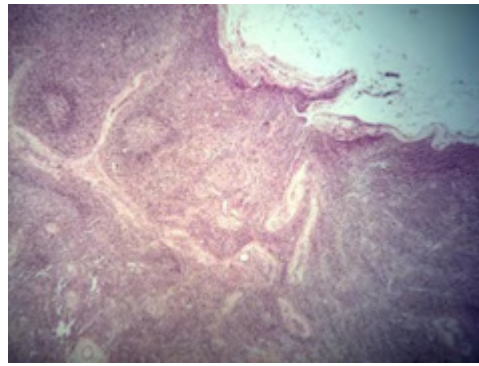
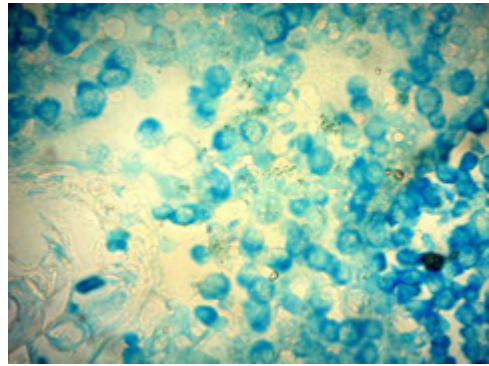
F



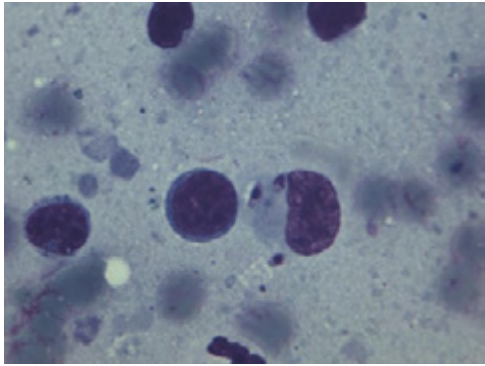
38



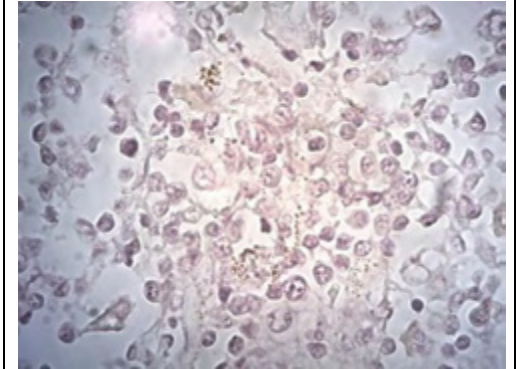
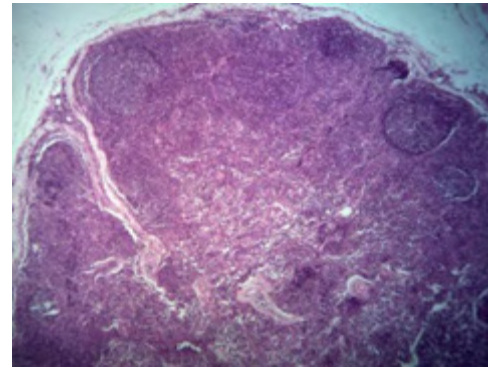
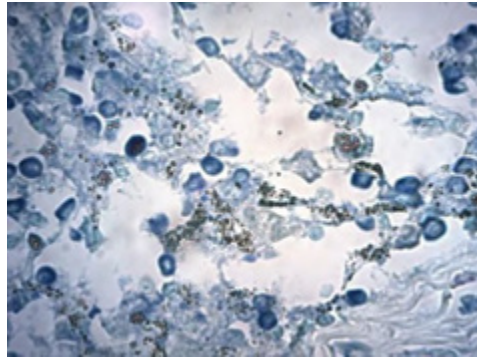
F



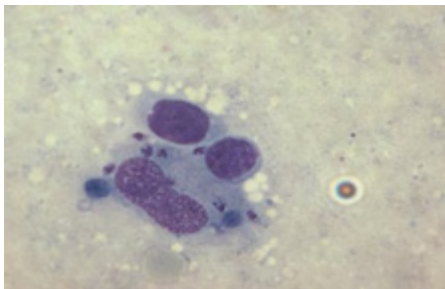
39



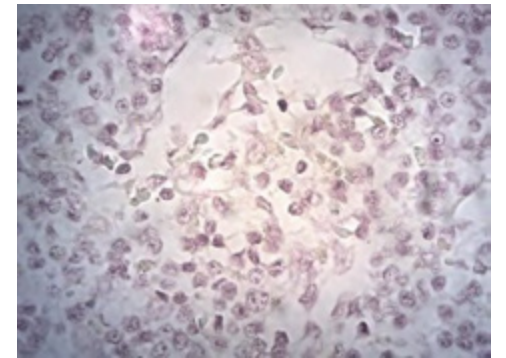
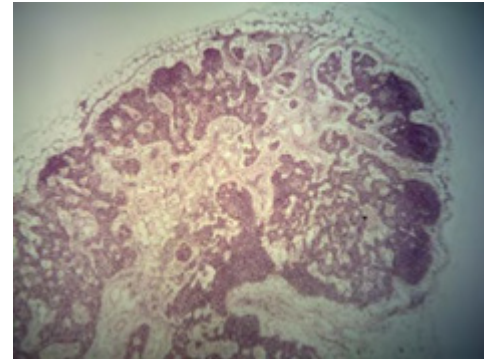
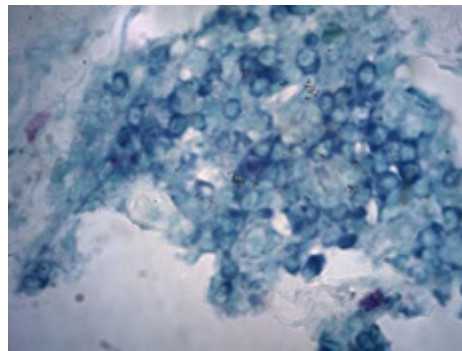
F



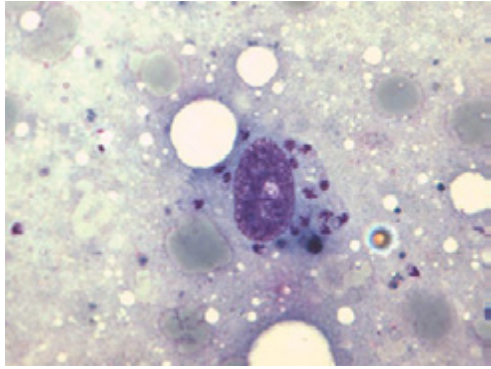
40



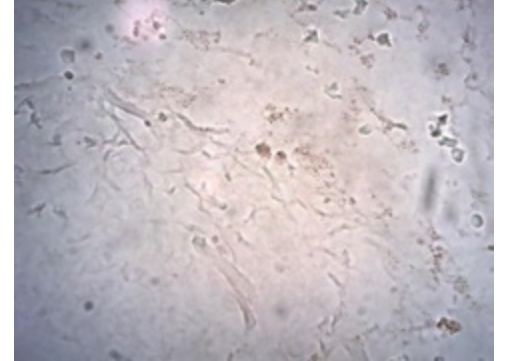
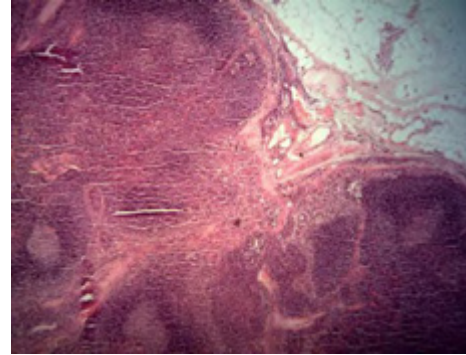
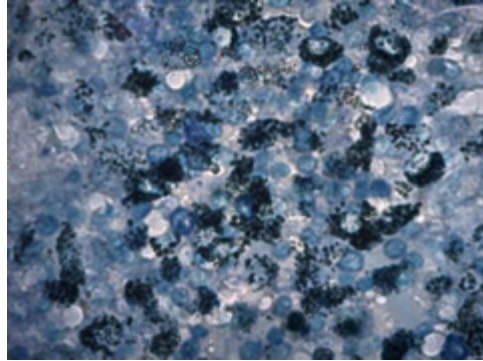
F



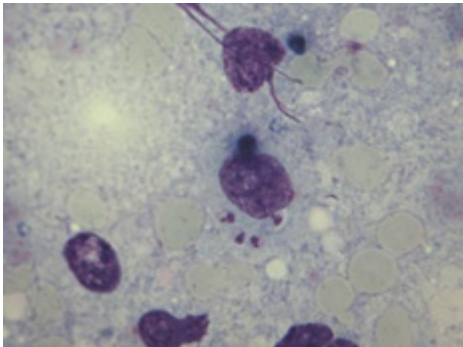
41



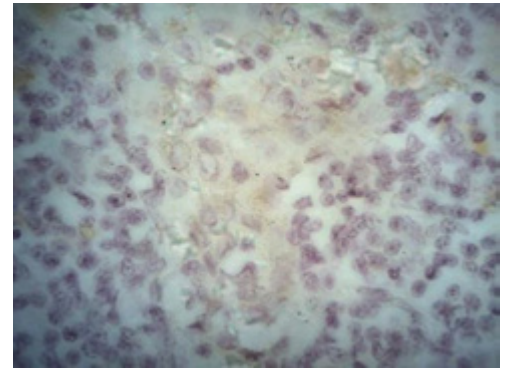
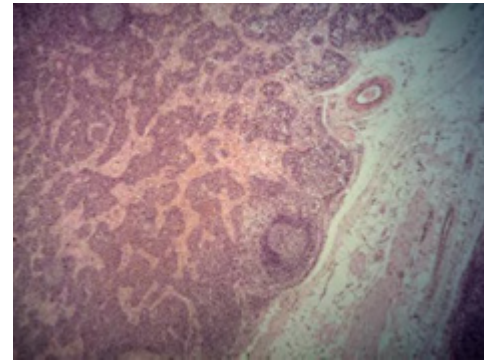
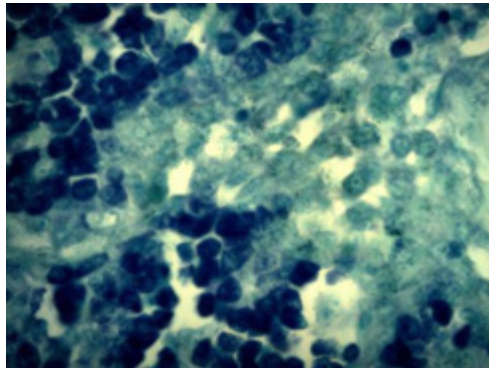
B

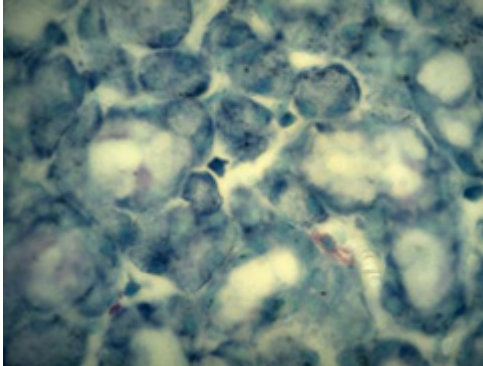
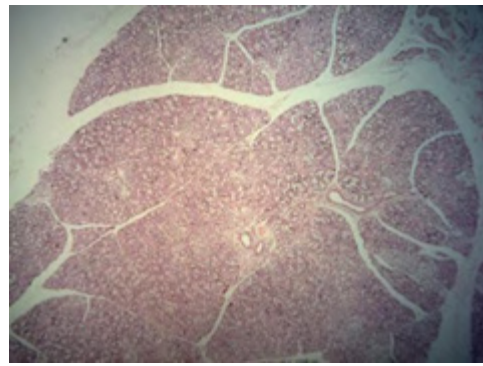
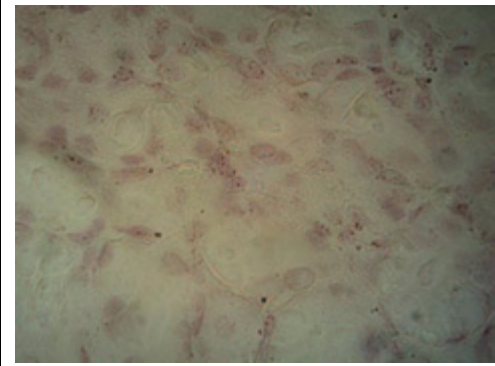
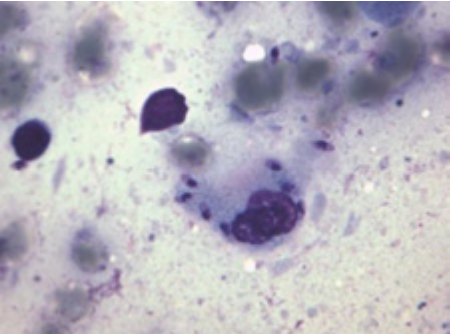
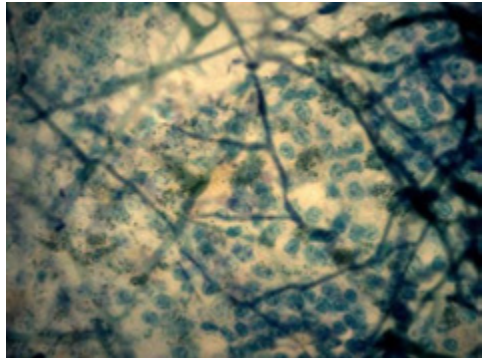
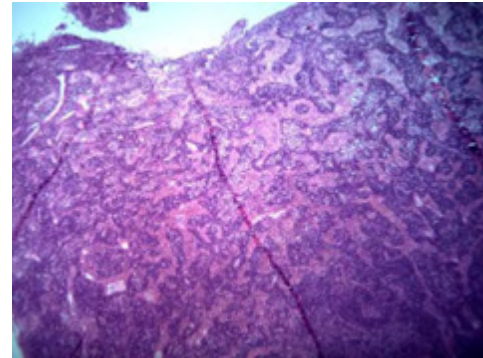
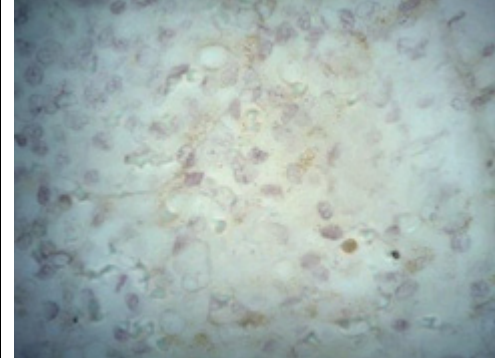


42

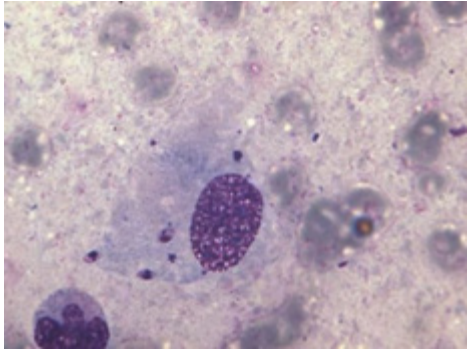


B

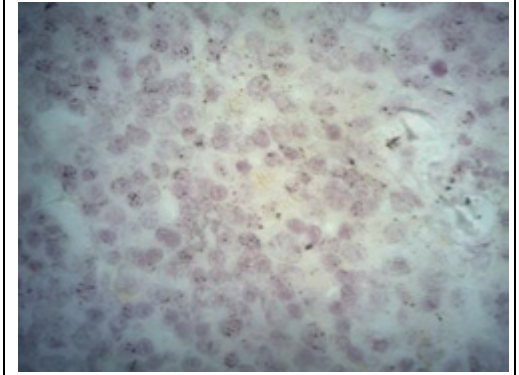
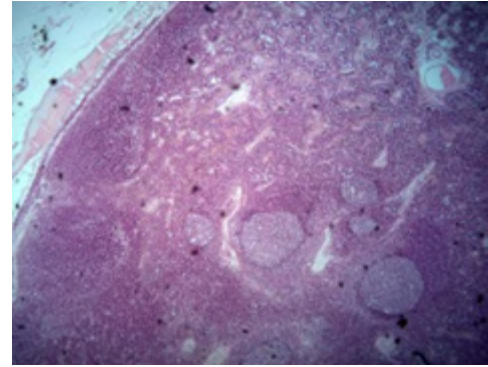
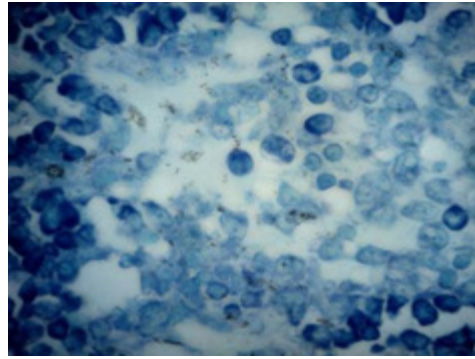


43	Ausência			
44	 <p data-bbox="392 1228 414 1252">F</p>			

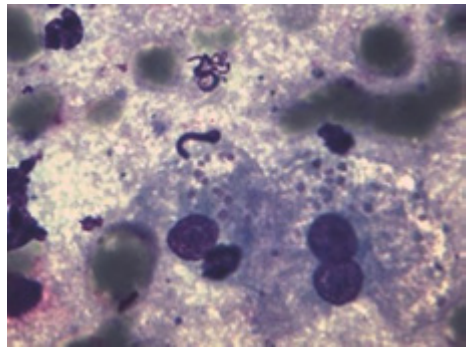
45



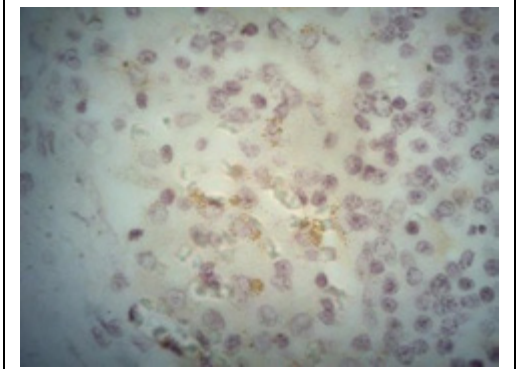
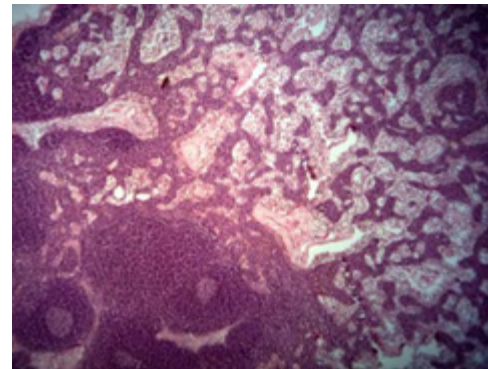
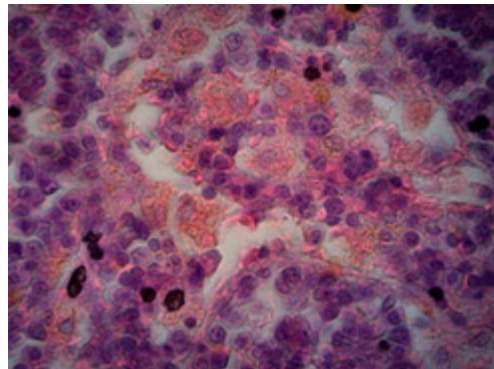
F



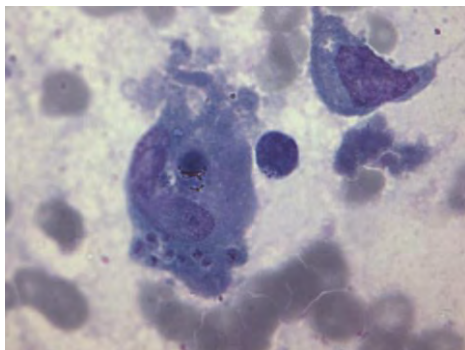
46



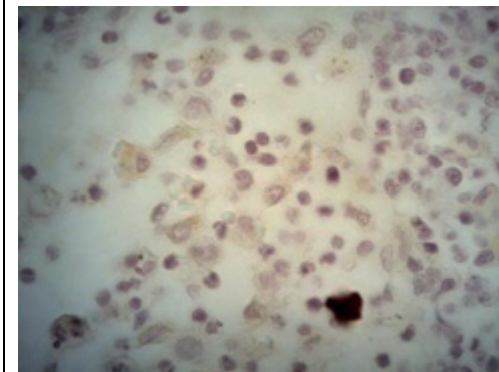
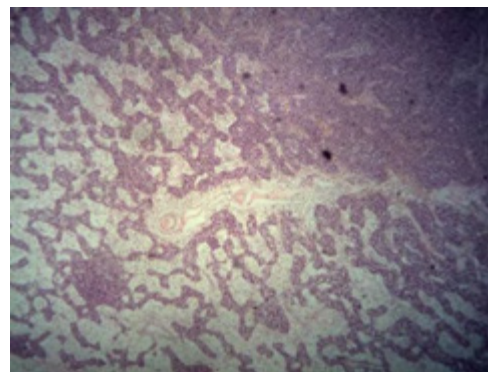
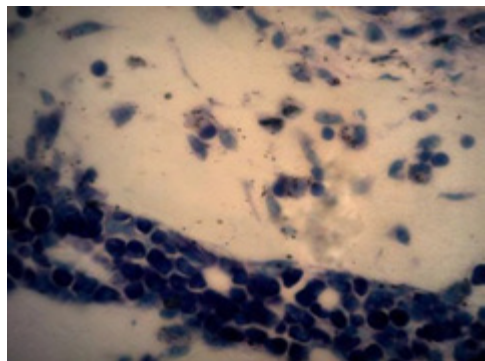
F



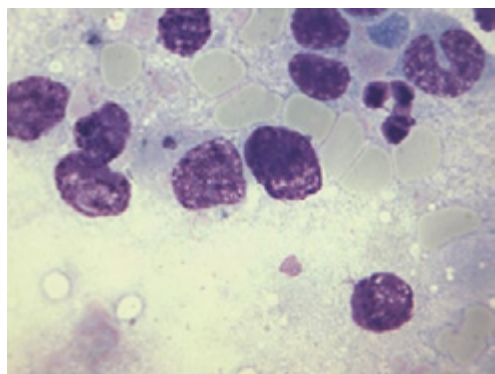
47



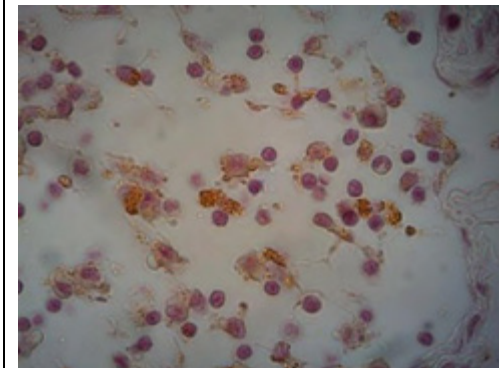
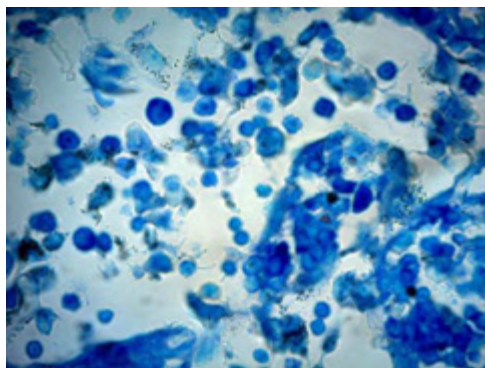
F

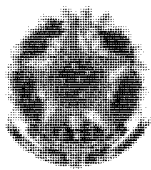


48



B





República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI 1003744-6 A2**



* B R P I 1 0 0 3 7 4 4 A 2 *

(22) Data de Depósito: 08/06/2010
(43) Data da Publicação: 14/02/2012
(RPI 2145)

(51) *Int.Cl.:*
C12N 15/30
C12N 15/52
G01N 33/535

(54) Título: E-NTPDASES RECOMBINANTES, USO NA PRODUÇÃO DE KIT DE DIAGNÓSTICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS NAS LEISHMANIOSES CAUSADAS POR ESPÉCIES DO GÊNERO LEISHMANIA

(73) Titular(es): Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG, Universidade Federal de Ouro Preto, Universidade Federal de Viçosa

(72) Inventor(es): Antonio Phelipe Carlette Zóboli, Juliana Lopes Rangel Fietto, Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo, Ronny Francisco de Souza

(57) Resumo: E-NTPDases RECOMBINANTES, USO NA PRODUÇÃO DE KIT DE DIAGNÓSTICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS NAS LEISHMANIOSES CAUSADAS POR ESPÉCIES DO GÊNERO Leishmania. Esta invenção refere-se às proteínas da família E-NTPDases recombinantes que podem ser usadas como antígenos em kits de diagnósticos das leishmanioses animais e humanas. As proteínas da família das E-NTPDases recombinantes obtidas poderão ser empregadas na produção de Kits de diagnósticos para a detecção de anticorpos nas leishmanioses, usando testes do tipo imunológicos. Estes testes podem ser aplicados em detecção de indivíduos soropositivos, em programas de controle de leishmanioses ou no diagnóstico laboratorial das leishmanioses. Estas proteínas também poderão ser usadas em ensaios prognósticos e vacinais, no desenho racional de quimioterápicos para o tratamento das leishmanioses e no desenvolvimento de anticorpos monoclonais a serem usados no diagnóstico, prognóstico ou terapia das leishmanioses.

**“E-NTPDases RECOMBINANTES, USO NA PRODUÇÃO DE KIT DE
DIAGNÓSTICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS NAS LEISHMANIOSES
CAUSADAS POR ESPÉCIES DO GÊNERO *Leishmania*”**

Campo de Aplicação da Invenção

5 As proteínas da família das E-NTPDases recombinantes obtidas, objeto de pedido de patente, serão empregadas na produção de Kits de diagnósticos para a detecção de anticorpos nas leishmanioses, testes estes do tipo imunológicos. Estes testes podem ser aplicados em detecção de indivíduos soropositivos em programas de controle epidemiológico a campo das leishmanioses ou no diagnóstico laboratorial das leishmanioses. Estas proteínas também poderão ser usadas em ensaios prognósticos, vacinais, na produção de anticorpos monoclonais e no desenho racional de drogas para a quimioterapia das leishmanioses.

Estado da Técnica

15 Sabe-se que as Leishmanioses compreendem um conjunto de enfermidades cujos agentes etiológicos são espécies do gênero *Leishmania*, que são protistas pertencentes à família Trypanosomatidae. A transmissão se dá através da picada do flebotomíio fêmea. Dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção e do tipo de hospedeiro, a leishmaniose pode ser dividida classicamente em duas formas clínicas: visceral e tegumentar ou cutânea. A forma visceral se não tratada costuma ser fatal, já as formas cutâneas, apesar de raramente evoluírem para a fatalidade são mutilantes e desagradáveis especialmente quando da existência de múltiplas lesões. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS/WHO) (WHO, 2009, http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/WHO_CDS_NTD_IDM_2007.3_eng.pdf) a leishmaniose é uma doença de caráter zoonótico que acomete o homem, uma variedade de animais silvestres e domésticos. É uma doença endêmica em 88 países distribuídos em quatro continentes. Mais de 90% dos casos de Leishmaniose cutânea ocorrem no Irã, Afeganistão, Síria, Arábia Saudita, Brasil e Peru e mais de 90% dos casos da forma visceral ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão. Ainda segundo a OMS (WHO, 2009, http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/WHO_CDS_NTD_IDM_2007.3_eng.pdf) o número de casos de leishmaniose cutânea (LC) vem crescendo no Brasil nos últimos anos (1988:

21.800 casos; 1999: 30.550 casos; 2000: 35.000 casos). Fato este relacionado ao desenvolvimento econômico e à mudança de hábitos e ambientais que expõem mais a população aos vetores da doença. Um dos principais reservatórios atualmente descrito é o cão, que por sua proximidade com o homem participa ativamente do processo de
5 manutenção da leishmaniose.

A leishmaniose canina tem se tornado foco de vários estudos visto a importância do cão como animal doméstico e a sua relevância como reservatório da doença. Porém o cão não é simplesmente um reservatório de parasitos, pois o mesmo também apresenta a patologia associada à infecção tanto na forma cutânea quanto visceral.

10 Uma das principais ações empregadas no controle da leishmaniose canina ainda é a eliminação do cão infectado devido ao insucesso da antimonioterapia. Atualmente o tratamento de cães está proibido visto que não há eficácia completa comprovada com as drogas disponíveis.

Na prática clínica, diante da suspeita de infecção os cães passam por vários testes
15 diagnósticos que são muitas vezes contraditórios e nem sempre tem uma correlação com o estado da doença no cão, dificultando o prognóstico e conseqüente tratamento. Este tipo de constatação levou ao desenvolvimento de técnicas mais específicas baseadas na amplificação de regiões de DNA do parasito por Reação em Cadeia pela Polimerase-PCR (Francino, O., Altet, L., Sanchez-Robert, E., Rodriguez, A., Solano-Gallego, L., Alberola,
20 J., Ferrer, L., Sanchez, A., Roura, X., *Veterinary Parasitology* 137: 214–221, 2006). Apesar de usualmente demonstrar alta eficiência, o ensaio de PCR tem a desvantagem de ter alto custo e falhas em relação à extração de DNA. O diagnóstico da doença em cães tem sido muito estudado, porém ainda hoje não há um método diagnóstico considerado como padrão e cada laboratório utiliza um método próprio de escolha (Da Silva E. S., Van
25 Der Meide W. F., Schoone G. J., Gontijo C. M. F., Schallig H. D. F. H., Brazil R. P., *Veterinary Research Communications* 30: 637-643, 2006). Diante disto novos métodos diagnósticos alternativos, mais eficientes, discriminatórios e rápidos são necessários.

A abordagem de proteínas recombinantes para serem usadas no diagnóstico tem sido o foco de muitos pesquisadores (S. Farajnia, B. Darbani, H. Babaei, M. H.
30 Alimohammadian, F. Mahboudi And A.M. Gavgani, *Parasitology* 135, 1035–1041, 2008; Renato Porrozzi, Marcos V. Santos da Costa, Antonio Teva, Aloísio Falqueto, Adelson L. Ferreira, Claudiney dos Santos, Ana Paula Fernandes, Ricardo T. Gazzinelli, Antonio

Campos-Neto and Gabriel Grimaldi, Jr., *Clinical And Vaccine Immunology* 14: 544–548, 2007).

As E-NTPDases são uma família específica de ecto-nucleotidases, proteínas que são descritas de maneira geral, como proteínas de membrana ecto localizadas ou solúveis (secretadas) que tem como função primária a degradação de nucleotídeos, principalmente extracelulares, tri e difosfatados (Zimmermann, H., Beaudoin, A. R., Bollen, M., Belgium, Shaker Publishing; 1–9. 1999.)

O interesse nestas enzimas se baseia em dados obtidos na literatura que sugerem a participação de ecto-nucleotidases, entre outras coisas, na virulência, infectividade e aquisição de purinas em parasitos (Barrêdo-Pinho, M., Peres-Sampaio, C. E., Chrispim, P. P. M., Belmont-Firpo, R., Lemos, A. P., Martiny, A., Vannier-Santos, M. A., Meyer-Fernandes, J. R. A *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 391:16–24, 2001). Recentemente, estudando a infecção experimental de camundongos C57BL/6 com *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, ambas causadoras de leishmaniose tegumentar, verificou-se que os animais foram capazes de controlar a infecção por *L. (V.) braziliensis*, mas não por *L. (L.) amazonensis*. A diferença de resposta à infecção foi relacionada a um estado anérgico observado nos animais infectados por *L. (L.) amazonensis* (Maioli, T. U., Erica, T., Arantes, R. M. E., Fietto, J. L. R., Afonso, L. C. C., *Parasitol Res* 94: 207-212, 2004). Além disto, foi verificado que as células intactas de *L. (L.) amazonensis* foram capazes de hidrolisar uma maior quantidade de nucleotídeos extracelulares de adenosina. Considerando que o ATP extracelular é uma molécula pró-inflamatória e que um dos produtos de sua degradação, a adenosina possui efeito imunossupressor, esta diferença poderia então levar a um efeito antiinflamatório e imunossupressor, como o observado (Maioli, T. U, Erica, T., Arantes, R. M. E., Fietto, J. L. R., Afonso, L. C. C., *Parasitol Res* 94: 207-212, 2004). Esta foi a primeira evidência da participação de ecto-nucleotidases de um parasita no controle da resposta imunológica do hospedeiro.

Na busca feita junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI foram encontradas solicitações de patentes nas áreas de imunoterapia e imunodiagnóstico, porém nenhuma destas patentes utiliza produtos relacionados ao objeto desta patente. Nesta busca foi encontrado o documento de patente PI 9406509, que refere-se a “COMPOSTOS, PROCESSO, SUA PREPARAÇÃO, USO DOS MESMOS, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E PROCESSO PARA PROFILAXIA E PARA TRATAMENTO TERAPÊUTICO DE MALÁRIA E DOENÇAS CAUSADAS POR LEISHMANIA,

TOXOPLASMA GONDII, PNEUMOCY”, onde se descreve o pirrol-amidínicos de fórmula geral e os sais farmacêuticamente aceitáveis dos mesmos, processos para a preparação e composições farmacêuticas contendo-os úteis como antivirótico e antiparasítico. Este documento versa então sobre o uso de formulações farmacêuticas derivadas de compostos pirrol-amidínicos para tratamento e prevenção das leishmanioses. O objeto do pedido de patente em questão é diferente da patente descrita, pois utiliza proteína recombinante para ser usada em diagnóstico, prognóstico, desenvolvimento de anticorpos monoclonais, vacinação e desenvolvimento de quimioterápicos para as leishmanioses. Não há inter-relação entre os mesmos. Porém é importante salientar que no caso de doenças infecciosas é desejável que se tenham métodos alternativos de diagnóstico, prevenção e tratamento visto que existe uma diversidade muito grande de resposta a quimioterapia e vacinação das populações dos hospedeiros, bem como diferentes susceptibilidades a drogas e produção de resposta imune protetora em relação aos parasitos.

Outro depósito encontrado foi o de nº PI 9807332 que trata de “ANTÍGENOS DE LEISHMANIA PARA UTILIZAÇÃO NA TERAPIA E DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE” onde são demonstradas composições e processos para prevenir, tratar e detectar leishmaniose e estimular respostas imunes em pacientes. A presente invenção não tem sobreposição com esta patente, embora ambas visem aplicações em comum. Os antígenos apresentados na patente PI 9807332 são distintos das proteínas antigênicas desta patente. A aplicação em mesma área se justifica como descrito no item anterior, além disto, a própria patente em questão salienta a necessidade de desenvolvimento de alternativas no diagnóstico, tratamento e profilaxia das leishmanioses que são causadas por mais de 20 espécies diferentes de *Leishmania*.

O depósito de nº 2133236A1 feito no banco da Espanha refere-se a “GEN QUIMÉRICO FORMADO POR LAS SECUENCIAS DE DNA QUE CODIFICAN LOS DETERMINANTES ANTIGÊNICOS DE CUATRO PROTEÍNAS DE *L. infantum*, APLICABLE PARA EL DIAGNÓSTICO SEROLOGICO DE LEISHMANIOSIS CANINA Y PROTEÍNA OBTENIDA” onde se descreve os determinantes antigênicos de quatro proteínas de *L. infantum* (LiP2a, LiP2b, LiP2A, LiP0), que foram aplicadas em diagnóstico de Leishmaniose. Os objetos desta patente são proteínas distintas daquelas que estão sendo patenteadas neste processo, portanto como justificado anteriormente apesar da aplicação poder ser a mesma os antígenos são diferentes. No caso das Leishmanioses,

como dito anteriormente, é importante que se tenham proteínas alternativas para serem usadas em diagnóstico, profilaxia e tratamento, visto que existe grande diversidade de parasitos e hospedeiros.

É um primeiro objetivo da presente invenção, fornecer as proteínas da família das E-NTPDases recombinantes de três espécies de *Leishmania* (*Leishmania major*,
5 *Leishmania braziliensis*, *Leishmania infantum*) homóloga à sua proteína natural, para ser utilizada como antígeno em kits de diagnóstico das leishmanioses.

É objetivo também da presente invenção usar as ditas proteínas e suas variantes, modificadas em suas sequências de aminoácidos, que conservem suas propriedades
10 antigênicas, para o uso em diagnóstico, compostos vacinais, desenvolvimento de anticorpos, marcadores de prognóstico e no desenho racional de drogas inibidoras das E-NTPDases que possam ser usadas na quimioterapia das leishmanioses.

O desenvolvimento de compostos antigênicos capazes de aumentar a eficiência no diagnóstico e efetivação como agente vacinal tem sido busca no âmbito geral da pesquisa
15 em leishmaniose. A proteína GDPase recombinante, conforme visto na Figura 5, aponta como um potente antígeno. O antígeno quando utilizado em diagnóstico em teste de ELISA, foi capaz de discriminar de maneira satisfatória soros de cães contaminados com *Trypanossoma cruzi* dos contaminados com *Leishmania sp.* Desse modo o investimento neste antígeno recombinante como alvo para produção de kit de diagnóstico, bem como
20 para as outras aplicações é muito promissor.

Descrição da Invenção

O primeiro objetivo da presente invenção é alcançado através das proteínas da família das E-NTPDases expressas de forma recombinante, sendo as sequências SEQ. ID. N° 1, SEQ. ID. N° 2, SEQ. ID. N° 3, SEQ. ID. N° 4, SEQ. ID. N° 5, SEQ. ID. N° 6, SEQ.
25 ID. N° 7, SEQ. ID. N° 8, SEQ. ID. N° 9, SEQ. ID. N° 10, SEQ. ID. N° 11 e SEQ. ID. N° 12 utilizadas como antígeno.

O segundo objetivo da presente invenção é usar as ditas proteínas e suas variantes, modificadas em suas sequências de aminoácidos, que conservem suas propriedades antigênicas, para o uso em diagnóstico, compostos vacinal, marcador de prognóstico,
30 produção de anticorpos monoclonais e desenvolvimento de quimioterápicos para as leishmanioses.

A presente invenção será, a seguir, detalhadamente descrita.

Figura 1.1 – ilustra o esquema do vetor de expressão pET 21b para sistema de expressão em *Escherichia coli* e do cassete de expressão de DNA.

Figura 1.2 - ilustra o inserto de DNA, no caso o gene gi_|15487213|, que foi clonado entre os sítios de restrição BamHI e Sall.

5 Figura 2.1 – ilustra a comparação das sequências das E-NTPDases de espécies do gênero *Leishmania*. As regiões marcadas com quadros amarelos representam as regiões conservadas das E-NTPDases.

Figura 2.2 – idem a Figura 2.1, continuação.

Figura 3 – a parte A ilustra uma foto de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10%,
10 mostrando proteínas de um lisado de *E. coli* BL21 (DE3) transfectadas com plasmídeo contendo o gene da GDPase de *Leishmania major* expresso em diferentes tempos. A primeira coluna mostra uma proteína NTPDase recombinante de *Trypanosoma cruzi*. As próximas 8 linhas mostram os produtos dos lisados de bactérias após 2 a 4 h de indução com IPTG nas concentrações de 1 mM, 0,8 mM, 0,6 mM, 0,4 mM, 0,3 mM, 0,2 mM, 0,1
15 mM e sem indução respectivamente. Os números correspondem aos mostrados por marcador de massa molecular (kDa). A parte B ilustra um resultado de Western blot mostrando a proteína GDPase de *Leishmania major* do lisado de *E. coli* reagindo com anticorpos do soro de coelhos imunizados com a NTPDase recombinante de *T. cruzi*. As linhas de 1 a 8 mostram a reação da proteína GDPase com o soro de coelhos imunizados
20 com NTPDase de *T. cruzi*. A linha 9 mostra ausência de bandas quando não havia indução da proteína GDPase recombinante. A seta indica a reação da proteína com os anticorpos mostrando uma banda de aproximadamente 78 kDa.

Figura 4 – Ilustra uma foto de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10% mostrando a proteína GDPase de *Leishmania major* expressa em *E. coli* BL21 (DE3) após a
25 purificação por cromatografia de afinidade em coluna de Níquel-agarose. A proteína GDPase recombinante de *Leishmania major* pode ser observada nas colunas 10 e 11, após ter sido recuperada em tampão contendo 80 mM e 160 mM imidazol respectivamente. Os números correspondem aos mostrados por marcador de massa molecular (kDa). A proteína GDPase recombinante de *Leishmania major* possui 78,2 kDa.

30 Figura 5 – gráfico que ilustra o resultado de diagnóstico imunológico por ELISA em que se utilizou como antígeno a proteína GDPase recombinante de *Leishmania major* purificada nas concentrações de 1,5, 3, 4,5 e 30 µg/ml e como controle foi utilizado o

extrato total de *Leishmania* sp. lisada na concentração de 3 µg/ml, referenciadas pelos números 1, 2, 3, 4 e 5 respectivamente. Foram testados 8 soros de cães domésticos (*Canis familiaris*) na diluição de 1: 80. Sendo 3 soros de cães sabidamente positivos para *Leishmania* sp. (L+), 3 soros de cães sabidamente negativos para infecção por *Leishmania* sp. (L-) e 2 soros de cães sabidamente positivos para infecção por *T. cruzi*.

Figura 6 – gráfico que ilustra o resultado de diagnóstico imunológico por ELISA utilizando como antígeno a proteína GDPase recombinante de *Leishmania major* na concentração 1,5 µg/ml. Foram utilizadas 169 amostras de soros de cães, sendo 117 sabidamente positivas e 52 sabidamente negativas.

10 Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção se refere às proteínas da família E-NTPDase recombinantes de *Leishmania major*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*, obtidas a partir da sequência nucleotídica dos genes codificantes destas proteínas com modificações destinadas a aplicações antigênicas, as quais após etapas de preparação de primers para amplificação dos genes alvos, amplificação dos genes codificantes dessas proteínas e clonagem em vetor de expressão, é finalmente expressa e posteriormente purificada por cromatografia de afinidade por Níquel. As ditas proteínas recombinantes assim purificadas podem ser usadas de forma satisfatória no imunodiagnóstico por ELISA e Western-blot, como demonstrado pelo uso da isoforma recombinante GDPase de *L. major* aplicada ao diagnóstico da Leishmaniose canina.

A presente invenção se refere às proteínas da família E-NTPDases recombinantes identificadas como SEQ. ID. Nº 1, SEQ. ID. Nº 2, SEQ. ID. Nº 3, SEQ. ID. Nº 4, SEQ. ID. Nº 5, SEQ. ID. Nº 6, SEQ. ID. Nº 7, SEQ. ID. Nº 8, SEQ. ID. Nº 9, SEQ. ID. Nº 10, SEQ. ID. Nº 11 e SEQ. ID. Nº 12 as quais poderão ser utilizadas como antígenos em diagnóstico das leishmanioses.

A SEQ. ID. Nº 2 derivada do gene codificante da GDPase de *L. major*, apresenta uma identidade de aminoácidos de 93,74% em relação à proteína GDPase natural de *Leishmania major* quando se compara a mesma com relação aos trechos disponíveis no GenBank de 690 aminoácidos predita pelo acesso gi_[15487213]. Adicionalmente a GDPase de *L. infantum* (SEQ ID. Nº 6) e *L. braziliensis* (SEQ ID. Nº 4) apresentam identidade de 84,49% e 65,75% respectivamente em relação à GDPase recombinante de *L. major*, conforme visualizado na Tabela 1. Esta alta identidade mostra que são proteínas similares, da mesma família. Esta similaridade é suficiente para haver reatividade

imunológica cruzada sendo possível utilizar todas estas variantes nas mesmas aplicações descritas para a GDPase, ou seja, diagnóstico, prognóstico e vacinação para as leishmanioses. O mesmo ocorre para as variantes denominadas nucleosídeo difosfatases (NTPDases, descritas como SEQ ID. N° 8, SEQ ID. N° 10 e SEQ ID. N° 12), que apesar de apresentarem menor identidade comparativamente (Tabela 1) apresentam domínios conservados, conforme mostrado nas Figuras 2.1 e 2.2. Sendo assim, as NTPDases recombinantes também são objetos deste pedido de patente e poderão ser usadas nas mesmas aplicações, ou seja, no diagnóstico, prognóstico, vacinação, desenvolvimento de monoclonais e quimioterápicos para as leishmanioses.

Tabela 1 - Relação de Similaridade e Identidade da sequência de aminoácidos da proteína GDPase de *L. major* recombinante modificada com as demais sequências de aminoácidos das E-NTPDases de diferentes espécies de *Leishmania*.

		1	2	3	4	5	6	7
Proteína GDPase recombinante	1		93,74	84,49	65,75	23,09	23,09	22,13
<i>L. major</i> GDPase	2	674		90,10	67,86	24,49	24,49	23,48
<i>L. infantum</i> GDPase	3	610	610		69,15	23,67	23,52	22,94
<i>L. braziliensis</i> GDPase	4	478	473	482		22,22	22,22	21,52
<i>L. major</i> NTPDase	5	169	169	164	158		92,00	77,88
<i>L. infantum</i> NTPDase	6	169	169	163	158	391		79,29
<i>L. braziliensis</i> NTPDase	7	162	162	159	153	331	337	

Números de 1 a 7 na horizontal representam as respectivas proteínas da vertical. Onde os números se cruzam fornece a identidade no quadrante de cima e similaridade no de baixo.

10 O gene natural das GDPase de *Leishmania major*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* estão disponíveis no GenBank sob os acessos gi_|15487213|, XP_001562788, XP_001463665 respectivamente. O gene de *Leishmania major* possui uma sequência de 2073 nucleotídeos que codifica uma proteína de 690 aminoácidos. O gene de *Leishmania braziliensis* possui uma sequência de 2076 nucleotídeos que codifica uma proteína de 691 aminoácidos. O gene de *Leishmania infantum* possui uma sequência de 2034 nucleotídeos que codifica uma proteína de 677 aminoácidos. As sequências de nucleotídeos recombinantes em relação às naturais apresentam modificações na porção

aminoterminal e carboxiterminal. À porção aminoterminal foram adicionados 42 pares de bases. Na porção carboxiterminal foi removido os três últimos nucleotídeos (códon de parada) e adicionado 45 pares de base. As proteínas recombinantes preditas de *Leishmania major*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*, possuem 719, 720 e 706 aminoácidos respectivamente (SEQ. ID N° 2, SEQ. ID N° 4 e SEQ. ID N° 6).

O gene natural das NTPDase de *Leishmania major*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* estão disponíveis no GenBank sob os acessos XP_001681917, XP_001562178, XM_001464304 respectivamente. Ambas as espécies possuem uma sequência de 1278 nucleotídeos que codifica 425 aminoácidos. A sequência de nucleotídeos recombinantes em relação ao natural apresenta modificações na porção aminoterminal e carboxiterminal. À porção aminoterminal foram adicionados 42 pares de bases. Na porção carboxiterminal foram removidos os três últimos nucleotídeos (códon de parada) e adicionados 45 pares de base, exceto em *Leishmania major* que foram adicionados somente 39 pares de base. Esta diferença se deve ao uso de diferentes sítios de restrição usados no processo de clonagem gênica. As proteínas recombinantes preditas de *Leishmania major*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*, possuem 452, 454 e 454 aminoácidos respectivamente (SEQ. ID N° 8, SEQ. ID N° 10 e SEQ. ID N° 12).

A presente invenção ainda se refere ao uso da proteína GDPase recombinante em kit de diagnóstico para as leishmanioses causadas por espécies do gênero *Leishmania*, compreendendo as E-NTPDases recombinantes, tal como mencionado acima, que são capazes de interagir com anticorpos específicos em amostras de soros ou sangue ou outros líquidos ou amostras de indivíduos sendo capazes de indicarem a infecção nestes indivíduos humanos ou animais.

A seguir serão descritos experimentos de demonstração que permitirão ilustrar a potencialidade da presente invenção. Resumidamente estes experimentos se baseiam em amostra contendo *Leishmania major* que foi submetida à extração de seu material genômico para isolamento do gene específico codificante da GDPase. Posteriormente a isso, foi feita a amplificação do gene específico por PCR sendo esse clonado em vetor de clonagem e expressão, o qual foi utilizado na transformação de células de *Escherichia coli* que passaram a expressar a proteína GDPase recombinante do protozoário. A proteína GDPase de *Leishmania major*, após purificação foi utilizada como antígeno em testes de ELISA em soros de cães visando à pesquisa de anticorpos da classe IgG contra espécies do gênero *Leishmania*. Esta proteína GDPase recombinante de *Leishmania major*,

produzida em larga quantidade, poderá ser amplamente distribuída a laboratórios por todo país e desta forma, contribuir de forma relevante para o diagnóstico sorológico das leishmanioses no Brasil ou no exterior, ou ainda ser usada em kits e aplicações imunológicas vacinais e de produção de anticorpos. Todos os processos descritos neste documento se estendem também as outras isoformas das E-NTPDases das outras espécies de *Leishmania* descritas nas seqüências SEQ. ID. Nº 3, SEQ. ID. Nº 4, SEQ. ID. Nº 5, SEQ. ID. Nº 6, SEQ. ID. Nº 7, SEQ. ID. Nº 8, SEQ. ID. Nº 9, SEQ. ID. Nº 10, SEQ. ID. Nº 11 e SEQ. ID. Nº 12 as quais poderão ser também utilizadas como antígenos em diagnóstico das leishmanioses.

10 Experimentos De Demonstração

Isolamento e Clonagem da região codificante da GDPase de *Leishmania major*

A cepa utilizada para extração genômica foi a MHOM/IL/80/Friedlin de *Leishmania major*. Para a extração de DNA genômico (DNAg) aproximadamente 1×10^8 células foram recolhidas por centrifugação a $13.000 \times g$ por 2 a 3 min, descartando o sobrenadante foi adicionado 500 a 700 μL de fenol equilibrado ao “pellet” e deixado a temperatura ambiente (T. A.) por 5 a 10 min. Em seguida foi adicionado de 200 a 400 μL de 10 mM Tris (pH 8,0) estéril e homogeneizado no vortex. O homogeneizado foi submetido à centrifugação a $13.000 \times g$ por 10 a 12 min e recuperado a fase aquosa sem a interface. A essa foi adicionada de 200 a 400 μL de uma mistura de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e homogeneizada no vortex. O homogeneizado foi submetido à centrifugação a $13.000 \times g$ por 10 a 12 min e recuperada a fase aquosa sem a interface. A essa foi adicionada de 200 a 400 μL de clorofórmio e homogeneizado no vortex. Sendo posteriormente centrifugada a $13.000 \times g$ por 10 a 12 min e recuperada a fase aquosa como descrito anteriormente. Em seguida, foi adicionado 1/10 do volume de uma solução de 3 M de acetato de sódio (pH 5,2) e dois volumes de etanol 100% gelado homogeneizando sem vortexar. O homogeneizado foi deixado precipitando por 2 a 3 h no freezer $-80 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo posteriormente centrifugado a $13.000 \times g$ por 20 a 30 min a 4°C . O sobrenadante foi descartado, adicionando ao precipitado de 250 a 500 μL de etanol 70% gelado e a amostra foi centrifugada a $13.000 \times g$ por 5 a 10 min a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o “pellet” colocado para secar com a tampa do frasco aberta. Posteriormente o “pellet” de DNA seco foi suspenso em 50 a 60 μL de 10 mM Tris (pH 8,0) estéril. O DNA genômico foi estocado a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ e utilizado para isolamento da região codificante do

gene da GDPase (gi_|15487213|) contendo 2073 pares de bases por reação da polimerase em cadeia (PCR).

Para tanto foram utilizados o oligonucleotídeo direto 5'CGGGATCCCATGCCAATGACTGACG3' que anela no genoma de *Leishmania major* e insere um sítio de restrição para BamH I na extremidade 5' para inserção posterior no vetor de expressão em bactéria pET-21b e oligonucleotídeo reverso 5'GCGTCGACGGTAAGAGAGAGGAGTGA3', que cria um sítio para Sal I no final da região codificante. Para amplificação do gene foi usado um aparelho termociclador (Programmable Thermal Controller-PTC-100™). A reação foi realizada em um volume total de aproximadamente 50 µL, utilizando 4 µL do DNAG; 5,0 µL de tampão 1,5 mM MgSO₄ (fornecido pelo fabricante da Taq DNA Polimerase); 2,4 µL do mix de 2,5mM dNTPs (dCTP, dTTP, dGTP, dATP); 2 µL dos oligonucleotídeos em uma concentração de 20 pmol/µL; 0,5 µL de Taq DNA Polimerase e água ultrapura estéril qsp. O programa utilizado consistiu em 33 ciclos: 94 °C por 4 min; 94 °C por 30 seg; 50 °C por 1 min; 72 °C por 1 min; 72 °C por 5 min; 4 °C até retirada dos tubos. Os produtos finais das reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em 1X TAE (1 mM EDTA; 40 mM Tris-Acetato; em água deionizada) e corado em solução de brometo de etídio (Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T., 1989), para a verificação da formação de uma banda majoritária correspondente ao tamanho do amplicon alvo com aproximadamente 2,1 kb. A eletroforese foi feita a aproximadamente 80 V, utilizando como tampão de corrida TAE. A banda de cerca de 2,1 kb foi purificada do gel de agarose utilizando o Kit "PureLink™ Quick Gel Extraction" (invitrogen™) conforme instruções do fabricante. Foi utilizado o sistema TOPO (Invitrogen™) para a subclonagem inicial do gene.

A banda do amplicon foi suspensa em um volume total de aproximadamente 20 µL de água ultra-pura estéril e 5 a 10 µL desta solução foi usada na ligação feita a aproximadamente 16 °C por 10 a 12 h, de acordo com manual do fabricante (TOPO® TA Cloning® Kit for subcloning - Invitrogen). A mistura de ligação (~6 µL) contendo vetor TOPO + amplicon da GDPase, foi adicionada a aproximadamente 100 µL de solução contendo bactérias *E. coli* TOP 10F', previamente tornadas competentes (Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). A mistura foi incubada em gelo por 45 a 60 min, submetida a choque térmico (42 °C) por 1 a 5 min e colocada novamente no gelo. Adicionaram-se 1 a 5 mL de LB-Líquido (1% triptona, 0,5 % extrato de levedura, 1% NaCl, pH 7.5) seguido de incubação a 37 °C por 40 min com

agitação de 180 rpm em Shaker TE-420. O volume total dessa mistura foi dividido em três alíquotas e plaqueado em meio sólido LB-Agar (1% triptona, 0,5 % extrato de levedura, 1% NaCl, 1,5% select Agar pH 7.5) contendo ampicilina (5 a 10 mg/mL⁻¹) e incubadas por 12 a 14 h a 37 °C.

5 Os clones resistentes a ampicilina foram recuperados e utilizados para confirmação da presença do plasmídeo contendo o gene de interesse por PCR e análise de restrição (utilizando *BamH* I e *Sal* I) a partir do plasmídeo extraído por minipreparação plasmidial de acordo com (Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Um dos clones isolados e confirmado foi então submetido a
10 sequenciamento automático parcial usando iniciadores flanqueadores da região de clonagem em aparelho Mega-Bace de acordo com instruções do fabricante. Os clones que continham a construção foram estocados em meio LB-líquido em tubos de microcentrífuga com 20% de glicerol e mantidos a -80 °C.

Extração do DNA plasmidial

15 O DNA plasmidial (DNAP) foi extraído pelo método da lise alcalina (Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) como descrito a seguir. Para isso, os clones positivos da transformação com o vetor TOPO, foram crescidos em tubos de rosca individuais contendo 3 mL de LB e 30 µL de ampicilina (5 a 10 mg/mL⁻¹) por 12 a 14 h a 37 °C em 180 a 200 rpm. Após o crescimento um volume de
20 1,5 mL de cada cultura foi transferido para tubos de microcentrífuga, e as células foram coletadas por centrifugação (Centrífuga 5415C- EPPENDORF) a 12000 x g por 1 a 5 min. O sedimento celular foi lavado com 0,5 a 1 mL de STE (0,1 NaCl, 10 mM Tris.Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0) para retirada de inibidores de endonucleases. Após a centrifugação foram adicionados de 200 a 300 µL da solução I (25 mM Tris.Cl pH 8.0, 10 mM de EDTA e
25 5mM de D-Glicose) gelada e suspenso vagarosa e completamente o “pellet”. Em seguida foram adicionados de 200 a 300 µL da solução II (NaOH 0,2M, SDS 1%) preparada na hora, e os tubos foram invertidos lentamente por 6 a 10 vezes e mantidos no gelo por 5 a 10 min. Após isso, 150 a 300 µL da solução III (3 M Kac, 2 M Hac pH 8.0) gelada foram adicionados e os tubos foram invertidos lentamente 6 a 10 vezes e mantidos no gelo por 5
30 min. Em seguida os tubos foram centrifugados por 12000 x g por 5 a 10 min e transferidos os sobrenadantes para outros tubos novos onde foram adicionados 5 µL de RNase A (10 µg/uL) e mantidos os tubos a 37 °C em banho-maria por 30 a 50 min.

A cada tubo foram adicionados 550 a 700 μ L de fenol: clorofórmio (1:1), e os tubos foram invertidos lentamente por cerca de 5 a 10 vezes e centrifugados a 12000 x g por 5 a 10 min. Esse procedimento se repetiu mais uma vez. A fase aquosa foi transferida para tubos novos. Em seguida adicionou-se 550 a 700 μ L de clorofórmio e foi realizada
5 nova centrifugação a 12000 x g por 5 a 10 min. A fase superior foi transferida para novos tubos, onde foram adicionados 550 a 700 μ L de isopropanol gelado. Os tubos foram invertidos lentamente e mantidos a -70 °C por 10 a 20 min. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 5 a 10 min, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram colocados para secar por 30 a 50 min sobre papel toalha. O precipitado foi lavado com 200
10 a 400 μ L de etanol 70% gelado e centrifugado a 12000 x g por 5 a 10 min. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram colocados para secar por 30 a 50 min. Após estar secos, o DNA plasmidial foi suspenso em 20 a 30 μ L de H₂O deionizada. Os clones foram selecionados por análise de restrição utilizando *BamH* I e *Sal* I e confirmados por sequenciamento parcial.

15 **Transferência da região codificante da proteína GDPase recombinante para vetor de expressão em sistema procarioto pET-21b**

O vetor de amplificação TOPO contendo o gene, foi submetido à digestão com *BamH* I e *Sal* I. Após a digestão, a mistura do vetor TOPO foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1%.

20 O inserto relativo à região codificante completa da GDPase foi purificado com kit “PureLink™ Quick Gel Extraction” (Invitrogen™) e ligado, de forma análoga a descrita na subclonagem em TOPO, no vetor pET-21b previamente digerido com as mesmas enzimas e purificado também pelo mesmo kit. A Figura 1.2 mostra um esquema da construção pET-21b-GDPase.

25 Bactérias *E. coli* TOP 10F⁺, previamente tornadas competentes como descrito acima, foram transformadas com o produto de ligação e foram incubadas em meio líquido LB conforme descrito acima (isolamento do clone contendo o TOPO). A seleção dos clones foi feita por análise de restrição e sequenciamento. Os clones positivos foram estocados em tubos de microcentrifuga, contendo 15 a 30 % de glicerol, e mantidos a
30 temperatura de -70 °C.

Expressão da proteína GDPase recombinante e análise em gel de SDS

A expressão total das proteínas recombinantes foi feita, em média escala, em 250 mL de LB. O cassete de expressão do vetor pET-21b, destacando os sítios de clonagem e sequência de 6 resíduos de histidina na porção carboxi-terminal da proteína recombinante, está esquematizado na Figura 1.2.

5 Bactérias competentes, da linhagem *E. coli* BL21(DE-3), foram transformadas com a construção pET-21b-GDPase, de modo análogo ao realizado com vetor TOPO. O gene gi_15487213 codifica um RNAm para a produção de uma proteína de 78,2 kDa cuja sequência de aminoácidos predita está descrita na SEQ. ID. N° 2.

10 Um total de 45 nucleotídeos extra, correspondentes a 15 aminoácidos a mais na extremidade carboxi-terminal da proteína recombinante foram adicionados à proteína final pela ligação do gene alvo com o vetor pET-21b, que codifica 9 aminoácidos de ligação entre a proteína GDPase e a cauda de hexa-histidina mais 6 de histidinas. Na porção aminoterminal um total de 14 aminoácidos foram inseridos.

15 Em seguida, realizou-se um pré-inoculo em 5 a 7 mL de meio líquido LB contendo 50 µL de ampicilina (5 a 10 mg/mL⁻¹) a partir do clone preservado em glicerol. Este pré-inoculo foi incubado por 16 a 20 h a 37 °C sob agitação. Uma alíquota de 2,5 a 5 mL de cultura foi coletada e inoculada em um volume total de 250 mL de LB-líquido contendo 2,5 mL de ampicilina (5 a 10 mg/mL⁻¹). Essa mistura foi incubada a 37 °C sob agitação e o crescimento celular foi acompanhado pela leitura de sua DO₆₀₀ (densidade ótica). Para 20 indução da proteína recombinante modificada usou-se IPTG (isopropyl β-D-thiogalactopyranoside). No momento em que a DO₆₀₀ atingiu cerca de 0,6 a 0,8, foram adicionados aos tubos de cada clone aproximadamente 0,3 mM de IPTG. A incubação prosseguiu por 2 a 4 h a 37 °C sob agitação.

25 Após a indução a cultura foi centrifugada 3000 x g e o sedimento obtido foi mantido no gelo por 15 a 30 min e suspenso em tampão de lise (50 mM Tris (pH 8.0), 300 mM NaCl, em água destilada), na proporção de 3 a 5 mL por grama de sedimento, contendo 30 a 50 µL de PMSF (100 mg/mL), 50 a 100 µL de aprotinina (1 mg/mL), 50 a 100 µL de pepstatina (1 mg/mL). Em seguida foi adicionado 1 a 5 mg/mL de lisozima e manteve-se no gelo por 30 a 50 min.

30 Procedeu-se então o rompimento final das células por sonicação por 6 a 10 vezes por 10 a 20 segundos na potência 200 W com intervalo de 10 a 20 segundos no gelo entre cada sonicação. Em seguida adicionou-se 0,1% Triton e o material foi centrifugado por 30 a 50 min a 20400 x g a 4 °C, sendo armazenado tanto o “pellet” (fração insolúvel) quanto

o sobrenadante (fração solúvel) a - 20 °C para posterior purificação da proteína recombinante.

Para determinar a melhor concentração do IPTG a ser usada como padrão para expressão da proteína recombinante, as colônias foram inoculadas em 4 mL de meio líquido LB contendo 40 µL de ampicilina (5 a 10 mg/mL⁻¹) e incubadas a 37 °C por 12 a 14 h sob agitação. Uma alíquota de 250 a 500 µL de cultura foi coletada e diluída para um volume total de 5 a 10 mL em 11 tubos. Essa mistura foi incubada a 37 °C sob agitação e o crescimento celular foi acompanhado pela leitura de sua DO₆₀₀.

Quando a cultura atingiu DO₆₀₀ de aproximadamente 0,6 a 0,8, alíquotou-se 1 a 5 mL da cultura (controle não induzido), em seguida foram adicionados aos outros tubos, IPTG na concentração seriada de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1 mM. A incubação prosseguiu por 2 a 4 h a 37 °C sob agitação. Ao final deste tempo 1 mL de cada cultura foi coletado (controles induzidos) e feita a leitura de DO₆₀₀. As amostras (controles induzidos e não induzido) foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o sedimento bacteriano misturado com tampão de amostra de SDS-PAGE (62,5 mM Tris.HCl pH 6.8, 10% SDS, 0,01% azul de bromofenol (ABF), 10% glicerol e 20 mM de β-mercaptoetanol). As amostras foram aquecidas a 100 °C por 5 a 10 min. Os lisados bacterianos foram analisados por SDS-PAGE 10% de acordo com Laemmli, U. K., *Nature*, 227(259): 680-5, 1970. Foi utilizado o sistema de eletroforese vertical Mini-PROTEAN® (BIO-RAD) pequeno (1mm de espessura). As amostras foram aplicadas na DO₆₀₀ 3,0 a 5,0, para um volume total de 20 µl por canaleta, e após a eletroforese o gel foi corado com Comassie blue. O padrão de peso molecular utilizado foi o PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Figura 3, na parte A).

Purificação da proteína GDPase recombinante e análise em gel de SDS

Para purificação da proteína recombinante foram empregadas as amostras do sobrenadante (solúvel). Estas amostras foram mantidas sobre agitação na presença de 500 a 700 µL da resina HIS-Select™ Nickel Affinity Gel devidamente preparada segundo o fabricante, em tubos de 15 mL por 1 a 3 horas a 4 °C. Posteriormente o material foi passado em uma coluna, contendo lã de vidro na extremidade abaixo para impedir perda da resina, e as proteínas não ligadas à coluna foram recuperadas no volume separado da resina. O fluxo foi dependente somente da pressão atmosférica não sendo padronizado.

Após a saída de todo material líquido visível da coluna, manualmente preparada pela imobilização da resina de afinidade a uma seringa de 10 mL, a esta foi adicionado um

volume de 2 a 4 mL de tampão de lavagem 1 (50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl₂, 5 mM MgCl₂). Esse procedimento se repetiu por 2 a 4 vezes. Em seguida foi adicionado um volume de 2 a 4 mL de tampão de lavagem 2 (50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl₂, 5 mM Imidazol, 5 mM MgCl₂). Esse procedimento foi repetido por 2 a 4 vezes. Em seguida foi
5 adicionado um volume de 2 a 4 mL do tampão de lavagem 3 (50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl₂, 10 mM Imidazol, 5 mM MgCl₂). Esse procedimento foi repetido por 2 a 4 vezes. Posteriormente as proteínas mais fortemente ligadas à resina foram eluídas em tampão de eluição. Um volume de 1,5 a 3 mL do tampão de eluição 1 (50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl₂, 80 mM Imidazol, 5 mM MgCl₂), foi adicionado. Após término desta
10 eluição, um volume de 1 a 3 mL do tampão de eluição 2 (50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl₂, 160 mM Imidazol, 5 mM MgCl₂) e finalmente um volume de 1 a 3 mL de tampão de eluição 3 (50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl₂, 250 mM Imidazol, 5 mM MgCl₂) se procedeu como o primeiro. O processo de eluição 3 se repetiu por mais uma vez. As amostras de todos os passos de purificação foram coletadas em tubos de microcentrifuga e
15 estocadas a 4°C e analisadas em gel de SDS 10% corado com Comassie blue. As amostras foram aplicadas em um volume total de 20 µl (Figura 4).

Western Blot

Várias amostras do processo de purificação foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE 10% e transferidas sob corrente elétrica para membrana de nitrocelulose sob a
20 condição de transferência de 200-250 mA por 2 a 4 h em sistema de transferência vertical Mini-PROTEAN[®] 3 Cell Assembly Guide. Após a transferência a membrana foi corada com Ponceau S (Ponceau 0,2% em ácido acético 1,0%) por 10 a 30 min para visualização das bandas protéicas e marcação da região das bandas do padrão de massa molecular. Em seguida a membrana foi descorada com água destilada e colocada em solução de bloqueio
25 com incubação por 1 a 3 hora em temperatura ambiente utilizando o tampão TBS-T (0,01 M Tris; 0,14 M NaCl; 0,1% Tween 20) contendo 5% de leite desnatado.

Posteriormente a membrana passou por uma rápida lavagem em tampão TBS (0,01 M Tris; 0,14 M NaCl) e em seguida foi feita a incubação com o anticorpo primário anti-rNTPDase de *T. cruzi* 1:1000 diluídos em tampão TBS-T por cerca de 16 a 20 h à 100
30 rpm. Posteriormente a membrana passou por 3 a 6 lavagens com tampão TBS-T por 5 a 10 min, sob leve agitação constante. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, na diluição de 1:20.000. A membrana foi deixada sob agitação a 100 a 200 rpm por 1 a 3 horas. Em seguida, a

membrana passou por mais 3 a 6 lavagens com tampão TBS-T por 5 a 10 min, sob as mesmas condições de agitação. A revelação foi realizada com substrato diaminobenzidina (DAB) em solução contendo 50 mM Tris (pH 7,6); 10 mg DAB; 10 µL H₂O₂ (20%) na ausência de luz por aproximadamente 10 min. Após a revelação a membrana foi tirada com auxílio de uma pinça, parada a reação com água, seca sob papel toalha e a imagem foi digitalizada (Figura 3, parte B).

Ensaio de ELISA indireto usando a GDPase recombinante de *L. major* como antígeno

Nos experimentos de ELISA para análise da reatividade da proteína recombinante purificada foram utilizados 8 soros de cães previamente diagnosticados, sendo 3 soros positivos de cães infectados com *Leishmania* sp., 3 soros de animais negativos e 2 soros positivos de cães infectados com *T. cruzi*.

Para adsorção da rGDPase, placas de micro-diluição foram expostas a uma solução contendo 1,5, 3, 4,5 e 30 µg da proteína GDPase recombinante purificada em tampão 0,1 M carbonato/bicarbonato pH 9,6 e incubadas *overnight* a 4 °C. Os sítios inespecíficos foram bloqueados incubando-se a placa com solução de bloqueio contendo 5% de soro fetal bovino (SFB) em PBS por uma hora a 37 °C. Posteriormente, a placa foi lavada 3 a 6 vezes com PBS-T (PBS com 0,05% Tween-20) para retirar o excesso de solução de bloqueio. Após as lavagens, o soro foi adicionado na diluição de 1:80. A reação contendo o soro foi incubada por 1 a 3 horas por 37 °C. A lavagem prosseguiu da mesma maneira como descrito anteriormente. A reação com o anticorpo anti-IgG de cão conjugado a peroxidase na diluição 1:5000, foi incubada por 1 a 3 horas por 37 °C. A placa foi novamente lavada conforme descrito acima. A reação da proteína GDPase recombinante com anticorpos foi evidenciada através de revelação com 5 a 10 mg/mL de o-fenilenodiamina (OPD) e 0,01% H₂O₂, em tampão citrato-fosfato (0,1 M ácido cítrico, 0,2 M fosfato de sódio pH 5,0), por 15 a 30 min. A reação foi interrompida pela adição de 32 a 40 µL de uma solução 2,5 M H₂SO₄. A intensidade da reação, relacionada à intensidade da coloração, foi determinada pela leitura de absorbância a 490nm (Labsystems iEMS). A análise dos dados foi feita no programa Excell (Figura 5) onde se pode ver o reconhecimento positivo com maior leitura de absorbância dos soros sabidamente positivos para leishmaniose em relação aos soros negativos e de cães com doença de Chagas.

A GDPase recombinante foi posteriormente usada em ensaio com maior número de amostras (Figura 6) mostrando um bom reconhecimento específico na maioria dos soros

positivos e negativos utilizados no teste. Análises estatísticas destes dados mostraram Especificidade de 90,3%, Precisão de 72,1% e Sensibilidade de 44,1 %.

Estes resultados em conjunto mostram de forma clara a potencialidade de uso de proteínas da família E-NTPDase de *Leishmania* como antígenos para o diagnóstico da

5 Leishmnaiose.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

- <110> UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
 UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
 FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS
- <120> “E-NTPDases RECOMBINANTES, USO NA PRODUÇÃO DE KIT DE DIAGNÓSTICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS NAS LEISHMANIOSES CAUSADAS POR ESPÉCIES DO GÊNERO *Leishmania*”
- <130> 01 - 2010
- <160> 12
- <210> 1
 <211> 2160
 <212> DNA
 <213> *Leishmania major*
- <400> 1
 atggctagca tgactggtgg acagcaaagtg ggtcgcggat ccatgccaat gactgacggc 60
 cgcgctccag gcggaagtt acggaggagc atgagtcgcg tcggttcttgc cttcttcgcc 120
 gctgtgcttt tcgtcgtctt tctcacggcg tacgaagtcg gcggttggcac tgccaaccgc 180
 cttcagtcctc ggcacatgca gctcacgcag aacgccgtga agaagagtga ggaaaatcta 240
 gtgaactgcc gcgaggtcaa cacggattta agaagtggcg gtgacgtcaa tgcgcacggc 300
 gcgatggcgg agatgaggcg gcagagagag gagctgatga acatcgtcgc gctggagcgt 360
 gagcgtgtag tgcggcgcg tagtctgctg caggtttgcg aggatgagct agcgagcgac 420
 ctcagcgtac tcttcggtgt cgctgaccat aacttactg cgcgcctccg gtcggttgag 480
 aaaaagcggg aacacttggg gggtttgcac tcgatgctca acacggaccc gtttgggtgca 540
 gtgcagctgc gcagcagcag cgaaatccgc gcgctgcagg cggtctctt tcacgagatg 600
 cgcgccagca agaagaaagc agaaaacggt gtggcgagcg gcgcggcgtg cgcgaagtct 660
 tcggtcaagt actccgtcgt gttcgatatt ggcagcactg gaaatcgtgt tcatgtctac 720
 aagtacagag tggcacctgc cacgcgtacc gctgccgcgg ccggcagtga gctcagcgac 780
 atcgacctcg tcgaggagtt atttgagcta aatcaciaag cccttagcga gctcgagaat 840
 tcggtgcagg atgcgccgga ggctttatgg gagctcttcg tgaaagccaa ggactttgta 900
 ccggcggagc tgacgcgatg cacggcggcc gagttcaagg ctaccgcggg gctgcgcgatg 960

ctggggatgg agaaggccaa cgaattctt gccggcattc gcgcgcgcta ccgcaacgag 1020
 acgttctggt tgcgcggcaa cgcacagtt cgcactttgg atgcctgcga ggagggccca 1080
 atggcgtggc tgacagtaaa ctacttactg ggggcattct ccaggggtgc aacggcaacc 1140
 gactcgacgg tggccgcat cgatctcggc ggcggctcca cgcaaactgt cttcgaacct 1200
 ggcgagagca ctttccacgg gatgcgcacc gatttccgct acgcggcaac cttgggcagc 1260
 cggtcagtga gagcctacca gcacagctac gaaggctacg gcctgcacgc ggccaccaag 1320
 aagctgcttt accacataca aggcaagagc caagagaagc cgggcggtgg caccgccacc 1380
 aacacagcaa tgacgaccac cacgacagca ccggcaaacg gcggtgacga ggtcctgcct 1440
 gtttggaagg ctctgagaaa cctgggtgca gacgggagaa gcgagcgagg cgacatcgtc 1500
 accaagagag cggcccgat gccaccgcca gacgcggagg cgatggaggc gttcccgtgc 1560
 ttcgctgtcg gctacgaaga cccactaggg gtgaagaacg tcaagagaaa caatgccgag 1620
 gagccggtta tgccccgaa cttccaggct tgcgcgaacc ttttccgca tcggttgctg 1680
 aagccagtgg ggctgacatg tgaggcagtc aactgcggca tcgctggtgt catgcagcca 1740
 ccgctgacca acttcaccgg tgaatctac gcgttttctg tcacttttga tctgctggtt 1800
 ttggcgaaca gtcacctggt gccagcgggg gctgctgtgt cgaaggaaaa gtttgagggtg 1860
 aagctgccgg acctagcgaa gatcgcggag ggtcactgcg ccgccttctc cctcaccctg 1920
 atcgccgagg cgaccgcaa ggggggcctc ggtagcctaa agccggagta cgagtgtatg 1980
 tattactcct acgtgtacgc gcttctccgc tacggttacg aggtgccaga ggaccgcgtg 2040
 ctgcacgtgg cgaagaagat ccgcggctac gagaccgctt ggtccctcgg cgccctcactc 2100
 ctctctotta ccgtcgaaa gcttgcggcc gactcgagc accaccacca ccaccactga 2160

<210> 2

<211> 719

<212> PRT

<213> *Leishmania major*

<400> 2

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Gly Ser Met Pro
 1 5 10 15

Met Thr Asp Gly Arg Val Pro Gly Gly Lys Leu Arg Arg Ser Met Ser
 20 25 30

Arg Val Val Leu Ala Phe Phe Ala Ala Val Leu Phe Val Val Phe Leu
 35 40 45
 Thr Ala Tyr Glu Val Gly Val Gly Thr Ala Asn Pro Leu Gln Ser Arg

Pro Pro Asn Phe Gln Ala Cys Ala Asn Leu Phe Arg Asp Arg Leu Leu
 545 550 555 560
 Lys Pro Val Gly Leu Thr Cys Glu Ala Val Asn Cys Gly Ile Ala Gly
 565 570 575
 Val Met Gln Pro Pro Leu Thr Asn Phe Thr Gly Glu Ile Tyr Ala Phe
 580 585 590
 Ser Phe Ile Phe Asp Leu Leu Val Leu Ala Asn Ser Ser Leu Val Pro
 595 600 605
 Ala Gly Ala Ala Val Ser Lys Glu Lys Phe Glu Val Lys Leu Pro Asp
 610 615 620
 Leu Ala Lys Ile Ala Glu Gly His Cys Ala Ala Phe Ser Leu Thr Arg
 625 630 635 640
 Ile Ala Glu Ala Thr Ala Lys Gly Gly Leu Gly Ser Leu Lys Pro Glu
 645 650 655
 Tyr Glu Cys Met Tyr Tyr Ser Tyr Val Tyr Ala Leu Leu Arg Tyr Gly
 660 665 670
 Tyr Glu Val Pro Glu Asp Arg Val Leu His Val Ala Lys Lys Ile Arg
 675 680 685
 Gly Tyr Glu Thr Ala Trp Ser Leu Gly Ala Ser Leu Leu Ser Leu Thr
 690 695 700
 Val Asp Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
 705 710 715

<210> 3

<211> 2166

<212> DNA

<213> *Leishmania braziliensis*

<400> 3

atggctagca tgactggtgg acagcaaatg ggtcgcggat ccatggcagt ggttggcggc 60
 ttcacagctg gcaagccgct gagaggcatg ggccgcatcg tccttggcct cttcgccgtc 120
 atgcttggtg cctttgtcat cactgcgtag caagtcggcg ttagcaccgc caaccacgt 180
 cagtcccgtc acatacagct cgcgcagaac gccgtggcga agagcgaggc aatgctgact 240
 ggctgccgag aggccaatgc gaatttaaag aacagcggta gtgtcaaggg tgcaacaagcg 300
 atcgcggaga tggcacggca gaaagcggag ctgacgagta ctgtcgact ggagcgtgag 360
 cgtgtcgtgt cggcgcgtag tttgttgtag gcgtgagagg atgggctggc aagcgaacac 420
 cgtacactct tcggcaccgc ccaccgcaac accacggcgc acctcctgtg gttgaaacag 480
 agacgggctc atctgaagtc cgagcacgag aagctcaccg agggctcact cgggtgtagtc 540

gagccgcgcc gcagcagcgg catccgcgca ctgcaggcgg ctctccttca agaaatacac 600
cctagcactg gtttagctgg aaacgggtg gagaaccgca aggcgtgcgt ggacgctgtg 660
gccaaagtact ccgttgtggt cgatattggc agcactggca atcgtgtcca tgtctacaag 720
tacagggtga accctctcac gcagatctct gcctcagcgc ctgatgagct cagcaaaatc 780
gacctcgtcg gggagctggt cgagctgaat tacaagccc ttagtgagct caacaatccg 840
gtgcaggatg ccccggaagc cttgtgggag cttttcgcga aggccaaaga cttcgtgccg 900
gcagagttgc acgcatgcac accaatcgag ttcaaggcta ctgcgggact gcgcatgctg 960
gggttgagaga aagccacaga gattcttctt gagattcgtg ctgcctaccg caaggaaacg 1020
ttctggctgc gcggcagcgc gccagtcgc atcttgatt cccacgagga gggcctgatg 1080
gcgtggctga cggatgaactt ttactaggg acatttgcca ggaacactga ggcaacagcc 1140
tcgacggcgg ctatcattga catcgggtggc ggctccacgc agatcgtctt cgagcctggg 1200
gaagacacgt tctacaaaat gcgagcagac gtgcgtggct cggcaacgtt gggcggccgg 1260
tcggtgaaag tgtatcagca cagctacgaa ggctacggtc tgcacgcagc caccaaggcg 1320
ctgctttttc atattcaagg caagcgccaa gagaggccgg gcggcggtc cgctaccgc 1380
gccacgacga cggcacggac cagcggcgat gacagcacc catccgtcgg gaatggtgtc 1440
cgcaacgtga gcgccaatga cagcaaagac gaagaagacg aaaacatgat caccgacaca 1500
gcgccgccga aaactctacc gtggctacag ttggatacgg aggcgggtga cgcattcccc 1560
tgcttcgctg tcggctacga ggaccagctc ggggtgcgga aactaagag aaacgacgcc 1620
ggagaaccgg ctaggcacc tgacttccag gcttgcgoga accttttccg cgaccggtg 1680
ctgaaaccgg tggggctgac atgcgaggag gtcaactgcg gcgtcgcggg tgtcttccag 1740
ccgccgctgg ccaacttcac cggtgacatc tacgcgtttt cattttttt tgatcttctg 1800
gccatggcga acaactctct agcgcagtg ggggctgcag tatcgaacga taagttcgag 1860
gtgaagctgc ctgacctggc aaagattggg gagcgtcact gcgcggcctt ctccctcacc 1920
cggattgccg aggcgaccgc aaagggcggc ctcggtagtc tgaagccaga gtacgagtg 1980
atgtattact cctacacgta cgcgctgctc cgatattggg acgaggtgcc ggagggccgc 2040
gtgctgcacg tggcaaagaa gatcagcggc tacgagacc cctggccctt gggtgccca 2100
ctcatctctg tcacctaagt cgacaagctt gcggccgcac tcgagcacca ccaccaccac 2160
cactga 2166

<210> 4

<211> 720

<212> PRT

<213> *Leishmania braziliensis*

<400> 4

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Gly Ser Met Ala
 1 5 10 15

Val Val Gly Gly Phe Thr Ala Gly Lys Pro Leu Arg Gly Met Gly Arg
 20 25 30

Ile Val Leu Gly Leu Phe Ala Val Met Leu Val Ala Phe Val Ile Thr
 35 40 45

Ala Tyr Gln Val Gly Val Ser Thr Ala Asn Pro Arg Gln Ser Arg His
 50 55 60

Ile Gln Leu Ala Gln Asn Ala Val Ala Lys Ser Glu Ala Met Leu Thr
 65 70 75 80

Gly Cys Arg Glu Ala Asn Ala Asn Leu Lys Asn Ser Gly Ser Val Lys
 85 90 95

Gly Ala Gln Ala Ile Ala Glu Met Ala Arg Gln Lys Ala Glu Leu Thr
 100 105 110

Ser Thr Val Ala Leu Glu Arg Glu Arg Val Val Ser Ala Arg Ser Leu
 115 120 125

Leu Gln Ala Cys Glu Asp Gly Leu Ala Ser Glu His Arg Thr Leu Phe
 130 135 140

Gly Thr Ala His Arg Asn Thr Thr Ala His Leu Leu Trp Leu Lys Gln
 145 150 155 160

Arg Arg Ala His Leu Lys Ser Glu His Glu Lys Leu Thr Glu Gly Pro
 165 170 175

Leu Gly Val Val Glu Pro Arg Arg Ser Ser Gly Ile Arg Ala Leu Gln
 180 185 190

Ala Ala Leu Leu Gln Glu Ile His Pro Ser Thr Gly Leu Ala Gly Asn
 195 200 205

Gly Val Glu Asn Arg Lys Ala Cys Val Asp Ala Val Ala Lys Tyr Ser
 210 215 220

Val Val Phe Asp Ile Gly Ser Thr Gly Asn Arg Val His Val Tyr Lys
 225 230 235 240

Tyr Arg Val Asn Pro Leu Thr Gln Ile Ser Ala Ser Ala Pro Asp Glu
 245 250 255

Leu Ser Lys Ile Asp Leu Val Gly Glu Leu Phe Glu Leu Asn Tyr Lys
 260 265 270

Ala Leu Ser Glu Leu Asn Asn Pro Val Gln Asp Ala Pro Glu Ala Leu
 275 280 285

Trp Glu Leu Phe Ala Lys Ala Lys Asn Phe Val Pro Ala Glu Leu His
 290 295 300

Ala Cys Thr Pro Ile Glu Phe Lys Ala Thr Ala Gly Leu Arg Met Leu
305 310 315 320

Gly Leu Glu Lys Ala Thr Glu Ile Leu Ala Glu Ile Arg Ala Arg Tyr
325 330 335

Arg Lys Glu Thr Phe Trp Leu Arg Gly Ser Ala Pro Val Arg Ile Leu
340 345 350

Asp Ser His Glu Glu Gly Leu Met Ala Trp Leu Thr Val Asn Phe Leu
355 360 365

Leu Gly Thr Phe Ala Arg Asn Thr Glu Ala Thr Ala Ser Thr Ala Ala
370 375 380

Ile Ile Asp Ile Gly Gly Gly Ser Thr Gln Ile Val Phe Glu Pro Gly
385 390 395 400

Glu Asp Thr Phe Tyr Lys Met Arg Ala Asp Val Arg Gly Ser Ala Thr
405 410 415

Leu Gly Gly Arg Ser Val Lys Val Tyr Gln His Ser Tyr Glu Gly Thr
420 425 430

Gly Leu His Ala Ala Thr Lys Ala Leu Leu Phe His Ile Gln Gly Lys
435 440 445

Arg Gln Glu Arg Pro Gly Gly Gly Ser Ala Thr Arg Ala Thr Thr Thr
450 455 460

Ala Arg Thr Ser Gly Asp Asp Ser Thr Pro Ser Val Gly Asn Gly Val
465 470 475 480

Arg Asn Val Ser Ala Asn Asp Ser Lys Asp Glu Glu Asp Glu Asn Met
485 490 495

Ile Thr Asp Thr Ala Pro Pro Lys Thr Leu Pro Trp Leu Gln Leu Asp
500 505 510

Thr Glu Ala Val Asp Ala Phe Pro Cys Phe Ala Val Gly Tyr Glu Asp
515 520 525

Gln Leu Gly Val Arg Asn Thr Lys Arg Asn Asp Ala Gly Glu Pro Ala
530 535 540

Arg His Pro Asp Phe Gln Ala Cys Ala Asn Leu Phe Arg Asp Arg Leu
545 550 555 560

Leu Ile Pro Val Gly Leu Thr Cys Glu Glu Val Asn Cys Gly Val Ala
565 570 575

Gly Val Phe Gln Pro Pro Leu Ala Asn Phe Thr Gly Asp Ile Tyr Ala
580 585 590

Phe Ser Phe Leu Phe Asp Leu Leu Ala Met Ala Asn Asn Ser Leu Ala
595 600 605

Pro Val Gly Ala Ala Val Ser Asn Asp Lys Phe Glu Val Lys Leu Pro
610 615 620

Asp Leu Ala Lys Ile Gly Glu Arg His Cys Ala Ala Phe Ser Leu Thr
 625 630 635 640
 Arg Ile Ala Glu Ala Thr Ala Lys Gly Gly Leu Gly Ser Leu Lys Pro
 645 650 655
 Glu Tyr Glu Cys Met Tyr Tyr Ser Tyr Thr Tyr Ala Leu Leu Arg Tyr
 660 665 670
 Gly Tyr Glu Val Pro Glu Gly Arg Val Leu His Val Ala Lys Lys Ile
 675 680 685
 Ser Gly Tyr Glu Thr Ala Trp Pro Leu Gly Ala Ser Leu Ile Ser Val
 690 695 700
 Thr Val Asp Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu His His His His His His
 705 710 715 720

<210> 5
 <211> 2124
 <212> DNA
 <213> *Leishmania infantum*

<400> 5
 atggctagca tgactggtgg acagcaaatg ggctcgcgat ccatgagtcg cgtctttggt 60
 gccttcttcg ctgctgtgct tttcgtcgtc tttctcaccg cgtacgaagt cggcgttggc 120
 accgccaacc cgcttcagtc gcggcacatg cagctcacgc agaacgcagt gaagaagagt 180
 gaggcaaatc tagtgaactg ccgcgaggtc aacgcggatt taaagagcgg tggtagcgtc 240
 aatgccgcac aggcgattgc ggagatgagg cggcagagag aggagctgat gaacatcgtc 300
 gcgctggagc gtgagcgtgt agtgcggcg cgtagtctgc tgcaggtttg cgaggatgag 360
 ctagccagcg acctcagtgt actcttcggt gtcgccgacc acaacttcac tgcgcgcatc 420
 cggtcggttg aggaaaagcg gaaacatttg gagggtttgc actcgatgct caacacgacc 480
 ccgtttggtg cagtggagct gcgccgagc agcgaaatcc gtgcactgca ggcggctctc 540
 tttcacgaga tgcgcgccag caagaagaaa gcagaaaacg gtgtggcgaa cggcgaagcg 600
 tgcacgaaga cttcggacaa gtactccgtc gtgttcgaca tcggcagcac tggaaatcgt 660
 gtccatgtct acaagtacag agtggccctt gccacgcata ccgctgctgc ggccggcagt 720
 gagctcagcg acatcgacct cgtcgaggag ttgtttgagc taaatcacia agcccttagc 780
 gagctcgata atccggtgca ggatgcgccg gaagccttat gggagctctt catgaaagcc 840
 aagtactttg taccggcgga gctgcacgca tgcacggcag tcgagttcaa ggctaccgcg 900
 ggactgcgca tgctggggat ggagaaggcc accgaaattc ttgacgggat tcgcgcgcgc 960
 taccgcaacg aaacgttctg gttgcgcggc aatgcaccg ttcgcatctt ggatgcctgc 1020

gaggagggcc caatggcgtg gctcacggta aactacttac tgggggtatt ctccaggggt 1080
acaaaggcaa ccgctcgcac ggtggccgtc atcgacctcg gaggcggctc cacgcagatc 1140
gtcttcgaac ccggcgagag cgcgttccac gggatgcgca ccgatttgcg ctactcggca 1200
accttgggca gccggtctgt gagtgcctac caacacagct acgaaggcta cggcctgcac 1260
gcgggcaacca aggagctgct tttccacatt caaggcaaga gccaaagagaa gccgggaggc 1320
ggtaccacca ccagcacagc aacgacgacc accacgacaa caccggcaaa cagcggcgac 1380
aaggctctgt ctgtttggaa cgttctggga aacctgggtg cagacgggag cagcgagcga 1440
gacgacatcg tcaccaagag agcgcgcccg atgccaccac cgccactgcc ggacgcggag 1500
gcggtggagg cgttcccctg cttcgtctgc ggctacgaag acccgctagg ggtgaagaac 1560
atcaagaaaa acaataccgg ggagccggct atgccccga acttccaggc ttgcgcgaac 1620
cttttccgcg atcggtctgt aaagccagtg gggctgacat gtgaggcggc caactgcggc 1680
atcgctggtg tcatgcagcc accgctgacc aacttcaccg gggaaatcta cgtgttttcg 1740
ttcatctttg atctgctggc cttggcgaac agctccctgg tgccagcggg ggctgccgtg 1800
tcaagggaaa agtttgaggt gaagctgccg gacctagcga cgattgcgga gggcactgc 1860
gccgccttct cctcaccgg tatcgccgag gcgaccgcca aggagggcct cggtagcctg 1920
aagccggagt acgagtgcac gtattactcc tacgtgtacg cgcttctccg ctacgggtac 1980
gaggtgccag aggatcgctg gctgcacgtg gtgaagaaga tccgcggcta cgagaccgcc 2040
tggtccctcg gcgcctcact cctctctctt acctaagtcg acaagcttgc ggccgcactc 2100
gagcaccacc accaccacca ctga 2124

<210> 6

<211> 706

<212> PRT

<213> *Leishmania infantum*

<400> 6

Met	Ala	Ser	Met	Thr	Gly	Gly	Gln	Gln	Met	Gly	Arg	Gly	Ser	Met	Ser
1				5					10					15	
Arg	Val	Phe	Val	Ala	Phe	Phe	Ala	Ala	Val	Leu	Phe	Val	Val	Phe	Leu
			20					25						30	
Thr	Ala	Tyr	Glu	Val	Gly	Val	Gly	Thr	Ala	Asn	Pro	Leu	Gln	Ser	Arg
		35						40						45	
His	Met	Gln	Leu	Thr	Gln	Asn	Ala	Val	Lys	Lys	Ser	Glu	Ala	Asn	Leu
	50					55					60				
Val	Asn	Cys	Arg	Glu	Val	Asn	Ala	Asp	Leu	Lys	Ser	Gly	Gly	Gly	Val
65					70					75					80

Thr Leu Gly Ser Arg Ser Val Ser Ala Tyr Gln His Ser Tyr Glu Gly
 405 410 415
 Tyr Gly Leu His Ala Ala Thr Lys Glu Leu Leu Phe His Ile Gln Gly
 420 425 430
 Lys Ser Gln Glu Lys Pro Gly Gly Thr Thr Thr Ser Thr Ala Thr
 435 440 445
 Thr Thr Thr Thr Thr Thr Pro Ala Asn Ser Gly Asp Lys Ala Leu Ser
 450 455 460
 Val Trp Asn Val Leu Gly Asn Leu Gly Ala Asp Gly Ser Ser Glu Arg
 465 470 475 480
 Asp Asp Ile Val Thr Lys Arg Ala Pro Pro Met Pro Pro Pro Pro Leu
 485 490 495
 Pro Asp Ala Glu Ala Val Glu Ala Phe Pro Cys Phe Ala Val Gly Tyr
 500 505 510
 Glu Asp Pro Leu Gly Val Lys Asn Ile Lys Lys Asn Asn Thr Gly Glu
 515 520 525
 Pro Ala Met Pro Pro Asn Phe Gln Ala Cys Ala Asn Leu Phe Arg Asp
 530 535 540
 Arg Leu Leu Lys Pro Val Gly Leu Thr Cys Glu Ala Ala Asn Cys Gly
 545 550 555 560
 Ile Ala Gly Val Met Gln Pro Pro Leu Thr Asn Phe Thr Gly Glu Ile
 565 570 575
 Tyr Val Phe Ser Phe Ile Phe Asp Leu Leu Ala Leu Ala Asp Ser Ser
 580 585 590
 Leu Val Pro Ala Gly Ala Ala Val Ser Arg Glu Lys Phe Glu Val Lys
 595 600 605
 Leu Pro Asp Leu Ala Thr Ile Ala Glu Gly His Cys Ala Ala Phe Ser
 610 615 620
 Leu Thr Arg Ile Arg Glu Ala Thr Ala Lys Glu Gly Leu Gly Ser Leu
 625 630 635 640
 Lys Pro Glu Tyr Glu Cyr Met Tyr Tyr Ser Tyr Val Tyr Ala Leu Leu
 645 650 655
 Arg Tyr Gly Tyr Glu Val Pro Glu Asp Arg Val Leu His Val Val Lys
 660 665 670
 Lys Ile Arg Gly Tyr Glu Thr Ala Trp Ser Leu Gly Ala Ser Leu Leu
 675 680 685
 Ser Leu Thr Val Asp Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu His His His His
 690 695 700
 His His
 705

<210> 7
 <211> 1362
 <212> DNA
 <213> *Leishmania major*

<400> 7
atggctagca tgactggtg acagcaaatg ggtcgcggat ccatgcgtcc gtactcctcg 60
 gtgcggcgca tgactcaaca atcgaagcgc ctgcgcgtcg ccagcaccct tgtgcttagc 120
 gcgcttgta tcttcggtt cctcgtctac catcaaagcc ctttgttctc cccatgtgac 180
 tcggcgtagc cgaatgtata cgacgtcgtc atcgacgctg gcagcactgg ctcacgtgtg 240
 catgtatttc agtacgagcg cggccgcacc ggtttcgtac ttctgagaga gcgcttcaaa 300
 cgagcagagc cggatctgtc ctctttcgcc accgacctgg acggcgccaa ggcgtcgttt 360
 gaggggcttc tgcgctttgc ggatacggtg gttccgcaga gctaccagaa gtgcacctct 420
 gtcactctca aggccaccgc cggccttagg ctctacctg agtccgcca gcaggcgtg 480
 ctggacgttg cccagcacac actcaacgca tctccatttc agtctcgcgg cgctccatc 540
 atctctggcg ctcaagaggg cgtctacggg tggctgacgg tgaactacct gctggacaga 600
 ctgcacacgg acggtgccac cgtcgcgacc atcgatatgg gagggcctc gacacaggtc 660
 gtcttcgaga cgacgccac gtctggagaa tggctgcct tcaactatgc ctaccagctg 720
 cgcacaccaa agcgcacgat cgccatgat cagcacagct acctcggcct tgggatgaac 780
 gaggcgaaga agaggcttat gacgttgttc gccgaagcga acgggacgtt gtctttcccg 840
 tgcttcccgga gagggatac gaagcgcgta aacggtgtgg aacttcgaaa cagtgcgcc 900
 acggacttta acgcgtgtgc aggactattt cgcgaacatg tcataacaac gtcgacctgc 960
 aagtttgatg cctgtggcgc ccgcggcgtg ccgcagccgc tgtttcgtc aaggcggcat 1020
 cccatctacg ccttctccta cttttacaac cgctctacg acttctcaa ggaggggagc 1080
 caggtctacg tctcctcgta caaggaggtc gggcaagagg tgtgccaccg ggaatctgcg 1140
 aggcggacca ccgcccctga ggaaactgcc tgcattgaac tggcgtacat gtacagcttc 1200
 ttgacgtacg ggctagggct tagtgacgcc acggttctca cggtgcccaa ccgcatcgag 1260
 ggtatggcgg tttcctggtc tcttggtctc tctctctct tctctctca gatggaatga 1320
aagcttgagg ccgcactoga gcaccaccac caccaccact ga 1362

<210> 8
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> *Leishmania major*

<400> 8

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Gly Ser Met Arg
 1 5 10 15
 Pro Tyr Ser Ser Val Arg Arg Met Thr Gln Gln Ser Lys Arg Leu Arg
 20 25 30
 Val Ala Ser Thr Leu Val Leu Ser Ala Leu Val Ile Phe Gly Phe Leu
 35 40 45
 Val Tyr His Gln Ser Pro Leu Phe Ser Pro Cys Asp Ser Ala Tyr Ala
 50 55 60
 Asn Val Tyr Asp Val Val Ile Asp Ala Gly Ser Tyr Gly Ser Arg Val
 65 70 75 80
 His Val Phe Gln Tyr Glu Arg Gly Arg Thr Gly Phe Val Leu Leu Arg
 85 90 95
 Glu Arg Phe Lys Arg Ala Glu Pro Asp Leu Ser Ser Phe Ala Thr Asp
 100 105 110
 Leu Asp Gly Ala Lys Ala Ser Leu Glu Gly Leu Leu Arg Phe Ala Asp
 115 120 125
 Thr Val Val Pro Gln Ser Tyr Gln Lys Cys Thr Ser Val Thr Leu Lys
 130 135 140
 Ala Thr Ala Gly Leu Arg Leu Leu Pro Glu Ser Ala Gln Gln Ala Leu
 145 150 155 160
 Leu Asp Val Ala Gln His Thr Leu Asn Ala Ser Pro Phe Gln Ser Arg
 165 170 175
 Gly Ala Ser Ile Ile Ser Gly Ala Gln Glu Gly Val Tyr Gly Trp Leu
 180 185 190
 Thr Val Asn Tyr Leu Leu Asp Arg Leu Asp Thr Asp Val Ala Thr Val
 195 200 205
 Ala Thr Ile Asp Met Gly Gly Ala Ser Thr Gln Val Val Phe Glu Thr
 210 215 220
 Thr Pro Thr Ser Gly Glu Trp Leu Pro Phe Asn Tyr Ala Tyr Gln Leu
 225 230 235 240
 Arg Thr Pro Lys Arg Thr Ile Ala Met Tyr Gln His Ser Tyr Leu Gly
 245 250 255
 Leu Gly Met Asn Glu Ala Lys Lys Arg Leu Met Thr Leu Phe Ala Glu
 260 265 270
 Ala Asn Gly Thr Leu Ser Phe Pro Cys Phe Pro Arg Gly Tyr Thr Lys
 275 280 285
 Arg Val Asn Gly Val Glu Leu Arg Asn Ser Asp Ala Thr Asp Phe Asn
 290 295 300
 Ala Cys Ala Gly Leu Phe Arg Glu His Val Ile Thr Thr Ser Thr Cys
 305 310 315 320

gaggcaaaga agacactgat gacgttggtc gccaaagtga acgggacatc ccctttttca 840
 tgcttcccga gaaggcatac ggaacacctg aatggtgtgg aacttcgaaa cggcgattcc 900
 acggacttcg acgtttgtgt aaatcttttt cgagagcacg tcataacgaa gccgatctgc 960
 aggtttgatg cctgtggcgc tcgcggcgtg ccgcagccgc cgtgcccgtc gaagcagcat 1020
 ccaatttacg ccttttttta cttctacgac cgtctctacc acttccgcag tgaaggattc 1080
 ccggtatacg tctcgtcgta caaggagctc gggcgaggagg tgtgtcagcg agagtctgca 1140
 gaccacacca ccacccccaa ggaaacgacc tgcattggagc tggcatactt gtacagcttc 1200
 ttgacgcacg ggctagggct tagcgacgac agaaccctcg aggttcttaa ccgcatagag 1260
 ggtatcgcgg tctcctggtc tctaggtctc tctctgtcct tcgtgctcaa gatggaatga 1320
 gtcgacaagc ttgcgccgc actcgagcac caccaccacc accactga 1368

<210> 10

<211> 454

<212> PRT

<213> *Leishmania braziliensis*

<400> 10

Met	Ala	Ser	Met	Thr	Gly	Gly	Gln	Gln	Met	Gly	Arg	Gly	Ser	Met	Arg
1				5					10					15	
Pro	Tyr	Ser	Ser	Val	Arg	Arg	Met	Thr	Gln	Gln	Ser	Glu	Arg	Leu	Arg
			20					25					30		
Val	Ile	Gly	Val	Leu	Val	Leu	Ser	Arg	Phe	Val	Leu	Phe	Gly	Phe	Val
		35						40					45		
Ile	Tyr	Ser	Glu	Ser	Pro	Trp	Phe	Ser	Pro	Cys	Asn	Ser	Pro	Tyr	Ser
	50					55					60				
Asn	Val	Tyr	Asp	Ile	Val	Ile	Asp	Ala	Gly	Ser	Thr	Gly	Ser	Arg	Val
65				70						75				80	
His	Val	Phe	Gln	Tyr	Glu	Arg	Ser	Ser	Thr	Gly	Val	Ile	Leu	Leu	Arg
				85					90					95	
Glu	Arg	Phe	Lys	Arg	Ile	Glu	Pro	Gly	Leu	Ser	Ser	Phe	Ala	Thr	Asp
			100					105					110		
Gln	Glu	Gly	Ala	Lys	Gln	Ser	Leu	Ala	Gly	Leu	Leu	Arg	Phe	Ala	Glu
		115					120					125			
Lys	Ala	Val	Pro	Arg	Ser	Tyr	Gln	Arg	Cys	Thr	Ser	Val	Thr	Leu	Lys
	130					135					140				
Ala	Thr	Ala	Gly	Leu	Arg	Leu	Leu	Pro	Glu	Ala	Asp	Gln	Gln	Val	Leu
145					150					155					160
Leu	Asp	Ala	Ala	Gln	Gln	Thr	Leu	Lys	Ala	Phe	Pro	Phe	Gln	Ser	Arg
				165					170					175	

Gly Ala Ser Ile Val Ser Gly Ala Gln Glu Gly Val Tyr Gly Trp Leu
 180 185 190
 Thr Val Asn Tyr Leu Leu Asn Arg Leu Asp Lys Glu Gly Ala Thr Val
 195 200 205
 Ala Thr Ile Asp Met Gly Gly Ala Ser Thr Gln Val Val Phe Glu Thr
 210 215 220
 Lys Phe Thr Ser Gly Glu Trp Leu Pro Phe Asn Tyr Ala His Gln Leu
 225 230 235 240
 Arg Thr Pro Lys Arg Thr Ile Ala Met Tyr Gln His Ser Tyr Leu Gly
 245 250 255
 Leu Gly Leu Asn Glu Ala Lys Lys Thr Leu Met Thr Leu Phe Ala Lys
 260 265 270
 Val Asn Gly Thr Ser Pro Phe Ser Cys Phe Pro Arg Arg His Thr Glu
 275 280 285
 His Leu Asn Gly Val Glu Leu Arg Asn Gly Asp Ser Thr Asp Phe Asp
 290 295 300
 Val Cys Val Asn Leu Phe Arg Glu His Val Ile Thr Lys Pro Ile Cys
 305 310 315 320
 Arg Phe Asp Ala Cys Gly Ala Arg Gly Val Pro Gln Pro Pro Leu Pro
 325 330 335
 Ser Lys Gln His Pro Ile Tyr Ala Phe Ser Tyr Phe Tyr Asp Arg Leu
 340 345 350
 Tyr His Phe Arg Ser Glu Gly Phe Pro Val Tyr Val Ser Ser Tyr Lys
 355 360 365
 Glu Leu Gly Arg Glu Val Cys Gln Arg Glu Ser Ala Asp His Thr Thr
 370 375 380
 Thr Pro Lys Glu Thr Thr Cys Met Glu Leu Ala Tyr Leu Tyr Ser Phe
 385 390 395 400
 Leu Thr His Gly Leu Gly Leu Ser Asp Asp Arg Thr Leu Glu Val Pro
 405 410 415
 Asn Arg Ile Glu Gly Ile Ala Val Ser Trp Ser Leu Gly Cys Ser Leu
 420 425 430
 Ser Phe Val Leu Lye Met Glu Val Asp Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu
 435 440 445
 His His His His His His
 450

<210> 11

<211> 1368

<212> DNA

<213> *Leishmania infantum*

<400> 11

atggctagca tgactggtgg acagcaaatg ggtcgcggat ccatgcgacc gtactcctcg 60
 gtgcggcgca tgactcaaca gtcgaagcga ctgcgcatcg ccggcaccct tgtgcttagc 120
 gcgcttgta tcttcggttt cctcgtttac tatcaaagcc ctctgctctc cccatgtgac 180
 tcggcgtacg cgaatgtata cgacgtcgtc atcgacgccg gcagcactgg ctcacgtgtg 240
 catgtgttcc aatacagcgc cggccgcacc ggtctcgtac ttctgagaga gcgcttcaaa 300
 cgagtagagc cgggtctatc ctcttttgcc accgaccagc acggcgccaa ggagtcgctt 360
 gcggggctgc tgcgcttcgc ggataagggtg gtcccgcmaa gctaccagaa gtgcaccttc 420
 gtcaccctca aggccaccgc cggccttcgg ctctacctg agtccgtcca gcaggtgctg 480
 ctggacgctg cccagcacac actcaacgca tctccatttc agtctcgtgg tgctccatc 540
 atctctggcg ctcaagaggc cgtctacggg tggtgacgg tgaactacct gctgaacagg 600
 ctcgacacgg acgttgccac cgtcgcgacc atcgacatgg gaggtgcctc gacacaggtc 660
 gtcttcgaga cgacgccac gtctggagaa tggctgcctt tcaactatgc ccaccagctg 720
 cgcacaccaa agcgcacgat caccatgtat cagcacagct atctcggcct tgggatgaac 780
 gaggcgaaga agaagcttat gatgtcattc gccgaagcga acgggacgtc gtctttcccg 840
 tgcttcccgga gagggatgac gaagcgcctg aacgatgtgg aacttcgaaa cagtgcgccc 900
 acggactttg acgcgtgtgc aggactattt cgcgaacatg tcataacaaa gacgacctgc 960
 aagtttgatg cctgtggcgc ccgcggcgtg ccgcagccgc tgtttccgtc aaggcggcat 1020
 ctcatctacg ccttctccta cttttacgac cgactctacc acttcagcaa ggaggggagc 1080
 ccggtctacg tctcgtcgtc caaggaggtc gggcaagagg tgtgccaccg ggaatctgcg 1140
 aggcggacca ccgccctga ggaacggcc tgcattggagc tggcgtacat gtacagcttc 1200
 ttgacatacg gcctagggct tagtgacgcc acggctctca cggtgcccaa ccgcatcgag 1260
 ggtatggcgg tttcctggtc tcttggtctc tctctctcct tcttctcaa gatggaatga 1320
 gtcgacaagc ttgcggccgc actcgagcac caccaccacc accactga 1368

<210> 12

<211> 454

<212> PRT

<213> *Leishmania infantum*

<400> 12

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Gly Ser Met Arg
 1 5 10 15

Pro Tyr Ser Ser Val Arg Arg Met Thr Gln Gln Ser Lys Arg Leu Arg
 20 25 30
 Ile Ala Gly Thr Leu Val Leu Ser Ala Leu Val Ile Phe Gly Phe Leu
 35 40 45
 Val Tyr Tyr Gln Ser Pro Leu Leu Ser Pro Cys Asp Ser Ala Tyr Ala
 50 55 60
 Asn Val Tyr Asp Val Val Ile Asp Ala Gly Ser Thr Gly Ser Arg Val
 65 70 75 80
 His Val Phe Gln Tyr Glu Arg Gly Arg Thr Gly Leu Val Leu Leu Arg
 85 90 95
 Glu Arg Phe Lys Arg Val Glu Pro Gly Leu Ser Ser Phe Ala Thr Asp
 100 105 110
 Pro Asp Gly Ala Lys Glu Ser Leu Ala Gly Leu Leu Arg Phe Ala Asp
 115 120 125
 Lys Val Val Pro Gln Ser Tyr Gln Lys Cys Thr Phe Val Thr Leu Lys
 130 135 140
 Ala Thr Ala Gly Leu Arg Leu Leu Pro Glu Ser Val Gln Gln Val Leu
 145 150 155 160
 Leu Asp Ala Ala Gln His Thr Leu Asn Ala Ser Pro Phe Gln Ser Arg
 165 170 175
 Gly Ala Ser Ile Ile Ser Gly Ala Gln Glu Gly Val Tyr Gly Trp Leu
 180 185 190
 Thr Val Asn Tyr Leu Leu Asn Arg Leu Asp Thr Asp Val Ala Thr Val
 195 200 205
 Ala Thr Ile Asp Met Gly Gly Ala Ser Thr Gln Val Val Phe Glu Thr
 210 215 220
 Thr Pro Thr Ser Gly Glu Trp Leu Pro Phe Asn Tyr Ala His Gln Leu
 225 230 235 240
 Arg Thr Pro Lys Arg Thr Ile Thr Met Tyr Gln His Ser Tyr Leu Gly
 245 250 255
 Leu Gly Met Asn Glu Ala Lys Lys Lys Leu Met Met Ser Phe Ala Glu
 260 265 270
 Ala Asn Gly Thr Ser Ser Phe Pro Cys Phe Pro Arg Gly Tyr Ala Lys
 275 280 285
 Arg Leu Asn Asp Val Glu Leu Arg Asn Ser Asp Ala Thr Asp Phe Asp
 290 295 300
 Ala Cys Ala Gly Leu Phe Arg Glu His Val Ile Thr Lys Thr Thr Cys
 305 310 315 320
 Lys Phe Asp Ala Cys Gly Ala Arg Gly Val Pro Gln Pro Leu Phe Pro
 325 330 335
 Ser Arg Arg His Leu Ile Tyr Ala Phe Ser Tyr Phe Tyr Asp Arg Leu

REIVINDICAÇÕES

1. **“E-NTPDases RECOMBINANTES DO GÊNERO *Leishmania*”** caracterizadas por serem homólogas as proteínas naturais, obtidas a partir da sequência nucleotídica dos genes codificantes destas proteínas, incluindo as SEQ. ID. Nº 1, SEQ. ID. Nº 2, SEQ. ID. Nº 3, SEQ. ID. Nº 4, SEQ. ID. Nº 5, SEQ. ID. Nº 6, SEQ. ID. Nº 7, SEQ. ID. Nº 8, SEQ. ID. Nº 9, SEQ. ID. Nº 10, SEQ. ID. Nº 11 e SEQ. ID. Nº 12, e quaisquer variação distinta das referidas sequências, desde que destinadas a conservarem as suas propriedades antigênicas;

2. **“E-NTPDase RECOMBINANTE DA *Leishmania major*”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelas SEQ. ID. Nº 1 e SEQ. ID. Nº 2, derivada do gene codificante da GDPase de *Leishmania major*, apresentando uma identidade de aminoácidos de 93,74% em relação à proteína GDPase natural de *Leishmania major*, sendo que à porção aminoterminal são adicionados 42 pares de bases e à porção carboxiterminal são removidos os três últimos nucleotídeos (códon de parada) e adicionados 45 pares de base, possuindo 719 aminoácidos;

3. **“E-NTPDase RECOMBINANTE DA *Leishmania braziliensis*”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelas SEQ. ID. Nº 3 e SEQ. ID. Nº 4, derivada do gene codificante da GDPase de *Leishmania braziliensis*, apresentando uma identidade de aminoácidos de 65,75% em relação à proteína GDPase recombinante da *Leishmania major*, sendo que à porção aminoterminal são adicionados 42 pares de bases e à porção carboxiterminal são removidos os três últimos nucleotídeos (códon de parada) e adicionados 45 pares de base, possuindo 720 aminoácidos;

4. **“E-NTPDase RECOMBINANTE DA *Leishmania infantum*”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelas SEQ. ID. Nº 5 e SEQ. ID. Nº 6, derivada do gene codificante da GDPase de *Leishmania infantum*, apresentando uma identidade de aminoácidos de 84,49% em relação à proteína GDPase recombinante da *Leishmania major*, sendo que à porção aminoterminal são adicionados 42 pares de bases e à porção carboxiterminal são removidos os três últimos nucleotídeos (códon de parada) e adicionados 45 pares de base, possuindo 706 aminoácidos;

5. **“NTPDase RECOMBINANTE DA *Leishmania major*”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelas SEQ. ID. Nº 7 e SEQ. ID. Nº 8, derivada do gene codificante da NTPDase de *Leishmania major*, apresentando uma identidade de

aminoácidos de 23,09% em relação à proteína GDPase natural de *Leishmania major*, sendo que à porção aminoterminal foram adicionados 42 pares de bases e à porção carboxiterminal são removidos os três últimos nucleotídeos (códon de parada) e adicionados 39 pares de base, possuindo 452 aminoácidos;

5 **6. “NTPDase RECOMBINANTE DA *Leishmania braziliensis*”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelas SEQ. ID. Nº 9 e SEQ. ID. Nº 10, derivada do gene codificante da NTPDase de *Leishmania braziliensis*, apresentando uma identidade de aminoácidos de 23,09% em relação à proteína GDPase natural de *Leishmania major*,
10 carboxiterminal são removidos os três últimos nucleotídeos (códon de parada) e adicionados 45 pares de base, possuindo 454 aminoácidos;

7. “NTPDase RECOMBINANTE DA *Leishmania infantum*”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelas SEQ. ID. Nº 11 e SEQ. ID. Nº 12, derivada do gene codificante da NTPDase de *Leishmania infantum*, apresentando uma identidade de
15 aminoácidos de 22,13% em relação à proteína GDPase natural de *Leishmania major*, sendo que à porção aminoterminal foram adicionados 42 pares de bases e à porção carboxiterminal são removidos os três últimos nucleotídeos (códon de parada) e adicionados 45 pares de base, possuindo 454 aminoácidos;

**8. “USO DAS E-NTPDases RECOMBINANTES DEFINIDAS NAS
20 REIVINDICAÇÕES 1 a 7”**, caracterizado por ser utilizado na produção de kit de diagnóstico para detecção de anticorpos nas leishmanioses causadas por espécies do gênero *Leishmania*, em compostos vacinais, em desenvolvimento de anticorpos monoclonais, em marcadores de prognóstico, no desenho racional de drogas inibidoras das E-NTPDases que possam ser usadas na quimioterapia das leishmanioses.

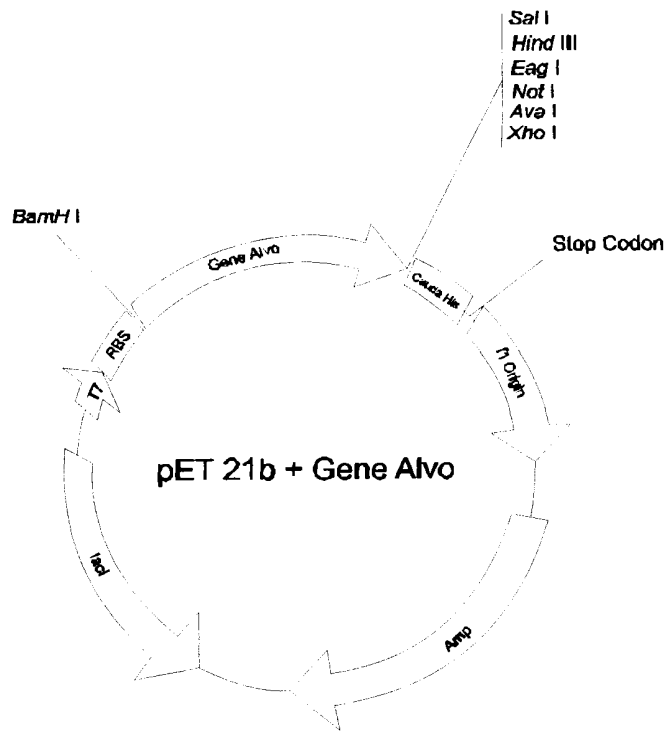


Fig. 1.1

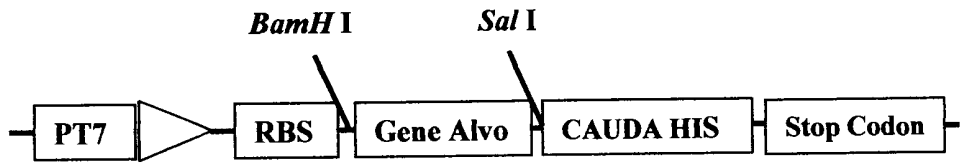


Fig. 1.2

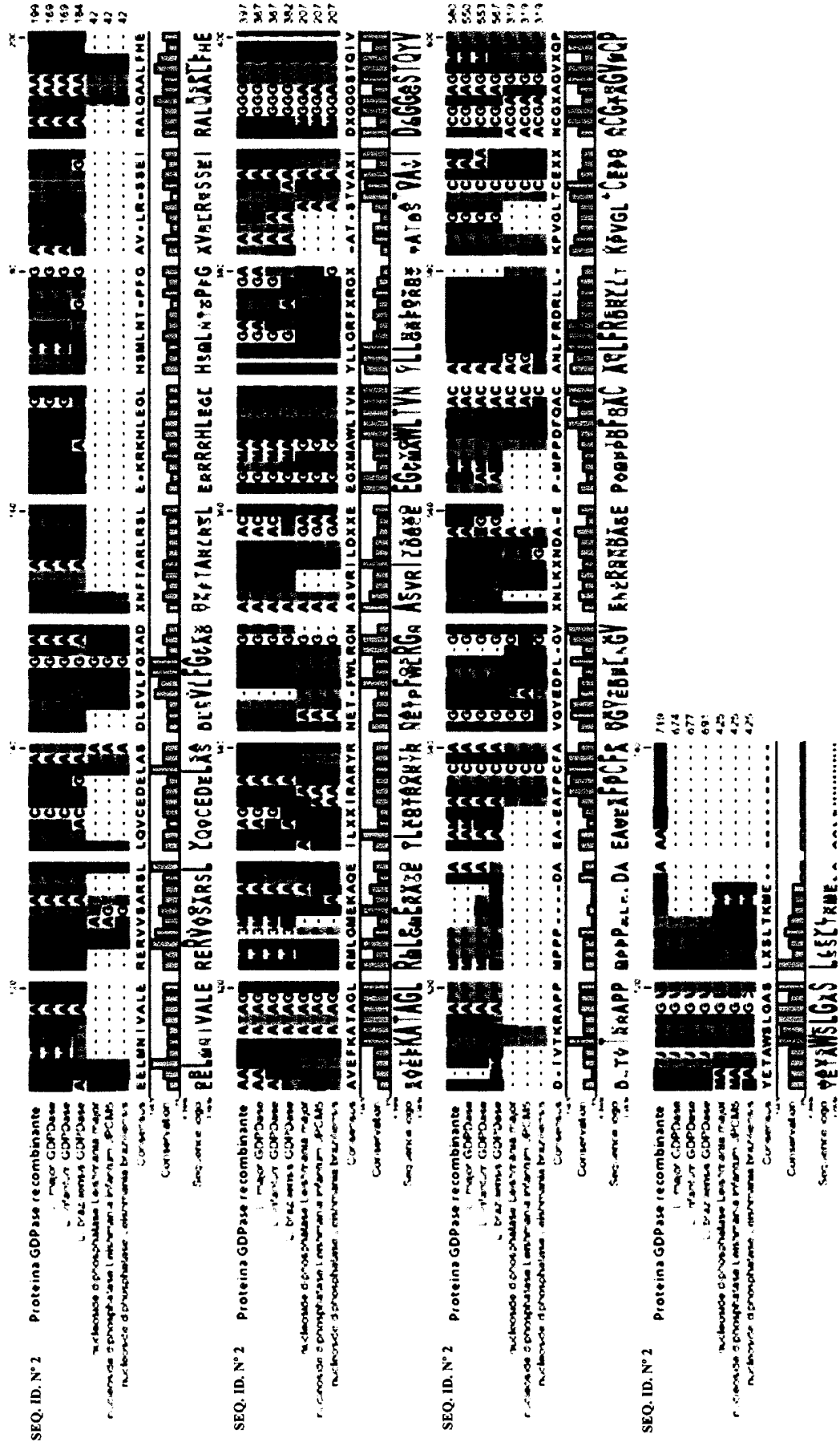


Fig. 2.2

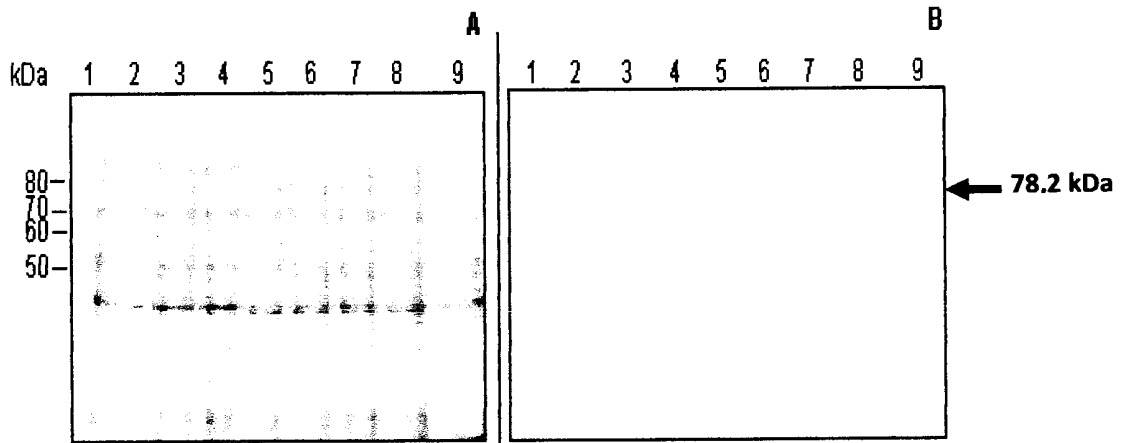


Fig. 3

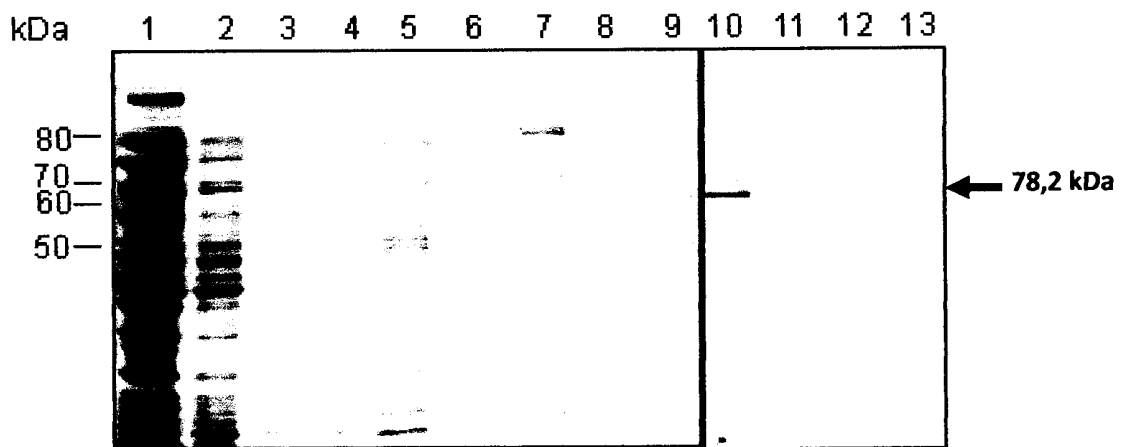


Fig. 4

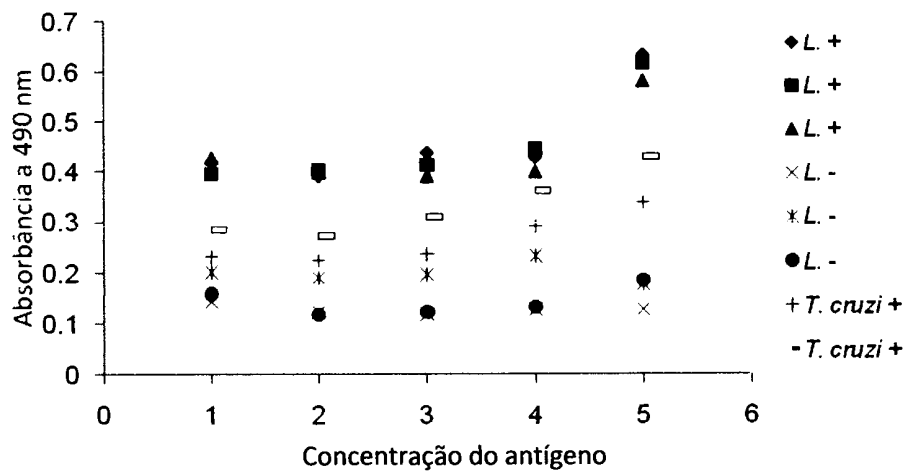


Fig. 5

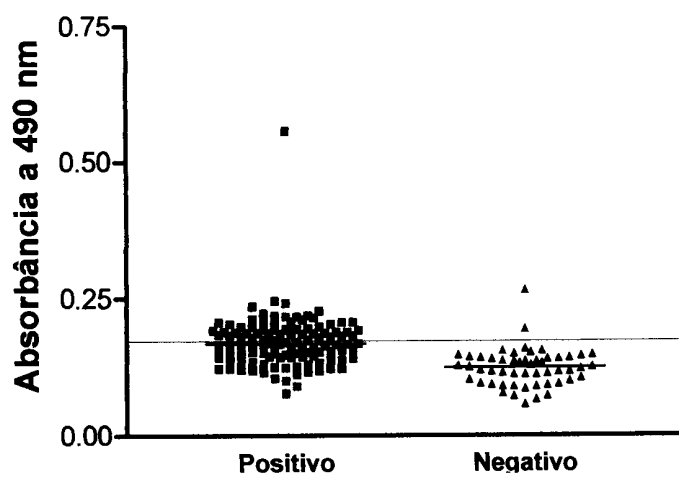


Fig. 6

RESUMO**“E-NTPDases RECOMBINANTES, USO NA PRODUÇÃO DE KIT DE DIAGNÓSTICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS NAS LEISHMANIOSES CAUSADAS POR ESPÉCIES DO GÊNERO *Leishmania*”**

5 Esta invenção refere-se às proteínas da família E-NTPDases recombinantes que podem ser usadas como antígenos em kits de diagnósticos das leishmanioses animais e humanas. As proteínas da família das E-NTPDases recombinantes obtidas poderão ser empregadas na produção de Kits de diagnósticos para a detecção de anticorpos nas leishmanioses, usando testes do tipo imunológicos. Estes testes podem ser aplicados em

10 detecção de indivíduos soropositivos, em programas de controle de leishmanioses ou no diagnóstico laboratorial das leishmanioses. Estas proteínas também poderão ser usadas em ensaios prognósticos e vacinais, no desenho racional de quimioterápicos para o tratamento das leishmanioses e no desenvolvimento de anticorpos monoclonais a serem usados no diagnóstico, prognóstico ou terapia das leishmanioses.

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da Propriedade
Intelectual
Secretaria Internacional



(10) Número de Publicação Internacional
WO 2011/153602 A2

(43) Data de Publicação Internacional
15 de Dezembro de 2011 (15.12.2011)

PCT

- (51) Classificação Internacional de Patentes :
C12N 9/16 (2006.01)
- (21) Número do Pedido Internacional :
PCT/BR2011/000176
- (22) Data do Depósito Internacional :
8 de Junho de 2011 (08.06.2011)
- (25) Língua de Depósito Internacional :
Português
- (26) Língua de Publicação :
Português
- (30) Dados Relativos à Prioridade :
PI1003744-6 8 de Junho de 2010 (08.06.2010) BR
- (71) Requerentes (para todos os Estados designados, exceto US) : UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA [BR/BR]; Campus Universitário, Viçosa, 36570-000 MG (BR). UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO [BR/BR]; Rua Diogo De Vasconcelos, 122, Pilar, 35400-000 Ouro Preto - MG (BR). FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS [BR/BR]; Rua Raul Pompéia, 101, 11º Andar, São Pedro, 30330-080 Belo Horizonte - MG (BR).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Requerentes (para US unicamente) : FIETTO, Juliana Lopes Rangel [BR/BR]; PRC. Fernando Vidigal de Carvalho, 31, Santa Clara,

- 36570-000 Viçosa - MG (BR). LAMÊGO, Márcia Rogéria de Almeida [BR/BR]; São Miguel, 155, Apto 401, Santo Antônio, 36570-000 Viçosa - MG (BR). SOUZA, Ronny Francisco de [BR/BR]; Papa João XXIII, 215, Apto 104, BI 01, Lourdes, 36570-000 Viçosa - MG (BR). ZÓBOLI, Antonio Phelipe Carlette [BR/BR]; Guaxupé, 215, Apto 201, Serra, 30220-320 Belo Horizonte - MG (BR). BAHIA, Maria Terezinha [BR/BR]; Rua Domingos Barroso, 170, Vila dos Engenheiros, 35400-000 Ouro Preto, MG (BR). AFONSO, Luís Carlos Crocco [BR/BR]; Rua Camapuã, 543/402 - Barroca, 30341-035 Belo Horizonte, MG (BR).
- (74) Mandatários : DI BLASI, Gabriel et al.; Rua Do Ouvidor, 121, 11º Andar, Centro, 20040-030 Rio De Janeiro - RJ (BR).
- (81) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,

(Continua na página seguinte)

(54) Title : RECOMBINANT E-NTPDASES, USE FOR PRODUCING A DIAGNOSTIC KIT FOR DETECTING ANTIBODIES IN VARIOUS TYPES OF LEISHMANIASIS CAUSED BY SPECIES OF THE LEISHMANIA GENUS

(54) Título : E-NTPDASES RECOMBINANTES, USO NA PRODUÇÃO DE KIT DE DIAGNÓSTICOS PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS NAS LEISHMANIOSES CAUSADAS POR ESPÉCIES DO GÊNERO LEISHMANIA

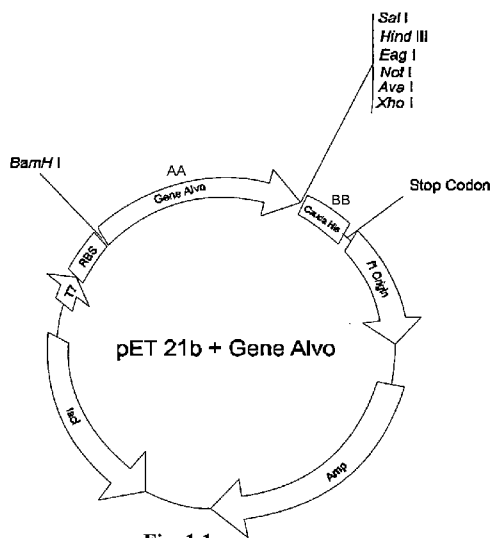


Fig. 1.1

AA Target gene
BB His tail

(57) Abstract : The invention relates to proteins of the family of recombinant E-NTPDases that can be used as antigens in diagnostic kits for various types of animal and human leishmaniasis. The thus obtained proteins of the family of the recombinant E-NTPDases can be used for producing diagnostic kits for detecting antibodies in various types of leishmaniasis, using immunological assays. These tests can be used for the detection of seropositive individuals in leishmaniasis screening programs or in laboratory tests for various types of leishmaniasis. These proteins can also be used in prognostic and immunisation assays, to rationalise the design of chemotherapeutic drugs for the treatment of various types of leishmaniasis and to develop monoclonal antibodies for use in the diagnostic, prognostic or therapy of various types of leishmaniasis.

(57) Resumo : Esta invenção refere-se às proteínas da família E-NTPDases recombinantes que podem ser usadas como antígenos em kits de diagnósticos das leishmanioses animais e humanas. As proteínas da família das E-NTPDases recombinantes obtidas poderão ser empregadas na produção de Kits de diagnósticos para a detecção de anticorpos nas leishmanioses, usando testes do tipo imunológicos. Estes testes podem ser aplicados em detecção de indivíduos soropositivos, em programas de controle de leishmanioses ou no diagnóstico laboratorial das leishmanioses. Estas proteínas também poderão

(Continua na página seguinte)



WO 2011/153602 A2



TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) Estados Designados (*sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,

Declarações sob a Regra 4.17 :

— *relativa à autoria da invenção (Regra 4.17(iv))*

Publicado:

— *sem relatório de pesquisa internacional; será republicado após receção do mesmo (Regra 48.2(g))*

Relatório Descritivo da patente de Invenção para: **"E-NTPDases RECOMBINANTES, USO NA PRODUÇÃO DE KIT DE DIAGNÓSTICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS NAS LEISHMANIOSES CAUSADAS POR ESPÉCIES DO GÊNERO *Leishmania*"**

5 Campo de Aplicação da Invenção

As proteínas da família das E-NTPDases recombinantes obtidas, objeto de pedido de patente, serão empregadas na produção de Kits de diagnósticos para a detecção de anticorpos nas leishmanioses, testes estes do tipo imunológicos. Estes testes podem ser aplicados em detecção de indivíduos soropositivos em programas de controle epidemiológico a campo das leishmanioses ou no diagnóstico laboratorial das leishmanioses. Estas proteínas também poderão ser usadas em ensaios prognósticos, vacinais, na produção de anticorpos monoclonais e no desenho racional de drogas para a quimioterapia das leishmanioses.

15 Estado da Técnica

Sabe-se que as Leishmanioses compreendem um conjunto de enfermidades cujos agentes etiológicos são espécies do gênero *Leishmania*, que são protistas pertencentes à família Trypanosomatidae. A transmissão se dá através da picada do flebotômio fêmea. Dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção e do tipo de hospedeiro, a leishmaniose pode ser dividida classicamente em duas formas clínicas: visceral e tegumentar ou cutânea. A forma visceral se não tratada costuma ser fatal, já as formas cutâneas, apesar de raramente evoluírem para a fatalidade são mutilantes e desagradáveis especialmente quando da existência de múltiplas lesões. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS/WHO) (WHO, 2009, http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/WHO_CDS_NTD_IDM_2007.3_eng

.pdf) a leishmaniose é uma doença de caráter zoonótico que acomete o homem, uma variedade de animais silvestres e domésticos. É uma doença endêmica em 88 países distribuídos em quatro continentes. Mais de 90% dos casos de Leishmaniose cutânea ocorrem no Irã, Afeganistão, Síria, Arábia Saudita, Brasil e Peru e mais de 90% dos casos da forma visceral ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão. Ainda segundo a OMS (WHO, 2009, [http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/WHO_CDS_NTD_IDM_2007.3 eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/WHO_CDS_NTD_IDM_2007.3_eng.pdf)) o número de casos de leishmaniose cutânea (LC) vem crescendo no Brasil nos últimos anos (1988: 21.800 casos; 1999: 30.550 casos; 2000: 35.000 casos). Fato este relacionado ao desenvolvimento econômico e à mudança de hábitos e ambientais que expõem mais a população aos vetores da doença. Um dos principais reservatórios atualmente descrito é o cão, que por sua proximidade com o homem participa ativamente do processo de manutenção da leishmaniose.

A leishmaniose canina tem se tornado foco de vários estudos visto a importância do cão como animal doméstico e a sua relevância como reservatório da doença. Porém o cão não é simplesmente um reservatório de parasitos, pois o mesmo também apresenta a patologia associada à infecção tanto na forma cutânea quanto visceral.

Uma das principais ações empregadas no controle da leishmaniose canina ainda é a eliminação do cão infectado devido ao insucesso da antimonioterapia. Atualmente o tratamento de cães está proibido visto que não há eficácia completa comprovada com as drogas disponíveis.

Na prática clínica, diante da suspeita de infecção os cães passam por vários testes diagnósticos que são muitas

vezes contraditórios e nem sempre tem uma correlação com o estado da doença no cão, dificultando o prognóstico e conseqüente tratamento. Este tipo de constatação levou ao desenvolvimento de técnicas mais específicas baseadas na amplificação de regiões de DNA do parasito por Reação em Cadeia pela Polimerase-PCR (Francino, O., Altet, L., Sanchez-Robert, E., Rodriguez, A., Solano-Gallego, L., Alberola, J., Ferrer, L., Sanchez, A., Roura, X., Veterinary Parasitology 137: 214-221, 2006). Apesar de usualmente demonstrar alta eficiência, o ensaio de PCR tem a desvantagem de ter alto custo e falhas em relação à extração de DNA. O diagnóstico da doença em cães tem sido muito estudado, porém ainda hoje não há um método diagnóstico considerado como padrão e cada laboratório utiliza um método próprio de escolha (Da Silva E. S., Van Der Meide W. F., Schoone G. J., Gontijo C. M. F., Schallig H. D. F. H., Brazil R. P., Veterinary Research Communications 30: 637-643, 2006). Diante disto novos métodos diagnósticos alternativos, mais eficientes, discriminatórios e rápidos são necessários.

A abordagem de proteínas recombinantes para serem usadas no diagnóstico tem sido o foco de muitos pesquisadores (S. Farajnia, B. Darbani, H. Babaei, M. H. Alimohammadian, F. Mahboudi And A.M. Gavgani, Parasitology 135, 1035-1041, 2008; Renato Porrozzi, Marcos V. Santos da Costa, Antonio Teva, Aloísio Falqueto, Adelson L. Ferreira, Claudiney dos Santos, Ana Paula Fernandes, Ricardo T. Gazzinelli, Antonio Campos-Neto and Gabriel Grimaldi, Jr., Clinical And Vaccine Immunology 14: 544-548, 2007).

As E-NTPDases são uma família específica de ecto-nucleotidases, proteínas que são descritas de maneira

geral, como proteínas de membrana ecto localizadas ou solúveis (secretadas) que tem como função primária a degradação de nucleotídeos, principalmente extracelulares, tri e difosfatados (Zimmermann, H., Beaudoin, A. R., Bollen, M., Belgium, Shaker Publishing; 1-9. 1999.)

O interesse nestas enzimas se baseia em dados obtidos na literatura que sugerem a participação de ecto-nucleotidases, entre outras coisas, na virulência, infectividade e aquisição de purinas em parasitos (Barrêdo-Pinho, M., Peres-Sampaio, C. E., Chrispim, P. P. M., Belmont-Firpo, R., Lemos, A. P., Martiny, A., Vannier-Santos, M. A., Meyer-Fernandes, J. R. A Archives of Biochemistry and Biophysics, 391:16-24, 2001). Recentemente, estudando a infecção experimental de camundongos C57BL/6 com *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, ambas causadoras de leishmaniose tegumentar, verificou-se que os animais foram capazes de controlar a infecção por *L. (V.) braziliensis*, mas não por *L. (L.) amazonensis*. A diferença de resposta à infecção foi relacionada a um estado anérgico observado nos animais infectados por *L. (L.) amazonensis* (Maioli, T. U., Erica, T., Arantes, R. M. E., Fietto, J. L. R., Afonso, L. C. C., Parasitol Res 94: 207-212, 2004). Além disto, foi verificado que as células intactas de *L. (L.) amazonensis* foram capazes de hidrolisar uma maior quantidade de nucleotídeos extracelulares de adenosina. Considerando que o ATP extracelular é uma molécula pró-inflamatória e que um dos produtos de sua degradação, a adenosina possui efeito imunossupressor, esta diferença poderia então levar a um efeito antiinflamatório e imunossupressor, como o observado (Maioli, T. U, Erica, T., Arantes, R. M. E., Fietto, J. L.

R., Afonso, L. C. C., Parasitol Res 94: 207-212, 2004). Esta foi a primeira evidência da participação de ectonucleotidases de um parasita no controle da resposta imunológica do hospedeiro.

5 Na busca feita junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI foram encontradas solicitações de patentes nas áreas de imunoterapia e imunodiagnóstico, porém nenhuma destas patentes utiliza produtos relacionados ao objeto desta patente. Nesta busca
10 foi encontrado o documento de patente PI 9406509, que refere-se a "COMPOSTOS, PROCESSO, SUA PREPARAÇÃO, USO DOS MESMOS, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E PROCESSO PARA PROFILAXIA E PARA TRATAMENTO TERAPÊUTICO DE MALÁRIA E DOENÇAS CAUSADAS POR LEISHMANIA, TOXOPLASMA GONDII,
15 PNEUMOCY", onde se descreve o pirrol-amidínicos de fórmula geral e os sais farmacêuticamente aceitáveis dos mesmos, processos para a preparação e composições farmacêuticas contendo-os úteis como antivirótico e antiparasítico. Este documento versa então sobre o uso de formulações
20 farmacêuticas derivadas de compostos pirrol-amidínicos para tratamento e prevenção das leishmanioses. O objeto do pedido de patente em questão é diferente da patente descrita, pois utiliza proteína recombinante para ser usada em diagnóstico, prognóstico, desenvolvimento de anticorpos
25 monoclonais, vacinação e desenvolvimento de quimioterápicos para as leishmanioses. Não há inter-relação entre os mesmos. Porém é importante salientar que no caso de doenças infecciosas é desejável que se tenham métodos alternativos de diagnóstico, prevenção e tratamento visto que existe uma
30 diversidade muito grande de resposta a quimioterapia e vacinação das populações dos hospedeiros, bem como

diferentes susceptibilidades a drogas e produção de resposta imune protetora em relação aos parasitos.

Outro depósito encontrado foi o de nº PI 9807332 que trata de "ANTÍGENOS DE LEISHMANIA PARA UTILIZAÇÃO NA TERAPIA E DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE" onde são 5 demonstradas composições e processos para prevenir, tratar e detectar leishmaniose e estimular respostas imunes em pacientes. A presente invenção não tem sobreposição com esta patente, embora ambas visem aplicações em comum. Os 10 antígenos apresentados na patente PI 9807332 são distintos das proteínas antigênicas desta patente. A aplicação em mesma área se justifica como descrito no item anterior, além disto, a própria patente em questão salienta a necessidade de desenvolvimento de alternativas no 15 diagnóstico, tratamento e profilaxia das leishmanioses que são causadas por mais de 20 espécies diferentes de *Leishmania*.

O depósito de nº 2133236A1 feito no banco da Espanha refere-se a "GEN QUIMÉRICO FORMADO POR LAS SECUENCIAS DE 20 DNA QUE CODIFICAN LOS DETERMINANTES ANTIGÊNICOS DE CUATRO PROTEÍNAS DE *L. infantum*, APLICABLE PARA EL DIAGNÓSTICO SEROLOGICO DE LEISHMANIOSIS CANINA Y PROTEÍNA OBTENIDA" onde se descreve os determinantes antigênicos de quatro proteínas de *L. infantum* (Lip2a, Lip2b, Lip2A, Lip0), que 25 foram aplicadas em diagnóstico de Leishmaniose. Os objetos desta patente são proteínas distintas daquelas que estão sendo patenteadas neste processo, portanto como justificado anteriormente apesar da aplicação poder ser a mesma os antígenos são diferentes. No caso das Leishmanioses, como 30 dito anteriormente, é importante que se tenham proteínas alternativas para serem usadas em diagnóstico, profilaxia e

tratamento, visto que existe grande diversidade de parasitos e hospedeiros.

É um primeiro objetivo da presente invenção, fornecer as proteínas da família das E-NTPDases recombinantes de
5 três espécies de *Leishmania* (*Leishmania major*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania infantum*) homóloga à sua proteína natural, para ser utilizada como antígeno em kits de diagnóstico das leishmanioses.

É objetivo também da presente invenção usar as ditas
10 proteínas e suas variantes, modificadas em suas sequências de aminoácidos, que conservem suas propriedades antigênicas, para o uso em diagnóstico, compostos vacinais, desenvolvimento de anticorpos, marcadores de prognóstico e no desenho racional de drogas inibidoras das E-NTPDases que
15 possam ser usadas na quimioterapia das leishmanioses.

O desenvolvimento de compostos antigênicos capazes de aumentar a eficiência no diagnóstico e efetivação como agente vacinal tem sido busca no âmbito geral da pesquisa em leishmaniose. A proteína GDPase recombinante, conforme
20 visto na Figura 5, aponta como um potente antígeno. O antígeno quando utilizado em diagnóstico em teste de ELISA, foi capaz de discriminar de maneira satisfatória soros de cães contaminados com *Trypanossoma cruzi* dos contaminados com *Leishmania sp.* Desse modo o investimento neste antígeno
25 recombinante como alvo para produção de kit de diagnóstico, bem como para as outras aplicações é muito promissor.

Descrição da Invenção

O primeiro objetivo da presente invenção é alcançado através das proteínas da família das E-NTPDases expressas
30 de forma recombinante, sendo as sequências SEQ. ID. N° 1, SEQ. ID. N° 2, SEQ. ID. N° 3, SEQ. ID. N° 4, SEQ. ID. N° 5,

SEQ. ID. N° 6, SEQ. ID. N° 7, SEQ. ID. N° 8, SEQ. ID. N° 9, SEQ. ID. N° 10, SEQ. ID. N° 11 e SEQ. ID. N° 12 utilizadas como antígeno.

O segundo objetivo da presente invenção é usar as ditas proteínas e suas variantes, modificadas em suas sequências de aminoácidos, que conservem suas propriedades antigênicas, para o uso em diagnóstico, compostos vacinal, marcador de prognóstico, produção de anticorpos monoclonais e desenvolvimento de quimioterápicos para as leishmanioses.

A presente invenção será, a seguir, detalhadamente descrita.

Figura 1.1 - ilustra o esquema do vetor de expressão pET 21b para sistema de expressão em *Escherichia coli* e do cassete de expressão de DNA.

Figura 1.2 - ilustra o inserto de DNA, no caso o gene gi_|15487213|, que foi clonado entre os sítios de restrição BamHI e SalI.

Figura 2.1 - ilustra a comparação das sequências das E-NTPDases de espécies do gênero *Leishmania*. As regiões marcadas com quadros amarelos representam as regiões conservadas das E-NTPDases.

Figura 2.2 - idem a Figura 2.1, continuação.

Figura 3 - a parte A ilustra uma foto de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10%, mostrando proteínas de um lisado de *E. coli* BL21 (DE3) transfectadas com plasmídeo contendo o gene da GDPase de *Leishmania major* expresso em diferentes tempos. A primeira coluna mostra uma proteína NTPDase recombinante de *Trypanosoma cruzi*. As próximas 8 linhas mostram os produtos dos lisados de bactérias após 2 a 4 h de indução com IPTG nas concentrações de 1 mM, 0,8 mM, 0,6 mM, 0,4 mM, 0,3 mM, 0,2 mM, 0,1 mM e sem indução

respectivamente. Os números correspondem aos mostrados por marcador de massa molecular (kDa). A parte B ilustra um resultado de Western blot mostrando a proteína GDPase de *Leishmania major* do lisado de *E. coli* reagindo com anticorpos do soro de coelhos imunizados com a NTPDase recombinante de *T. cruzi*. As linhas de 1 a 8 mostram a reação da proteína GDPase com o soro de coelhos imunizados com NTPDase de *T. cruzi*. A linha 9 mostra ausência de bandas quando não havia indução da proteína GDPase recombinante. A seta indica a reação da proteína com os anticorpos mostrando uma banda de aproximadamente 78 kDa.

Figura 4 - Ilustra uma foto de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10% mostrando a proteína GDPase de *Leishmania major* expressa em *E. coli* BL21 (DE3) após a purificação por cromatografia de afinidade em coluna de Níquel-agarose. A proteína GDPase recombinante de *Leishmania major* pode ser observada nas colunas 10 e 11, após ter sido recuperada em tampão contendo 80 mM e 160 mM imidazol respectivamente. Os números correspondem aos mostrados por marcador de massa molecular (kDa). A proteína GDPase recombinante de *Leishmania major* possui 78,2 kDa.

Figura 5 - gráfico que ilustra o resultado de diagnóstico imunológico por ELISA em que se utilizou como antígeno a proteína GDPase recombinante de *Leishmania major* purificada nas concentrações de 1.5, 3, 4.5 e 30 µg/ml e como controle foi utilizado o extrato total de *Leishmania* sp. lisada na concentração de 3 µg/ml, referenciadas pelos números 1, 2, 3, 4 e 5 respectivamente. Foram testados 8 soros de cães domésticos (*Canis familiaris*) na diluição de 1: 80. Sendo 3 soros de cães sabidamente positivos para *Leishmania* sp. (L+), 3 soros de cães sabidamente negativos

para infecção por *Leishmania* sp. (L-) e 2 soros de cães sabidamente positivos para infecção por *T. cruzi*.

Figura 6 - gráfico que ilustra o resultado de diagnóstico imunológico por ELISA utilizando como antígeno a proteína GDPase recombinante de *Leishmania major* na concentração 1,5 µg/ml. Foram utilizadas 169 amostras de soros de cães, sendo 117 sabidamente positivas e 52 sabidamente negativas.

Descrição Detalhada da Invenção

10 A presente invenção se refere às proteínas da família E-NTPDase recombinantes de *Leishmania major*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*, obtidas a partir da sequência nucleotídica dos genes codificantes destas proteínas com modificações destinadas a aplicações antigênicas, as quais após etapas de preparação de primers para amplificação dos genes alvos, amplificação dos genes codificantes dessas proteínas e clonagem em vetor de expressão, é finalmente expressa e posteriormente purificada por cromatografia de afinidade por Níquel. As

15 ditas proteínas recombinantes assim purificadas podem ser usadas de forma satisfatória no imunodiagnóstico por ELISA e Western-blot, como demonstrado pelo uso da isoforma recombinante GDPase de *L. major* aplicada ao diagnóstico da Leishmaniose canina.

20

25 A presente invenção se refere às proteínas da família E-NTPDases recombinantes identificadas como SEQ. ID. N° 1, SEQ. ID. N° 2, SEQ. ID. N° 3, SEQ. ID. N° 4, SEQ. ID. N° 5, SEQ. ID. N° 6, SEQ. ID. N° 7, SEQ. ID. N° 8, SEQ. ID. N° 9, SEQ. ID. N° 10, SEQ. ID. N° 11 e SEQ. ID. N° 12 as quais

30 poderão ser utilizadas como antígenos em diagnóstico das leishmanioses.

A SEQ. ID. N° 2 derivada do gene codificante da GDPase de *L. major*, apresenta uma identidade de aminoácidos de 93,74% em relação à proteína GDPase natural de *Leishmania major* quando se compara a mesma com relação aos trechos disponíveis no GenBank de 690 aminoácidos predita pelo acesso gi_|15487213|. Adicionalmente a GDPase de *L. infantum* (SEQ ID. N° 6) e *L. braziliensis* (SEQ ID. N° 4) apresentam identidade de 84,49% e 65,75% respectivamente em relação à GDPase recombinante de *L. major*, conforme visualizado na Tabela 1. Esta alta identidade mostra que são proteínas similares, da mesma família. Esta similaridade é suficiente para haver reatividade imunológica cruzada sendo possível utilizar todas estas variantes nas mesmas aplicações descritas para a GDPase, ou seja, diagnóstico, prognóstico e vacinação para as leishmanioses. O mesmo ocorre para as variantes denominadas nucleosídeo difosfatases (NTPDases, descritas como SEQ ID. N° 8, SEQ ID. N° 10 e SEQ ID. N° 12), que apesar de apresentarem menor identidade comparativamente (Tabela 1) apresentam domínios conservados, conforme mostrado nas Figuras 2.1 e 2.2. Sendo assim, as NTPDases recombinantes também são objetos deste pedido de patente e poderão ser usadas nas mesmas aplicações, ou seja, no diagnóstico, prognóstico, vacinação, desenvolvimento de monoclonais e quimioterápicos para as leishmanioses.

Tabela 1 - Relação de Similaridade e Identidade da sequência de aminoácidos da proteína GDPase de *L. major* recombinante modificada com as demais sequências de aminoácidos das E-NTPDases de diferentes espécies de *Leishmania*.

	1	2	3	4	5	6	7
--	---	---	---	---	---	---	---

Proteína GDPase recombinante	1			93, 74	84, 49	65, 75	23, 09	23, 09	22, 13
<i>L. major</i> GDPase	2	674			90, 10	67, 86	24, 49	24, 49	23, 48
<i>L. infantum</i> GDPase	3	610	610			69, 15	23, 67	23, 52	22, 94
<i>L. braziliensis</i> GDPase	4	478	473	482			22, 22	22, 22	21, 52
<i>L. major</i> NTPDase	5	169	169	164	158			92, 00	77, 88
<i>L. infantum</i> NTPDase	6	169	169	163	158	391			79, 29
<i>L. braziliensis</i> NTPDase	7	162	162	159	153	331	337		

Números de 1 a 7 na horizontal representam as respectivas proteínas da vertical. Onde os números se cruzam fornece a identidade no quadrante de cima e similaridade no de baixo.

O gene natural das GDPase de *Leishmania major*,
5 *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* estão disponíveis no GenBank sob os acessos gi_|15487213|, XP_001562788, XP_001463665 respectivamente. O gene de *Leishmania major* possui uma sequência de 2073 nucleotídeos que codifica uma proteína de 690 aminoácidos. O gene de
10 *Leishmania braziliensis* possui uma sequência de 2076 nucleotídeos que codifica uma proteína de 691 aminoácidos. O gene de *Leishmania infantum* possui uma sequência de 2034 nucleotídeos que codifica uma proteína de 677 aminoácidos. As sequências de nucleotídeos recombinantes em relação às
15 naturais apresentam modificações na porção aminoterminal e carboxiterminal. À porção aminoterminal foram adicionados 42 pares de bases. Na porção carboxiterminal foi removido

os três últimos nucleotídeos (códon de parada) e adicionado 45 pares de base. As proteínas recombinantes preditas de *Leishmania major*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*, possuem 719, 720 e 706 aminoácidos respectivamente (SEQ. ID N° 2, SEQ. ID N° 4 e SEQ. ID N° 6).

O gene natural das NTPDase de *Leishmania major*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* estão disponíveis no GenBank sob os acessos XP_001681917, XP_001562178, XM_001464304 respectivamente. Ambas as espécies possuem uma sequência de 1278 nucleotídeos que codifica 425 aminoácidos. A sequência de nucleotídeos recombinantes em relação ao natural apresenta modificações na porção aminoterminal e carboxiterminal. À porção aminoterminal foram adicionados 42 pares de bases. Na porção carboxiterminal foram removidos os três últimos nucleotídeos (códon de parada) e adicionados 45 pares de base, exceto em *Leishmania major* que foram adicionados somente 39 pares de base. Esta diferença se deve ao uso de diferentes sítios de restrição usados no processo de clonagem gênica. As proteínas recombinantes preditas de *Leishmania major*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*, possuem 452, 454 e 454 aminoácidos respectivamente (SEQ. ID N° 8, SEQ. ID N° 10 e SEQ. ID N° 12).

A presente invenção ainda se refere ao uso da proteína GDPase recombinante em kit de diagnóstico para as leishmanioses causadas por espécies do gênero *Leishmania*, compreendendo as E-NTPDases recombinantes, tal como mencionado acima, que são capazes de interagir com anticorpos específicos em amostras de soros ou sangue ou

outros líquidos ou amostras de indivíduos sendo capazes de indicarem a infecção nestes indivíduos humanos ou animais.

A seguir serão descritos experimentos de demonstração que permitirão ilustrar a potencialidade da presente invenção. Resumidamente estes experimentos se baseiam em amostra contendo *Leishmania major* que foi submetida à extração de seu material genômico para isolamento do gene específico codificante da GDPase. Posteriormente a isso, foi feito a amplificação do gene específico por PCR sendo esse clonado em vetor de clonagem e expressão, o qual foi utilizado na transformação de células de *Escherichia coli* que passaram a expressar a proteína GDPase recombinante do protozoário. A proteína GDPase de *Leishmania major*, após purificação foi utilizada como antígeno em testes de ELISA em soros de cães visando à pesquisa de anticorpos da classe IgG contra espécies do gênero *Leishmania*. Esta proteína GDPase recombinante de *Leishmania major*, produzida em larga quantidade, poderá ser amplamente distribuída a laboratórios por todo país e desta forma, contribuir de forma relevante para o diagnóstico sorológico das leishmanioses no Brasil ou no exterior, ou ainda ser usada em kits e aplicações imunológicas vacinais e de produção de anticorpos. Todos os processos descritos neste documento se estendem também as outras isoformas das E-NTPDases das outras espécies de *Leishmania* descritas nas seqüências SEQ. ID. N° 3, SEQ. ID. N° 4, SEQ. ID. N° 5, SEQ. ID. N° 6, SEQ. ID. N° 7, SEQ. ID. N° 8, SEQ. ID. N° 9, SEQ. ID. N° 10, SEQ. ID. N° 11 e SEQ. ID. N° 12 as quais poderão ser também utilizadas como antígenos em diagnóstico das leishmanioses.

30 Experimentos De Demonstração

Isolamento e Clonagem da região codificante da GDPase de

Leishmania major

A cepa utilizada para extração genômica foi a MHOM/IL/80/Friedlin de *Leishmania major*. Para a extração de DNA genômico (DNAg) aproximadamente 1×10^8 células foram
5 recolhidas por centrifugação a 13.000 x g por 2 a 3 min, descartando o sobrenadante foi adicionado 500 a 700 μ L de fenol equilibrado ao "pellet" e deixado a temperatura ambiente (T. A.) por 5 a 10 min. Em seguida foi adicionado de 200 a 400 μ L de 10 mM Tris (pH 8,0) estéril e
10 homogeneizado no vortex. O homogeneizado foi submetido à centrifugação a 13.000 x g por 10 a 12 min e recuperado a fase aquosa sem a interface. A essa foi adicionada de 200 a 400 μ L de uma mistura de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e homogeneizada no vortex. O
15 homogeneizado foi submetido à centrifugação a 13.000 x g por 10 a 12 min e recuperada a fase aquosa sem a interface. A essa foi adicionada de 200 a 400 μ L de clorofórmio e homogeneizado no vortex. Sendo posteriormente centrifugada a 13.000 x g por 10 a 12 min e recuperada a fase aquosa
20 como descrito anteriormente. Em seguida, foi adicionado 1/10 do volume de uma solução de 3 M de acetato de sódio (pH 5,2) e dois volumes de etanol 100% gelado homogeneizando sem vortexar. O homogeneizado foi deixado precipitando por 2 a 3 h no freezer -80 °C, sendo
25 posteriormente centrifugado a 13.000 x g por 20 a 30 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado, adicionando ao precipitado de 250 a 500 μ L de etanol 70% gelado e a amostra foi centrifugada a 13.000 x g por 5 a 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o "pellet" colocado para
30 secar com a tampa do frasco aberta. Posteriormente o "pellet" de DNA seco foi suspenso em 50 a 60 μ L de 10 mM

Tris (pH 8,0) estéril. O DNA genômico foi estocado a - 20 °C e utilizado para isolamento da região codificante do gene da GDPase (gi_|15487213|) contendo 2073 pares de bases por reação da polimerase em cadeia (PCR).

5 Para tanto foram utilizados o oligonucleotídeo direto 5'CGGGATCCCATGCCAATGACTGACG3' que anela no genoma de *Leishmania major* e insere um sítio de restrição para BamH I na extremidade 5' para inserção posterior no vetor de expressão em bactéria pET-21b e oligonucleotídeo reverso
10 5'GCGTCGACGGTAAGAGAGAGAGGAGTGA3', que cria um sítio para Sal I no final da região codificante. Para amplificação do gene foi usado um aparelho termociclador (Programmable Thermal Controller-PTC-100™). A reação foi realizada em um volume total de aproximadamente 50 µL, utilizando 4 µL do DNAg;
15 5,0 µL de tampão 1,5 mM MgSO₄ (fornecido pelo fabricante da Taq DNA Polimerase); 2,4 µL do mix de 2,5mM dNTPs (dCTP, dTTP, dGTP, dATP); 2 µL dos oligonucleotídeos em uma concentração de 20 pmol/µL; 0,5 µL de Taq DNA Polimerase e água ultrapura estéril qsp. O programa utilizado consistiu
20 em 33 ciclos: 94 °C por 4 min; 94 °C por 30 seg; 50 °C por 1 min; 72 °C por 1 min; 72 °C por 5 min; 4 °C até retirada dos tubos. Os produtos finais das reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em 1X TAE (1 mM EDTA; 40 mM Tris-Acetato; em água deionizada) e
25 corado em solução de brometo de etídio (Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T., 1989), para a verificação da formação de uma banda majoritária correspondente ao tamanho do amplicon alvo com aproximadamente 2,1 kb. A eletroforese foi feita a aproximadamente 80 V, utilizando como tampão de corrida TAE. A banda de cerca de 2,1 kb foi purificada do
30 gel de agarose utilizando o Kit "PureLink™ Quick Gel

Extraction" (Invitrogen™) conforme instruções do fabricante. Foi utilizado o sistema TOPO (Invitrogen™) para a subclonagem inicial do gene.

A banda do amplicon foi suspensa em um volume total de aproximadamente 20 µL de água ultra-pura estéril e 5 a 10 µL desta solução foi usada na ligação feita a aproximadamente 16 °C por 10 a 12 h, de acordo com manual do fabricante (TOPO® TA Cloning® Kit for subcloning - Invitrogen). A mistura de ligação (~6 µL) contendo vetor TOPO + amplicon da GDPase, foi adicionada a aproximadamente 100 µL de solução contendo bactérias *E. coli* TOP 10F', previamente tornadas competentes (Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). A mistura foi incubada em gelo por 45 a 60 min, submetida a choque térmico (42 °C) por 1 a 5 min e colocada novamente no gelo. Adicionaram-se 1 a 5 mL de LB-Líquido (1% triptona, 0,5 % extrato de levedura, 1% NaCl, pH 7.5) seguido de incubação a 37 °C por 40 min com agitação de 180 rpm em Shaker TE-420. O volume total dessa mistura foi dividido em três alíquotas e plaqueado em meio sólido LB-Agar (1% triptona, 0,5 % extrato de levedura, 1% NaCl, 1,5% select Agar pH 7.5) contendo ampicilina (5 a 10 mg/mL⁻¹) e incubadas por 12 a 14 h a 37 °C.

Os clones resistentes a ampicilina foram recuperados e utilizados para confirmação da presença do plasmídeo contendo o gene de interesse por PCR e análise de restrição (utilizando *BamH* I e *Sal* I) a partir do plasmídeo extraído por minipreparação plasmidial de acordo com (Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Um dos clones isolados e confirmado foi então submetido a sequenciamento automático

parcial usando iniciadores flanqueadores da região de clonagem em aparelho Mega-Bace de acordo com instruções do fabricante. Os clones que continham a construção foram estocados em meio LB-líquido em tubos de microcentrífuga com 20% de glicerol e mantidos a -80 °C.

Extração do DNA plasmidial

O DNA plasmidial (DNAP) foi extraído pelo método da lise alcalina (Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) como descrito a seguir. Para isso, os clones positivos da transformação com o vetor TOPO, foram crescidos em tubos de rosca individuais contendo 3 mL de LB e 30 µL de ampicilina (5 a 10 mg/mL⁻¹) por 12 a 14 h a 37 °C em 180 a 200 rpm. Após o crescimento um volume de 1,5 mL de cada cultura foi transferido para tubos de microcentrífuga, e as células foram coletadas por centrifugação (Centrífuga 5415C- EPPENDORF) a 12000 x g por 1 a 5 min. O sedimento celular foi lavado com 0,5 a 1 mL de STE (0,1 NaCl, 10 mM Tris.Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0) para retirada de inibidores de endonucleases. Após a centrifugação foram adicionados de 200 a 300 µL da solução I (25 mM Tris.Cl pH 8.0, 10 mM de EDTA e 5mM de D-Glicose) gelada e suspenso vagarosa e completamente o "pellet". Em seguida foram adicionados de 200 a 300 µL da solução II (NaOH 0,2M, SDS 1%) preparada na hora, e os tubos foram invertidos lentamente por 6 a 10 vezes e mantidos no gelo por 5 a 10 min. Após isso, 150 a 300 µL da solução III (3 M Kac, 2 M Hac pH 8.0) gelada foram adicionados e os tubos foram invertidos lentamente 6 a 10 vezes e mantidos no gelo por 5 min. Em seguida os tubos foram centrifugados por 12000 x g por 5 a 10 min e transferidos os sobrenadantes para outros tubos novos onde foram adicionados 5 µL de

RNAse A (10 µg/uL) e mantidos os tubos a 37 °C em banho-maria por 30 a 50 min.

A cada tubo foram adicionados 550 a 700 µL de fenol: clorofórmio (1:1), e os tubos foram invertidos lentamente por cerca de 5 a 10 vezes e centrifugados a 12000 x g por 5 a 10 min. Esse procedimento se repetiu mais uma vez. A fase aquosa foi transferida para tubos novos. Em seguida adicionou-se 550 a 700 µL de clorofórmio e foi realizada nova centrifugação a 12000 x g por 5 a 10 min. A fase superior foi transferida para novos tubos, onde foram adicionados 550 a 700 µL de isopropanol gelado. Os tubos foram invertidos lentamente e mantidos a -70 °C por 10 a 20 min. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 5 a 10 min, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram colocados para secar por 30 a 50 min sobre papel toalha. O precipitado foi lavado com 200 a 400 µL de etanol 70% gelado e centrifugado a 12000 x g por 5 a 10 min. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram colocados para secar por 30 a 50 min. Após estar secos, o DNA plasmidial foi suspenso em 20 a 30 µL de H₂O deionizada. Os clones foram selecionados por análise de restrição utilizando *BamH* I e *Sal* I e confirmados por sequenciamento parcial.

Transferência da região codificante da proteína GDPase recombinante para vetor de expressão em sistema procarioto pET-21b

O vetor de amplificação TOPO contendo o gene, foi submetido à digestão com *BamH* I e *Sal* I. Após a digestão, a mistura do vetor TOPO foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1%.

O inserto relativo à região codificante completa da GDPase foi purificado com kit "PureLink™ Quick Gel

Extraction" (invitrogen™) e ligado, de forma análoga a descrita na subclonagem em TOPO, no vetor pET-21b previamente digerido com as mesmas enzimas e purificado também pelo mesmo kit. A Figura 1.2 mostra um esquema da
5 construção pET-21b-GDPase.

Bactérias *E. coli* TOP 10F', previamente tornadas competentes como descrito acima, foram transformadas com o produto de ligação e foram incubadas em meio líquido LB conforme descrito acima (isolamento do clone contendo o
10 TOPO). A seleção dos clones foi feita por análise de restrição e sequenciamento. Os clones positivos foram estocados em tubos de microcentrifuga, contendo 15 a 30 % de glicerol, e mantidos a temperatura de -70 °C.

Expressão da proteína GDPase recombinante e análise em 15 gel de SDS

A expressão total das proteínas recombinantes foi feita, em média escala, em 250 mL de LB. O cassete de expressão do vetor pET-21b, destacando os sítios de clonagem e sequência de 6 resíduos de histidina na porção
20 carboxi-terminal da proteína recombinante, está esquematizado na Figura 1.2.

Bactérias competentes, da linhagem *E. coli* BL21(DE-3), foram transformadas com a construção pET-21b-GDPase, de modo análogo ao realizado com vetor TOPO. O gene
25 gi_||15487213| codifica um RNAm para a produção de uma proteína de 78,2 kDa cuja sequência de aminoácidos predita está descrita na SEQ. ID. N° 2.

Um total de 45 nucleotídeos extra, correspondentes a
15 aminoácidos a mais na extremidade carboxi-terminal da proteína recombinante foram adicionados à proteína final
30 pela ligação do gene alvo com o vetor pET-21b, que codifica

9 aminoácidos de ligação entre a proteína GDPase e a cauda de hexa-histidina mais 6 de histidinas. Na porção aminoterminal um total de 14 aminoácidos foram inseridos.

Em seguida, realizou-se um pré-inoculo em 5 a 7 mL de meio líquido LB contendo 50 μ L de ampicilina (5 a 10 mg/mL^{-1}) a partir do clone preservado em glicerol. Este pré-inoculo foi incubado por 16 a 20 h a 37 °C sob agitação. Uma alíquota de 2,5 a 5 mL de cultura foi coletada e inoculada em um volume total de 250 mL de LB-líquido contendo 2,5 mL de ampicilina (5 a 10 mg/mL^{-1}). Essa mistura foi incubada a 37 °C sob agitação e o crescimento celular foi acompanhado pela leitura de sua DO_{600} (densidade ótica). Para indução da proteína recombinante modificada usou-se IPTG (isopropyl β -D-thiogalactopyranoside). No momento em que a DO_{600} atingiu cerca de 0,6 a 0,8, foram adicionados aos tubos de cada clone aproximadamente 0,3 mM de IPTG. A incubação prosseguiu por 2 a 4 h a 37 °C sob agitação.

Após a indução a cultura foi centrifugada 3000 x g e o sedimento obtido foi mantido no gelo por 15 a 30 min e suspenso em tampão de lise (50 mM Tris (pH 8.0), 300 mM NaCl, em água destilada), na proporção de 3 a 5 mL por grama de sedimento, contendo 30 a 50 μ L de PMSF (100 mg/mL), 50 a 100 μ L de aprotinina (1 mg/mL), 50 a 100 μ L de pepstatina (1 mg/mL). Em seguida foi adicionado 1 a 5 mg/mL de lisozima e manteve-se no gelo por 30 a 50 min.

Procedeu-se então o rompimento final das células por sonicação por 6 a 10 vezes por 10 a 20 segundos na potência 200 W com intervalo de 10 a 20 segundos no gelo entre cada sonicação. Em seguida adicionou-se 0,1% Triton e o material foi centrifugado por 30 a 50 min a 20400 x g a 4 °C, sendo

armazenado tanto o "pellet" (fração insolúvel) quanto o sobrenadante (fração solúvel) a - 20 °C para posterior purificação da proteína recombinante.

Para determinar a melhor concentração do IPTG a ser usada como padrão para expressão da proteína recombinante, as colônias foram inoculadas em 4 mL de meio líquido LB contendo 40 µL de ampicilina (5 a 10 mg/mL⁻¹) e incubadas a 37 °C por 12 a 14 h sob agitação. Uma alíquota de 250 a 500 µL de cultura foi coletada e diluída para um volume total de 5 a 10 mL em 11 tubos. Essa mistura foi incubada a 37 °C sob agitação e o crescimento celular foi acompanhado pela leitura de sua DO₆₀₀.

Quando a cultura atingiu DO₆₀₀ de aproximadamente 0,6 a 0,8, aliquotou-se 1 a 5 mL da cultura (controle não induzido), em seguida foram adicionados aos outros tubos, IPTG na concentração seriada de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1 mM. A incubação prosseguiu por 2 a 4 h a 37 °C sob agitação. Ao final deste tempo 1 mL de cada cultura foi coletado (controles induzidos) e feita a leitura de DO₆₀₀. As amostras (controles induzidos e não induzido) foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o sedimento bacteriano misturado com tampão de amostra de SDS-PAGE (62,5 mM Tris.HCl pH 6.8, 10% SDS, 0,01% azul de bromofenol (ABF), 10% glicerol e 20 mM de β-mercaptoetanol). As amostras foram aquecidas a 100 °C por 5 a 10 min. Os lisados bacterianos foram analisados por SDS-PAGE 10% de acordo com Laemmli, U. K., Nature. 227(259): 680-5, 1970. Foi utilizado o sistema de eletroforese vertical Mini-PROTEAN® (BIO-RAD) pequeno (1mm de espessura). As amostras foram aplicadas na DO₆₀₀ 3,0 a 5,0, para um volume total de 20 µl por canaleta, e após a

eletroforese o gel foi corado com Comassie blue. O padrão de peso molecular utilizado foi o PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Figura 3, na parte A).

Purificação da proteína GDPase recombinante e análise em gel de SDS

Para purificação da proteína recombinante foram empregadas as amostras do sobrenadante (solúvel). Estas amostras foram mantidas sobre agitação na presença de 500 a 700 µL da resina HIS-Select™ Nickel Affinity Gel devidamente preparada segundo o fabricante, em tubos de 15 mL por 1 a 3 horas a 4 °C. Posteriormente o material foi passado em uma coluna, contendo lã de vidro na extremidade abaixo para impedir perda da resina, e as proteínas não ligadas à coluna foram recuperadas no volume separado da resina. O fluxo foi dependente somente da pressão atmosférica não sendo padronizado.

Após a saída de todo material líquido visível da coluna, manualmente preparada pela imobilização da resina de afinidade a uma seringa de 10 mL, a esta foi adicionado um volume de 2 a 4 mL de tampão de lavagem 1 (50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl₂, 5 mM MgCl₂). Esse procedimento se repetiu por 2 a 4 vezes. Em seguida foi adicionado um volume de 2 a 4 mL de tampão de lavagem 2 (50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl₂, 5 mM Imidazol, 5 mM MgCl₂). Esse procedimento foi repetido por 2 a 4 vezes. Em seguida foi adicionado um volume de 2 a 4 mL do tampão de lavagem 3 (50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl₂, 10 mM Imidazol, 5 mM MgCl₂). Esse procedimento foi repetido por 2 a 4 vezes. Posteriormente as proteínas mais fortemente ligadas à resina foram eluídas em tampão de eluição. Um volume de 1,5 a 3 mL do tampão de eluição 1 (50 mM Tris pH 8.0, 300 mM

NaCl₂, 80 mM Imidazol, 5 mM MgCl₂), foi adicionado. Após término desta eluição, um volume de 1 a 3 mL do tampão de eluição 2 (50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl₂, 160 mM Imidazol, 5 mM MgCl₂) e finalmente um volume de 1 a 3 mL de
5 tampão de eluição 3 (50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl₂, 250 mM Imidazol, 5 mM MgCl₂) se procedeu como o primeiro. O processo de eluição 3 se repetiu por mais uma vez. As amostras de todos os passos de purificação foram coletadas em tubos de microcentrifuga e estocadas a 4°C e analisadas
10 em gel de SDS 10% corado com Comassie blue. As amostras foram aplicadas em um volume total de 20 µl (Figura 4).

Western Blot

Várias amostras do processo de purificação foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE 10% e transferidas sob
15 corrente elétrica para membrana de nitrocelulose sob a condição de transferência de 200-250 mA por 2 a 4 h em sistema de transferência vertical Mini-PROTEAN® 3 Cell Assembly Guide. Após a transferência a membrana foi corada com Ponceau S (Ponceau 0,2% em ácido acético 1,0%) por 10 a
20 30 min para visualização das bandas protéicas e marcação da região das bandas do padrão de massa molecular. Em seguida a membrana foi descorada com água destilada e colocada em solução de bloqueio com incubação por 1 a 3 hora em temperatura ambiente utilizando o tampão TBS-T (0,01 M
25 Tris; 0,14 M NaCl; 0,1% Tween 20) contendo 5% de leite desnatado.

Posteriormente a membrana passou por uma rápida lavagem em tampão TBS (0,01 M Tris; 0,14 M NaCl) e em seguida foi feita a incubação com o anticorpo primário
30 anti-rNTPDase de *T. cruzi* 1:1000 diluídos em tampão TBS-T por cerca de 16 a 20 h à 100 rpm. Posteriormente a membrana

passou por 3 a 6 lavagens com tampão TBS-T por 5 a 10 min, sob leve agitação constante. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, na diluição de 1:20.000. A membrana foi deixada sob agitação a 100 a 200 rpm por 1 a 3 horas. Em seguida, a membrana passou por mais 3 a 6 lavagens com tampão TBS-T por 5 a 10 min, sob as mesmas condições de agitação. A revelação foi realizada com substrato diaminobenzidina (DAB) em solução contendo 50 mM Tris (pH 7,6); 10 mg DAB; 10 µL H₂O₂ (20%) na ausência de luz por aproximadamente 10 min. Após a revelação a membrana foi tirada com auxílio de uma pinça, parada a reação com água, seca sob papel toalha e a imagem foi digitalizada (Figura 3, parte B).

15 **Ensaio de ELISA indireto usando a GDPase recombinante de *L. major* como antígeno**

Nos experimentos de ELISA para análise da reatividade da proteína recombinante purificada foram utilizados 8 soros de cães previamente diagnosticados, sendo 3 soros positivos de cães infectados com *Leishmania* sp., 3 soros de animais negativos e 2 soros positivos de cães infectados com *T. cruzi*.

Para adsorção da rGDPase, placas de micro-diluição foram expostas a uma solução contendo 1,5, 3, 4,5 e 30 µg da proteínaGDPase recombinante purificada em tampão 0,1 M carbonato/bicarbonato pH 9.6 e incubadas *overnight* a 4 °C. Os sítios inespecíficos foram bloqueados incubando-se a placa com solução de bloqueio contendo 5% de soro fetal bovino (SFB) em PBS por uma hora a 37 °C. Posteriormente, a placa foi lavada 3 a 6 vezes com PBS-T (PBS com 0,05% Tween-20) para retirar o excesso de solução de bloqueio.

Após as lavagens, o soro foi adicionado na diluição de 1:80. A reação contendo o soro foi incubada por 1 a 3 horas por 37 °C. A lavagem prosseguiu da mesma maneira como descrito anteriormente. A reação com o anticorpo anti-IgG de cão conjugado a peroxidase na diluição 1:5000, foi incubada por 1 a 3 horas por 37 °C. A placa foi novamente lavada conforme descrito acima. A reação da proteína GDPase recombinante com anticorpos foi evidenciada através de revelação com 5 a 10 mg/mL de o-fenilenodiamina (OPD) e 0,01% H₂O₂, em tampão citrato-fosfato (0,1 M ácido cítrico, 0,2 M fosfato de sódio pH 5,0), por 15 a 30 min. A reação foi interrompida pela adição de 32 a 40 µL de uma solução 2,5 M H₂SO₄. A intensidade da reação, relacionada à intensidade da coloração, foi determinada pela leitura de absorbância a 490nm (Labsystems iEMS). A análise dos dados foi feita no programa Excell (Figura 5) onde se pode ver o reconhecimento positivo com maior leitura de absorbância dos soros sabidamente positivos para leishmaniose em relação aos soros negativos e de cães com doença de Chagas.

A GDPase recombinante foi posteriormente usada em ensaio com maior número de amostras (Figura 6) mostrando um bom reconhecimento específico na maioria dos soros positivos e negativos utilizados no teste. Análises estatísticas destes dados mostraram Especificidade de 90,3%, Precisão de 72,1% e Sensibilidade de 44,1 %.

Estes resultados em conjunto mostram de forma clara a potencialidade de uso de proteínas da família E-NTPDase de *Leishmania* como antígenos para o diagnóstico da Leishmaniose.

REIVINDICAÇÕES

1. E-NTPDases recombinantes do gênero *Leishmania* **caracterizadas por** serem homólogas as proteínas naturais, obtidas a partir da sequência nucleotídica dos genes codificantes destas proteínas, incluindo as SEQ. ID. N° 1, SEQ. ID. N° 2, SEQ. ID. N° 3, SEQ. ID. N° 4, SEQ. ID. N° 5, SEQ. ID. N° 6, SEQ. ID. N° 7, SEQ. ID. N° 8, SEQ. ID. N° 9, SEQ. ID. N° 10, SEQ. ID. N° 11 e SEQ. ID. N° 12, e quaisquer variação distinta das referidas sequências, desde que destinadas a conservarem as suas propriedades antigênicas;

2. E-NTPDase recombinante da *Leishmania major*, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelas** SEQ. ID. N° 1 e SEQ. ID. N° 2, derivada do gene codificante da GDPase de *Leishmania major*, apresentando uma identidade de aminoácidos de 93,74% em relação à proteína GDPase natural de *Leishmania major*, sendo que à porção aminoterminal são adicionados 42 pares de bases e à porção carboxiterminal são removidos os três últimos nucleotídeos (códon de parada) e adicionados 45 pares de base, possuindo 719 aminoácidos;

3. E-NTPDase recombinante da *Leishmania braziliensis*, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelas** SEQ. ID. N° 3 e SEQ. ID. N° 4, derivada do gene codificante da GDPase de *Leishmania braziliensis*, apresentando uma identidade de aminoácidos de 65,75% em relação à proteína GDPase recombinante da *Leishmania major*, sendo que à porção aminoterminal são adicionados 42 pares de bases e à porção carboxiterminal são removidos os três últimos nucleotídeos (códon de parada) e adicionados 45 pares de base, possuindo 720 aminoácidos;

4. E-NTPDase recombinante da *Leishmania infantum*, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelas** SEQ. ID.

Nº 5 e SEQ. ID. Nº 6, derivada do gene codificante da GDPase de *Leishmania infantum*, apresentando uma identidade de aminoácidos de 84,49% em relação à proteína GDPase recombinante da *Leishmania major*, sendo que à porção aminoterminal são adicionados 42 pares de bases e à porção carboxiterminal são removidos os três últimos nucleotídeos (códon de parada) e adicionados 45 pares de base, possuindo 706 aminoácidos;

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
160
165
170
175
180
185
190
195
200
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
255
260
265
270
275
280
285
290
295
300
305
310
315
320
325
330
335
340
345
350
355
360
365
370
375
380
385
390
395
400
405
410
415
420
425
430
435
440
445
450
455
460
465
470
475
480
485
490
495
500
505
510
515
520
525
530
535
540
545
550
555
560
565
570
575
580
585
590
595
600
605
610
615
620
625
630
635
640
645
650
655
660
665
670
675
680
685
690
695
700
705
710
715
720
725
730
735
740
745
750
755
760
765
770
775
780
785
790
795
800
805
810
815
820
825
830
835
840
845
850
855
860
865
870
875
880
885
890
895
900
905
910
915
920
925
930
935
940
945
950
955
960
965
970
975
980
985
990
995

5. "NTPDase recombinante da *Leishmania major*", de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelas** SEQ. ID. Nº 7 e SEQ. ID. Nº 8, derivada do gene codificante da NTPDase de *Leishmania major*, apresentando uma identidade de aminoácidos de 23,09% em relação à proteína GDPase natural de *Leishmania major*, sendo que à porção aminoterminal foram adicionados 42 pares de bases e à porção carboxiterminal são removidos os três últimos nucleotídeos (códon de parada) e adicionados 39 pares de base, possuindo 452 aminoácidos;

6. "NTPDase recombinante da *Leishmania braziliensis*", de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelas** SEQ. ID. Nº 9 e SEQ. ID. Nº 10, derivada do gene codificante da NTPDase de *Leishmania braziliensis*, apresentando uma identidade de aminoácidos de 23,09% em relação à proteína GDPase natural de *Leishmania major*, sendo que à porção aminoterminal foram adicionados 42 pares de bases e à porção carboxiterminal são removidos os três últimos nucleotídeos (códon de parada) e adicionados 45 pares de base, possuindo 454 aminoácidos;

7. "NTPDase recombinante da *Leishmania infantum*", de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelas** SEQ. ID. Nº 11 e SEQ. ID. Nº 12, derivada do gene codificante da NTPDase de *Leishmania infantum*, apresentando uma identidade de aminoácidos de 22,13% em relação à proteína GDPase

natural de *Leishmania major*, sendo que à porção aminoterminal foram adicionados 42 pares de bases e à porção carboxiterminal são removidos os três últimos nucleotídeos (códon de parada) e adicionados 45 pares de base, possuindo 454 aminoácidos;

8. Uso das E-NTPDases recombinantes conforme definidas nas reivindicações 1 a 7, **caracterizado por** ser utilizado na produção de kit de diagnóstico para detecção de anticorpos nas leishmanioses causadas por espécies do gênero *Leishmania*, em compostos vacinais, em desenvolvimento de anticorpos monoclonais, em marcadores de prognóstico, no desenho racional de drogas inibidoras das E-NTPDases que possam ser usadas na quimioterapia das leishmanioses.

1/5

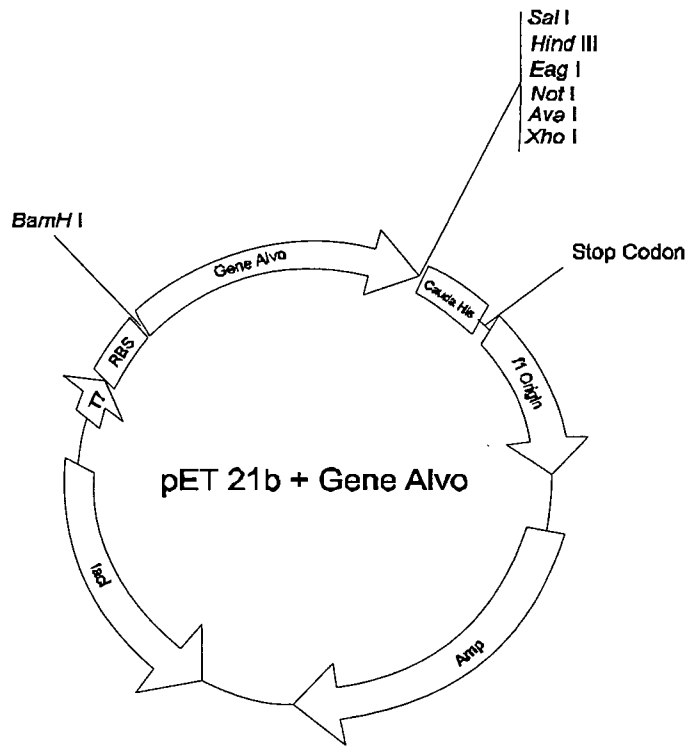


Fig. 1.1

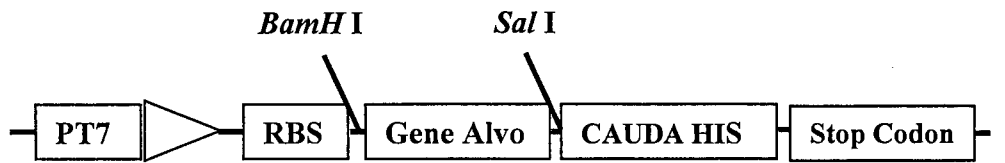


Fig. 1.2

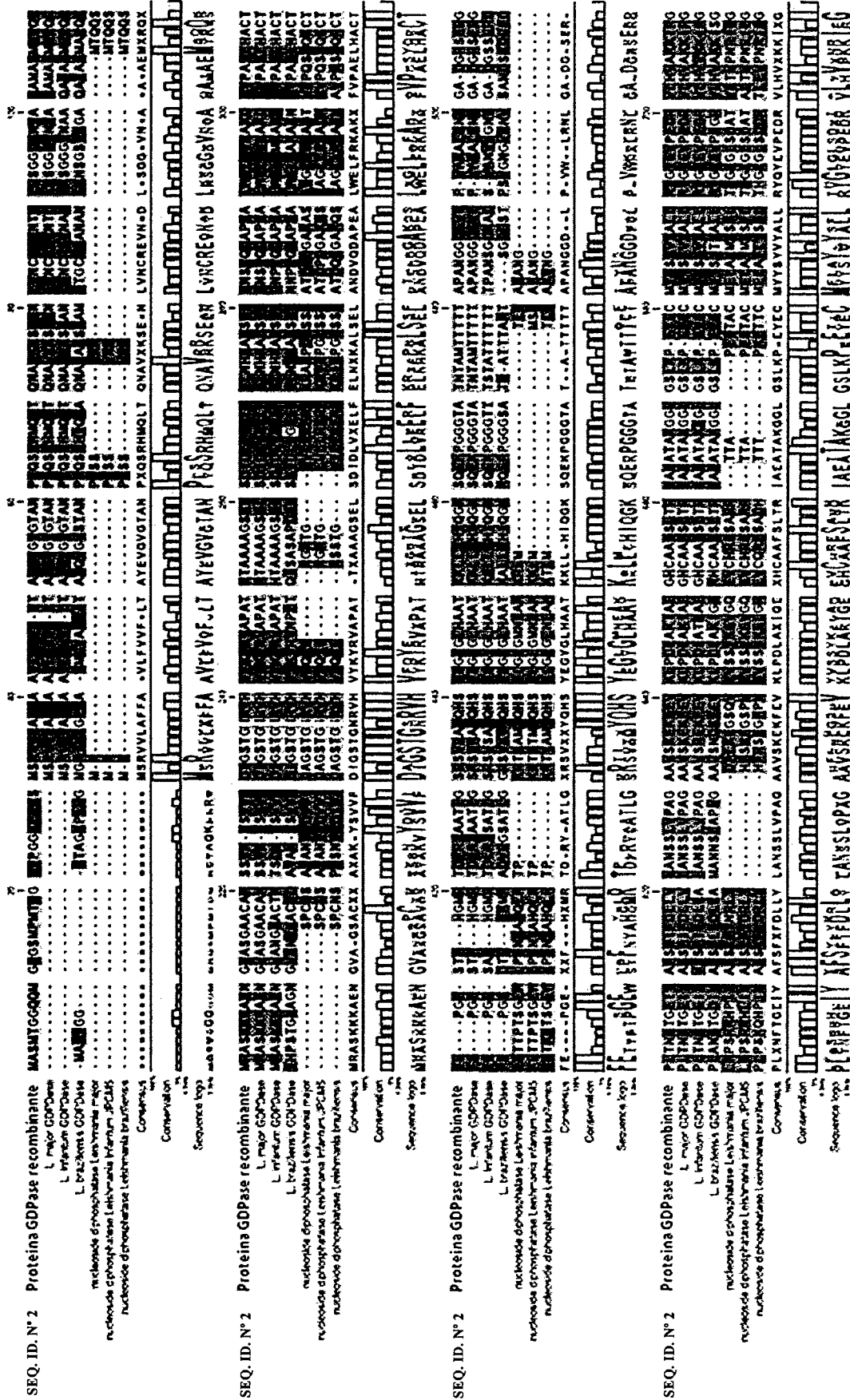


Fig 2.1

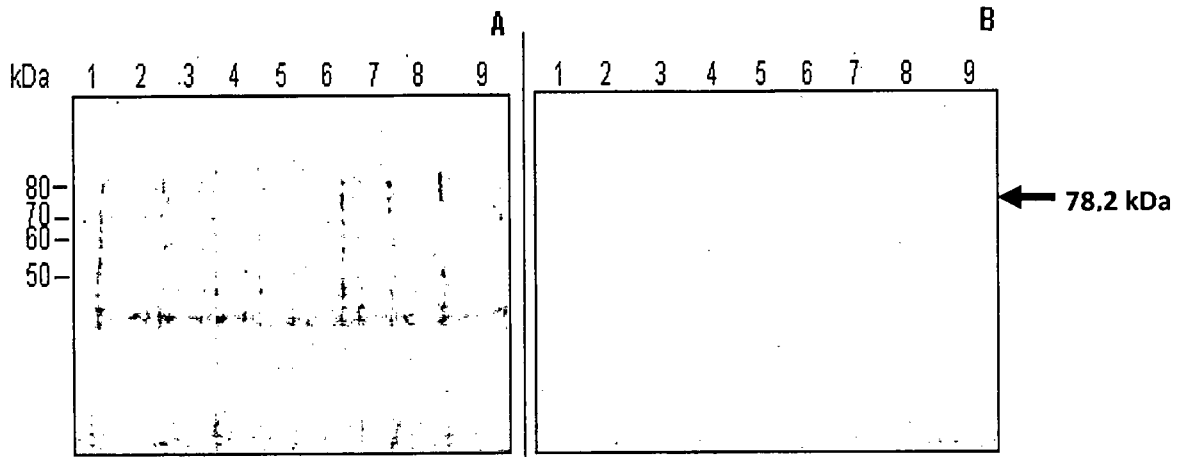


Fig. 3

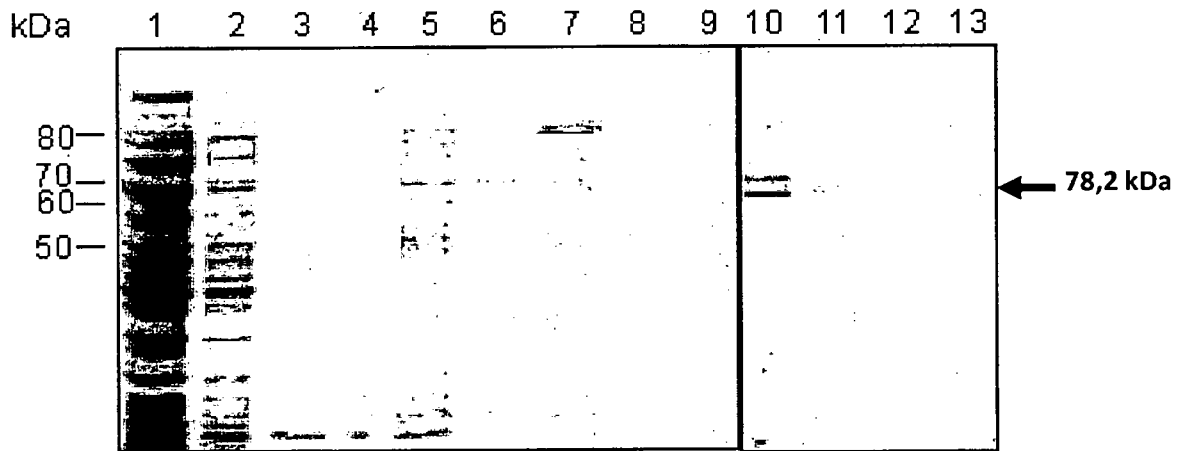


Fig. 4

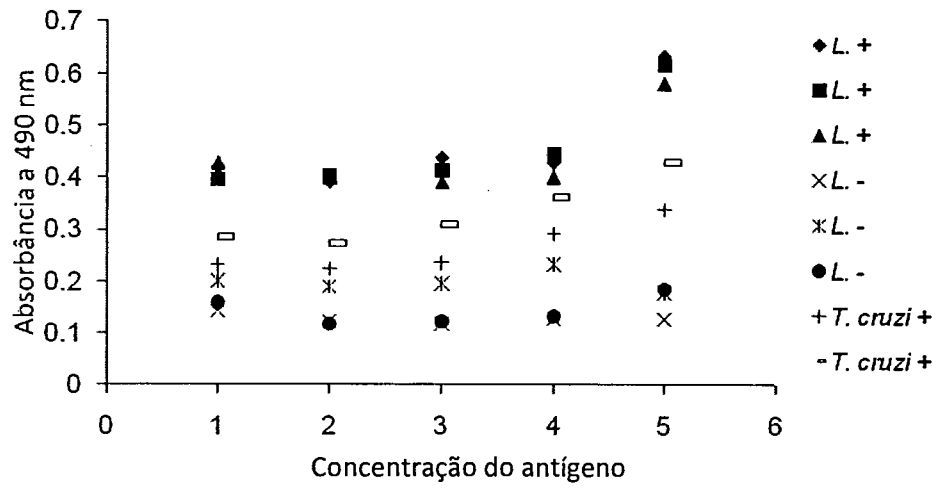


Fig. 5

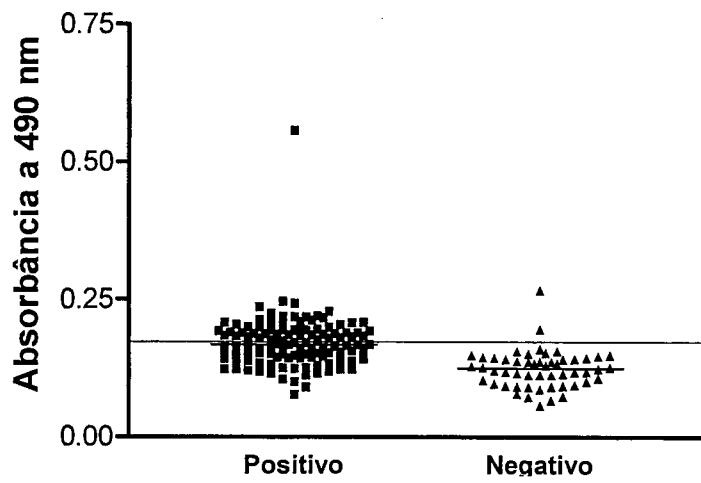


Fig. 6

1 **Recombinant *Leishmania (Leishmania) infantum* Ecto-Nucleotidase**
2 **NTPDase-2 as a New Antigen in Canine Visceral Leishmaniasis Diagnosis**

3

4 Ronny Francisco de Souza¹, Yaro Luciolo dos Santos¹, Raphael de Souza
5 Vasconcellos^{1,2}, Lucas Pereira Borges¹, Ivo Santana Caldas³, Márcia Rogéria de
6 Almeida¹, Maria Terezinha Bahia³, *Juliana Lopes Rangel Fietto^{1,2}.

7

8 ¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Viçosa,
9 Viçosa, CEP 36570-000, MG, Brazil.

10 ² National Institute of Biotechnology in Medicinal Chemistry Structural and
11 Infectious Diseases-INBEQMeDI

12 ³Laboratório of Chagas' Disease, Center for Research in Biological Sciences,
13 Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, CEP 35400-000, MG, Brazil.

14

15 *Corresponding author. Tel.: +55 031 31 38993042; Fax + 55 031 31 38992374.

16 E-mail addresses: jufietto@ufv.br or jufietto@gmail.com (J. L. R. Fietto)

17

18 *Correspondence Address- Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular,
19 Universidade Federal de Viçosa, Av. P.H.Rolfs s/n, Viçosa, CEP-36570-000, MG,
20 Brazil, E-mail to wich the proofs should be sent: jufietto@ufv.br and

21 jufietto@gmail.com (J. L. R. Fietto)

22

23

24

25 **ABSTRACT**

26 Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) is actually an important public health
27 concern. In the epidemiological context of human visceral leishmaniasis, dogs are
28 considered to be the main reservoir of *Leishmania* parasites; therefore, canines
29 constantly need to be epidemiologically monitored in endemic areas. Furthermore,
30 canine to human transmission has been correlated with the emerging urbanization
31 and increasing rates of Leishmaniasis infection worldwide. The increase in
32 Leishmaniasis prevalence has been observed in the non-endemic areas of both
33 endemic and non-endemic countries. *Leishmania infantum* (synonym of
34 *Leishmania infantum*) is the etiologic agent of visceral Leishmaniasis in the New
35 World. In this work, a new *Leishmania chagasi* recombinant antigen, named
36 nucleoside diphosphatase (rLic-NTPDase-2), to be used in the immunodiagnosis
37 of VCL was produced and validated. The predicted genetic region encoding the
38 extracellular domain of nucleoside diphosphatase was cloned and expressed in the
39 pET21b-*Escherichia coli* heterologous expression system. Purification of rLic-
40 NTPDase-2 was performed using Ni-affinity chromatography. Thereafter, indirect
41 ELISA assays were used to detect the purified rLic-NTPDase-2 antigen with a
42 standard canine sera library. This library contained 48 VCL-positive samples from
43 an endemic area, 26 Leishmaniasis-negative health samples from a non-endemic
44 area, and 48 samples from *Trypanosoma cruzi*-infected dogs. *T. cruzi* is the main
45 pathogenic agent that usually contributes to false-positive Leishmaniasis diagnosis.
46 The results show a high sensitivity of 100% (95% CI = 92.60% to 100.0%) and a
47 high specificity of 100% (95% CI = 86.77% to 100.0%), with a high degree of
48 confidence ($k = 1$). These findings demonstrate the potential use of this

49 recombinant protein in immune diagnosis of canine leishmaniasis. They also
50 demonstrate the possibility of its application to other diagnostic approaches, such
51 as fast lateral flow assays and human Leishmaniasis diagnosis.

52

53 **KEYWORDS** Canine Leishmaniasis; Immunodiagnosis; Recombinant Protein; rLic-
54 NTPDase-2.

55

56

57 **INTRODUCTION**

58 Visceral Leishmaniasis (VL) affects millions of people along with many wild and
59 domestic mammals worldwide. In the New World, VL is a zoonose caused by
60 *Leishmania infantum* (synonymous with *Leishmania infantum* (**Maurício et al.,**
61 **2000; Dantas-Torres and Brandão-Filho, 2006**). The World Health Organization
62 (WHO) estimates that 500,000 new cases occur annually, and approximately 90%
63 of these are found in Bangladesh, Brazil, India, and Sudan. Recent publications
64 have reported the expansion of VL to areas previously considered non-endemic,
65 such as North America and Europe (**Petersen, 2009; Ready, 2010**). The increase
66 in both the number of VL human cases and its prevalence in the New World have
67 been linked to environmental changes . These changes are a result of human
68 actions, such as migration between endemic and non-endemic regions, and
69 adaptation of the vector *Lutzomyia longipalpis* to persist in domestic locations and
70 domestic reservoirs, such as the dog (**Palatinik-de-Souza et al., 2001; Dantas-**
71 **Torres and Brãndao-Filho, 2006**). Dogs are the primary domestic reservoir of

72 *Leishmania* parasites in endemic areas in the New World (**Tesh 1995; Mauricio et**
73 **al., 2000; Lainson & Rangel 2005).**

74 Some endemic regions, such as Brazil, have used euthanasia of infected
75 dogs as a strategy to control Canine Visceral Leishmaniasis (CVL). These
76 practices, however, have not been effective in reducing the levels of incidence in
77 human disease. There are two reasons why these efforts may not be succeeding.
78 One explanation is the delay between blood collection, sample analysis, and
79 sacrificing the infected dog. The second is a result of the persistence of dogs with
80 false-negative tests for CVL due to the low sensitivity of the current methods of
81 diagnosis (Dantas-Torres, 2007; Lemos et al., 2008).

82 Diagnostic techniques based on visualization of the parasite in smears of
83 bone marrow, spleen, liver, and lymph node aspirates are invasive, time-
84 consuming, and inappropriate for epidemiological surveillance (Piarroux et al.,
85 1994; Ikononopoulos et al., 2003). Currently, the serological tests used for
86 diagnosis include Direct Agglutination Test (DAT), Indirect Immunofluorescence
87 Assays (IFA) and Enzyme Linked Immune Diagnosis Assay (ELISA) (Gomes et al.,
88 2008). These conventional methods, however, generate false-positive results in
89 dogs infected with other parasites; cross-reactivity with antigens from co-infected
90 parasites limits the specificity of these serological tests for CVL. In Chagas
91 disease-endemic areas, the cross-reactivity between *Leishmania* and
92 *Trypanosome cruzi* antigens is a serious concern. Because these organisms are
93 closely related and most testing utilizes partial or total parasite extract as the
94 antigenic source, these diagnostic techniques can lead to inconsistent results (El
95 Amin et al., 1986; Harith et al., 1987; Barbosa de Deus et al., 2002). In endemic

96 areas of Brazil, an alternative approach using biochemically purified *Leishmania*
97 ribosomal proteins (LPRs) from promastigotes in ELISA assays provides better
98 results; this diagnostic assay has a sensitivity and specificity of 100% and 98.2%,
99 respectively (Coelho et al., 2009). Nonetheless, the manipulation of live parasites
100 to purify these antigens introduces the risk of accidental infection. It also increases
101 the difficulty in obtaining standard lots of purified antigens because of the natural
102 fluctuations in the expression of general proteins as well as LPR.

103 According to Gomes et al. (2008), the specificity of serological tests has recently
104 improved with the use of purified recombinant antigens that are directed toward the
105 diagnosis of CVL. Scalone et al. (2002) used the recombinant K39 ELISA as a
106 prototype in the evaluation of dogs with parasitological evidence and that were IFA
107 positive for VCL. Their technique reached a sensitivity and specificity of 97.1% and
108 98.8%, respectively, in serum isolated from Italian dogs. The K39 antigen,
109 however, did not demonstrate promising results in other regions of the world, such
110 as African countries (Boelaert et al., 2008). The use of a chimeric protein
111 containing epitopes derived from the ribosomal proteins PSL2 and LiP2b and
112 histone H2A LiP0 led to high sensitivity and specificity for diagnosis of visceral
113 leishmaniasis in serum obtained from dogs in two different Spanish regions (Soto
114 et al., 1998). In spite of this, there are many antigens that could be used in CVL
115 immune diagnosis. This area is an open field of research because there is
116 heterogeneity in the successful use of antigens around the world, and new
117 antigens, specifically recombinant antigens, are still need (Gomes et al., 2008). To
118 this effect, molecules involved in the infection process and in parasite-host
119 interactions have great potential to be used in various approaches, such as the

120 development of more accurate diagnostic methods (Gomes et al., 2007; Moreira et
121 al., 2007).

122 The Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphhydrolases (ENTPDases)
123 seem to be promising new targets because they are expressed in the infectious
124 forms of trypanosomatides, which are important for the infection process (Fietto et
125 al. 2004; Maioli et al., 2004; Marques-da-Silva, et al., 2008, Santos et al. 2009; De
126 Souza, et al., 2010). According to Zimmermann (2000), the E-NTPDases, also
127 called ecto-apyrase or ATPDases, are enzymes that act in the conversion of
128 extracellular triphosphate and diphosphate nucleotides to monophosphate
129 nucleotides. These extracellular nucleotides have numerous physiological
130 functions in vertebrate hosts, including the regulation of immune responses.
131 *Leishmania* species that have sequenced genomes (Smith et al., 2007) show the
132 presence of two genes encoding E-NTPDases: guanosine diphosphatase and
133 nucleoside diphosphatase. The former is the larger isoform (~70 kDa) and is
134 homologous to NTPDase-1 in *T. cruzi* (Fietto et al., 2004), and the latter is a
135 smaller isoform that is not present in *T. cruzi* and that we are naming NTPDase-2
136 (~45 kDa).

137 In this work, the *Leishmania infantum* NTPDase-2 coding region was cloned
138 and used to select only the region that encoded the soluble domain of NTPDase-2
139 protein (from amino acids L41 to E425). The soluble domain was cloned and
140 expressed in an *E. coli* vector, producing a recombinant protein of 43.9 kDa. This
141 recombinant protein (rLic-NTPDase-2) was then used as an antigen in ELISA
142 assays, demonstrating its potential for application in CVL diagnosis.

143

144 **MATERIALS AND METHODS**

145

146 *Serum Samples*

147 CVL IFA-positive sera samples isolated from 48 naturally infected dogs found in a
148 CVL-endemic area (Caratinga, MG/Brazil) were used. The positive samples were
149 grouped as follow: 16 asymptomatic, 16 oligosymptomatic and 16
150 polysymptomatic. These were classified according to Mancianti et al. (1988). Sera
151 from *T. cruzi* experimentally infected dogs from a non-endemic area (30 samples)
152 were assayed in cross-reactivity tests. All samples were obtained from the sera
153 library of Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, MG/Brazil and were kindly
154 provided by Dr. Maria Terezinha Bahia. Positive sera were collected from
155 experimentally infected dogs that had positive parasitological and serological
156 assays. Negative sera were obtained from non-infected animals that had negative
157 results in both parasitological and serological assays. Negative or Chagasic serum
158 was made by tests.

159

160 *rLic-NTPDase-2 cloning*

161 Genomic DNA from the *Leishmania infantum* M2682 strain was purified using the
162 phenol method and ethanol precipitation (Sambrook and Russell, 2001). The full-
163 length Lic-NTPDase-2 coding region containing 1278 bp was amplified by PCR
164 and cloned into the cloning vector pGEM-T Easy (Promega). The following primers
165 were designed based on the predicted E-NTPDase sequence from *Leishmania*
166 *infantum* JPCM5 ATP diphosphohydrolase (gi 146081774) and used: forward
167 primer 5'

168 5' cta **gct agc** atg cgt ccg tac tcc tcg 3' and reverse primer 5'
169 5' **gga att ccg** ttc cat ctt gag cag gga 3'. The bold bases indicate endonuclease
170 restriction sites for *NheI* and *EcoRI*, respectively. These were necessary in the next
171 step of our cloning strategy to clone the insert in-frame with the expression vector
172 pET21b. The PCR reaction was performed in 50 μ L (20 pmol of each primer, 0.2
173 mM dNTP mix, 90 nmol of genomic DNA) in GoTaq Green Master Mix and GoTaq
174 (Promega) according to the manufacturer. PCR steps: one cycle at 94°C 5 min, 34
175 cycles of 94°C for 60 sec, 50°C for 60 sec, and 72°C for 90 sec; and a final
176 amplification step at 74°C for 5 min. After gel electrophoresis separation, the PCR
177 product was purified from a 1% agarose gel using the PureLink™ Gel Extraction
178 Kit (Invitrogen). The purified amplicon was cloned into pGEM-T Easy vector
179 following the supplier's instructions (Promega). The recombinant plasmid was first
180 transformed into *E. coli* strain DH5 α (Sambrook and Russell, 2001), and
181 transformed clones were confirmed by PCR and sequencing. To express only the
182 putative extracellular soluble domain of NTPDase-2, we designed a strategy to re-
183 isolate this amplicon by PCR. To achieve this goal, the signal peptide prediction
184 based on GeneBank entry gi146081774 was performed using Signal-P (Bendtsen
185 et al., 2004). The resulting data showed a probable cleavage site between amino
186 acids residues G31 and F32. Analysis of the hydrophobic regions was performed
187 using TMAP (Milpetz et al., 1995) and showed a transmembrane segment between
188 amino acid residues L17 and L40. After these analyses, the residues between L41
189 and E425 were classified as part of the ectodomain. For the ectodomain coding
190 region, PCR amplification was performed using the following primers: forward
191 primer 5' agtag**ctagc**atgctgctctcccca 3' and reverse primer 5'

192 **agctcgagttccatcttgagcaggaa** 3'. The 5' regions flanking the ectodomain of both
193 primers have restriction sites for *NheI* and *XhoI* endonucleases (bases in bold).
194 The PCR reaction used the same conditions described previously for full-length
195 amplification. The expected amplicon containing 1155 bp was separated by
196 agarose gel electrophoresis (Sambrook et al., 1989) and purified using
197 PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen). The purified amplicon and
198 pET21b vector were digested with the aforementioned endonucleases. The
199 amplicon was then cloned into pET21b using T4 DNA ligase (Promega).
200 Chemically competent cells of *E. coli* were transformed with the recombinant
201 plasmid (pET21b+rLicNTPDase-2) using the chemical-heat shock method
202 (Sambrook et al., 1989). The positive transformant clones were identified by colony
203 PCR, endonuclease digestion, and sequencing using the T7 promoter and
204 terminator primers. Sequencing was performed by MACROGEN
205 (www.macrogen.com). All general, non-specific molecular biology techniques were
206 performed based on Sambrook et al., 1989. The bioinformatics analyses were
207 performed using CLC Workbench 5.1 software unless otherwise indicated. **The**
208 **nucleotide and amino acid sequences of NTPdase-2 from *L. infantum chagasi***
209 **strain M2682 were deposited in GenBank under the giXXXXXX.**

210

211 *Expression and purification of rLic-NTPDase-2*

212 The cloning of the coding region of the soluble domain of Lic-NTPDase2 into the
213 pET21b expression vector fused this sequence in frame with a carboxy-terminal
214 hexa-histidine tag. The pET21b-rLic-NTPDase-2 construction was used to
215 transform *Escherichia coli* BL21(DE3) cells for protein expression. Transformed *E.*

216 *coli* were grown by inoculation in 5 mL of Luria Bertani medium containing 50
217 µg/mL of ampicillin. The suspension was incubated for 16 h at 37 °C under 180
218 rpm. The culture was then transferred to 500 mL of SOC medium, and the cells
219 were incubated until log phase ($O.D._{600\text{ nm}} = 0.6$). Protein expression was induced
220 with 0.2 mM isopryl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) for an additional 1 h at 37 °C
221 under 180 rpm. Thereafter, the culture was centrifuged at 4000 x g for 10 min at 4
222 °C, and the recombinant protein was purified from the insoluble inclusion bodies by
223 Ni affinity chromatography using a Ni-NTA agarose matrix (His-Select® Nickel
224 affinity – Sigma). After centrifugation, cell pellets were lysed in 3 mL of lysis buffer
225 (50 mM Tris, pH 8.00, 100 mM NaCl) supplemented with protease inhibitors (1
226 mg/mL aprotinin, 1 g/mL pepstatin, 10 mg/mL leupeptin, 1 mg/mL PMSF, and 1
227 mg/mL lysozyme) using Misonix (Ultrasonic Liquid Processors) for 6 cycles for 10
228 sec. The supernatant was removed by centrifugation at 12000 x g for 30 min at 4
229 °C. To remove cellular debris, the pellet was washed with 50 mM Tris
230 supplemented with 500 mM NaCl, 10 mM 2-mercaptoethanol, and 2 M urea. The
231 supernatant was removed by centrifugation at 12000 x g for 30 min at 4 °C. The
232 inclusion bodies were then dissolved in 10 mL of extraction buffer (50 mM Tris
233 supplemented with 500 mM NaCl, 10 mM 2-Mercaptoethanol, and 8 M urea). The
234 rLic-NTPDase-2 purification was performed by batch or by Fast Protein Liquid
235 Chromatography – FPLC (Akta-Purifier UPC 100 from GE). For the batch
236 purification assay, 10 mL of soluble inclusion bodies was mixed with 500 µL Ni-
237 NTA agarose gel matrix (His-Select™ Nickel Affinity Gel -SIGMA) and incubated
238 for 1 h at 4°C under gentle agitation. The resin was then packed in a manual
239 column and washed with 10 column volumes of 50 mM Tris, pH 8.0, and 500 mM

240 NaCl. Bounded protein was eluted with 10 column volumes of elution buffer (50
241 mM Tris, pH 8.0, supplemented with 300 mM NaCl and 250 mM Imidazol). To
242 perform FPLC purification, 10 mL of soluble inclusion bodies was loaded on a 1-mL
243 HisTrap FF crude nickel ion affinity column. The loaded column was washed with
244 10 column volumes of wash buffer (20 mM Tris, pH 8.0, and 500 mM NaCl), and
245 the rLic-NTPDase-2 was eluted using 10 mL of a solution containing 20 mM Tris–
246 HCl, pH 8,0, supplemented with 8 M urea, 500 mM NaCl, and 300 mM of
247 imidazole. The FPLC procedure was performed at a flow rate of 1 mL/min. The
248 purified protein was dialyzed and analyzed by 10% SDS–PAGE (Sambrook et al.,
249 1989) and capillary electrophoresis (Agilent 2100 Bioanalyzer), in accordance with
250 the manufacturer’s instructions.

251

252 *ELISA assays*

253 Micro plates of 96 wells (Nunc immuno MicroWell™ 96 well Plates MaxiSorp™)
254 were coated with the rLic-NTPDase-2 (0.5 µg/well) in coating buffer (0.1 M
255 Na₂CO₃/NaHCO₃, pH 9.6) for 18 h at 4°C. The plates were incubated overnight at
256 4°C and washed four times with PBS-0.05% Tween 20. The plates were then
257 blocked with PBS-3% BSA for 1 h at room temperature. The dog serum (diluted
258 1:40 in PBS-1% BSA) was added and incubated for 1 h at room temperature. After
259 washes with PBS-0.05% Tween 20, a 1:5000 dilution of horseradish peroxidase-
260 conjugated anti-dog immunoglobulin (IgG) antibody (Sigma Aldrich) was added
261 and incubated for 1 h at room temperature. The plates were washed four times
262 with 300 µl/well of PBS-0.05% Tween 20. The assays were developed with 100
263 µl/well of developing solution (H₂O₂ 30 v/v 0.05%, ortho-Phenylenediamine 6 mg in

264 citrate-phosphate buffer Na₂HPO₄ 0.2 M; Acid citric 0.1 M, pH 5.0). Development
265 was performed for 15 min in the dark and stopped by the addition of 32 µl/well of
266 2.5 M H₂SO₄. The absorbance was measured at 492 nm in an automated BioTek
267 Plate Reader (Synergy HT). Each sample was assayed in duplicate.

268

269 *ELISA reproducibility test*

270 Thirty percent of the CVL ELISA-positive samples, previously detected by ELISA
271 using rLic-NTPDase-2 as antigen, and 50% of the negative samples were
272 randomly selected to evaluate the reproducibility of the ELISA results. The assays
273 were performed in triplicate using the same procedure described above for the
274 ELISA assay.

275

276 *Statistical Analysis*

277 The sensitivity and specificity were calculated by GraphPad Prism (version 5 for
278 Windows). The following formulas were used for calculations: the Positive
279 Predictive Value = $TP / (TP + FP) \times 100$, Negative Predictive Value = $TN / (TN +$
280 $FN) \times 100$, and Accuracy = $(TP + TN) / (TP + FP + TN + FN) \times 100$. TN, TP, FN, and FP
281 represent true negative, true positive, false negative, and false positive,
282 respectively. The degree of agreement between ELISA assays using rLic-
283 NTPDase-2 and the results from standardized sera library (previously assayed
284 using the Biomanguinhos test) was determined by the Kappa (*k*) values with 95%
285 confidence intervals (Faria et al., 2011, apud Cohen, 1968). The cut-off was
286 established using the ROC curve calculated using GraphPad Prism (version 5 for
287 Windows).

288

289 The statistical significance of the results was determined by analysis of variance
290 (ANOVA) and the Tukey test. *P*-values < 0.001 were considered statistically
291 significant. The analysis was performed with GraphPad Prism software (version 5
292 for Windows).

293 RESULTS

294

295 *Cloning, expression and purification of recombinant rLic-NTPDase-2 antigen*

296 In the first step of the cloning strategy, the full-length coding region of *Leishmania*
297 *infantum chagasi* strain M2682 NTPDase-2, based on the *Leishmania infantum*
298 JPCM5 ATP diphosphohydrolase (gi 146081774), was amplified by PCR and
299 cloned into the amplification vector pGEM. This step generated the pGEM-full-rLic-
300 NTPDase-2 construction. Sequencing of the full coding region (gi XXXXX) showed
301 99% similarity to the GenBank ATP diphosphohydrolase (gi 146081774). Simple
302 translation analyses showed that this divergence led to a change in only amino
303 acids at the carboxy-terminal portion of the translated protein. In the JPCM5 strain,
304 there is a phenylalanine, whereas in the M2682 strain, there is a serine. The
305 pGEM-full-rLicNTPDase-2 construct was used as a template to amplify the region
306 coding the predicted soluble ecto-domain of Lic-NTPDase-2 that was cloned into
307 the expression vector pET21b. All amplification and cloning results have been
308 obtained successfully (data not shown). In this expression strategy, the rLic-
309 NTPDase-2 ecto-domain was fused at the C-terminal portion to a hexa-histidine
310 tag. The fusion protein rLic-NTPDase-2 was purified by affinity chromatography
311 over a Ni-NTA agarose matrix. As shown in Figure 1, the 396-aa sequence

312 encoded the recombinant protein with a predicted molecular weight of 43.9 kDa,
313 which was successfully expressed and purified. We used two different strategies to
314 purify the recombinant protein: the manual purification by batch adsorption (Figure
315 1A) and the automated purification by FPLC technique (Figure 1B). For each of
316 these methods, SDS-page analysis revealed the presence of only one protein
317 band. The high degree of purity of purified rLic-NTPDase-2 was confirmed by the
318 high sensitivity method of capillary electrophoresis coupled with fluorescence
319 detection of proteins (Figure 2). As shown in Figures 1 and 2, the quality of
320 purified antigen appears to be high. In elution samples of a single protein band at
321 43.9%, the purified antigen accounted for 91.6 % of the total protein in the sample
322 (Figure 2). This purified antigen was then tested in CVL immunodiagnosis by the
323 ELISA technique as described below.

324

325 *ELISA assay analysis using rLic-NTPDase-2*

326 To evaluate the applicability of recombinant rLic-NTPDase-2 in the diagnosis of
327 CVL, the purified protein was used as the antigen to sensitize ELISA plates and to
328 perform the ELISA assays. The first step in this approach was to determine the
329 optimal amount of the recombinant antigen to sensitize the ELISA plates. We
330 tested 0.25, 0.5 and 1 µg using 3 sera samples from known positives and 3 sera
331 samples from the negative group of samples in the sera library (CVL negative and
332 CVL positive, respectively) at the same dilution factor (1:40). We observed that 0.5
333 µg provided the best differentiation between the groups of samples (data not
334 shown). Then, using 0.5 µg of rLic-NTPDase-2, we tested the reactivity of the
335 standardized sera library containing 48 CVL-positive sera (16 asymptomatic, 16

336 oligosymptomatic, and 16 polysymptomatic, classified according to Mancianti et al.
337 1988), 26 CVL-negative sera and 30 sera positive for infection by *T. cruzi*. The cut-
338 off was performed using ROC curves as described in the material and methods.
339 The rLic-NTPDase-2 ELISA results showed that the 48 true positive sera reacted
340 100% above the cut-off value (Figures. 3 and 4, and Table 1). In this first assay,
341 sera samples were tested in duplicate, and the recombinant protein purified
342 manually by batch adsorption was used. Next, a blind validation assay
343 (reproducibility test) was performed using a set of 30% of the CVL-positive
344 samples and 50% of the CVL-negative/Chagas-positive samples. The assay was
345 performed in triplicate using the recombinant protein purified by FPLC. These
346 results are shown in Figure 3, panel B, and in Table 1, and they confirm the
347 significant differences between the groups of samples observed in the full library
348 assay (Figure 3, panel A, and Table 1). Statistical analyses showed a high degree
349 of confidence (K=1) between the predicted data (standard sera library) and the
350 rLic-ELISA data and also revealed high levels of sensitivity and specificity when
351 using this new recombinant antigen (Table 1). Despite the accordance between
352 these tests, we observed differences in the absorbencies achieved in both assays.
353 Using the recombinant protein purified by batch, the levels of absorbance were
354 lower than those in the assay using the FPLC-purified recombinant protein.
355
356 To analyze the existence of any correlation between CVL disease progression and
357 the results from the ELISA assay using rLic-NTPDase-2, we separated the 48
358 positive dogs into three groups. Separation was performed according to their
359 clinical characteristics as asymptomatic, oligosymptomatic or polysymptomatic.

360 The rLic-NTPDase-2 ELISA mean absorbance values were 0.391, 0.375 and 0.415
361 for asymptomatic, oligosymptomatic and polysymptomatic samples, respectively.
362 The results were statistically analyzed; however, they did not show significant
363 differences that could relate the detection of symptoms in animals with the rLic-
364 NTPDase-2 ELISA results.

365 The specificity of the rLic-NTPDase-2 ELISA assay was determined using the
366 results obtained for control sera from healthy dogs (true negatives) and sera from
367 dogs with Chagas disease. The latter sera were used because Chagas disease is
368 the main source of false positives reported in literature. The results showed 99%
369 specificity; only one chagasic serum was detected as positive (Figure 3). Table 1
370 shows the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive
371 value of these tests. The results demonstrate that the antigen rLic-NTPDase-2 is
372 promising for use in the diagnosis of CVL by ELISA.

373

374 DISCUSSION

375

376 The NTPDase-2 gene from *Leishmania (L.) chagasi* was cloned, and its expression
377 in a bacterial system led to the production of a recombinant protein of 43.9 kDa. In
378 using a recombinant antigen produced in a bacterial system, it is very important to
379 avoid non-specific cross-reactivity. Such cross-reactivity may result from the
380 presence of proteins in the host of the expression system, in this case *E. coli*;
381 therefore, the use of recombinant protein with a high degree of purity is ideal. This
382 goal was achieved in this work (Figures 1 and 2). rLic-NTPDase-2 was used as the
383 antigen in ELISA assays to assess its potential use in the serodiagnosis of CVL.

384 Antibodies against rLic-NTPDase 2 were detected in 100% of the samples isolated
385 from dogs infected with CVL (Table 1). This value is higher than or quite similar to
386 those reported for other recombinant antigens, such as recombinant K39 that was
387 shown to have a sensitivity of 97% in a study using blood isolated from dogs in
388 Italy (Scalone et al., 2002). The multicomponent protein chimera *L. (L.) infantum*
389 PQ was previously shown to have a sensitivity of 93% in sera of dogs from Spain
390 (Soto et al., 1998). Cysteine proteinase antigen rLdcccys1 presented 98% sensitivity
391 in sera samples from CVL-infected dogs found in the Brazilian endemic regions of
392 Teresina, Piauí (Pinheiro et al., 2009). For protein chimera (epitopes K9, K26 and
393 K39), the sensitivity was 96% (Boarini et al., 2005). This is comparable to results
394 using the extract of *Leishmania* ribosomal proteins (LPRs), which showed a
395 sensitivity of 100% in ELISA assays (Coelho et al., 2009). Furthermore, the level of
396 sensitivity with rLic-NTPDase-2 was significantly higher than those reported with
397 the antigen *L. (L.) donovani* A2, which showed a sensitivity of 87% (Carvalho et al.,
398 2002). In general, the use of recombinant proteins in diagnostic tests has many
399 advantages over the use of non-recombinant proteins. The use of recombinant
400 proteins yields higher specificity, which is associated with the high degree of purity
401 and homogeneity of its preparations; no risk of infection during sample
402 manipulation because the pathogenic agent is not used in the production of the
403 recombinant antigen; and decreased levels of cross-reactivity with other disease
404 antigens, which do not have a high degree of similarity with this antigen at the
405 molecular level. Furthermore, this new recombinant antigen rLic-NTPDase-2
406 shows advantages over many approaches that use total or partial antigenic
407 preparation from *Leishmania* parasites. Despite the pre-existence of other

408 recombinant antigens in the literature, the discovery of additional recombinant
409 antigens, such as rLic-NTPDase-2, is necessary in many ways. New antigens can
410 be used to differentiate vaccinated dogs from infected dogs, when another
411 recombinant antigen is already used for vaccination programs in endemic areas,
412 and the new antigen can be used in combination with other antigens to improve
413 previous diagnostic tests. Furthermore, these additional recombinant proteins
414 could be used in regions of the world where a currently used antigen is producing
415 inadequate results due to the molecular divergences between the antigen in
416 prevalent strains in different places (Boelaert et al., 2008).

417 The use of rLic-NTPDase-2 as the antigen in ELISA assays was not able to
418 distinguish between different states of CVL progression as shown in Figure 3
419 (panel B); therefore, it seems that rLic-NTPDase-2 may not be useful as a marker
420 of CVL prognosis. This result could be explained by the fact that this protein may
421 be expressed at similar levels in all infected dogs; its expression may be
422 independent of the stage of the disease. Alternatively, the result may be explained
423 by the capacity of this antigen to induce the production of significant, elevated
424 levels of specific antibodies in all infected dogs. Given the role of this protein in
425 *Leishmania* infection and virulence (Marques-da-Silva, et al., 2008; de Souza, et
426 al., 2010), along with the high absorbances observed in ELISA assays, both of
427 these explanations are possible. Nonetheless, it is necessary to identify alternative
428 assays to determine why ELISA assays for rLic-NTPDase-2 are unable to
429 distinguish between the different stages of CVL progression.

430 The percentage of cross-reactivity with sera isolated from dogs with Chagas
431 disease, an infection found in endemic areas of CVL, was comparable to those

432 observed for other recombinant proteins analyzed for use in immunodiagnosis
433 (Soto et al., 1998; Carvalho et al., 2002; Scalone et al., 2002, Rosati et al., 2003;
434 Boarini et al., 2005; Coelho et al., 2009; Pinheiro et al., 2009). This high specificity
435 may be due to the absence of the NTPDase-2 isoform in the *T. cruzi* genome. Until
436 now, only one E-NTPDase, named NTPDase-1, was described in *T. cruzi*, and two
437 isoforms are predicted in *Leishmania* parasites: NTPDase-1 and NTPDase-2
438 (Fietto et al., 2004; Santos et al., 2009). The amino acid identity between the *T.*
439 *cruzi* NTPDase-1 (GenBank entry GI:45685733) and the isoform NTPDase-2 from
440 *Leishmania infantum* is very low (only 28%) (data not shown). This discrepancy
441 could explain the specificity of this antigen and the decrease in chagasic cross-
442 reactivity. More importantly, this advantage lends further support to the use of rLic-
443 NTPDase-2 as the diagnostic antigen.

444 As a whole, our data indicate that the recombinant protein rLic-NTPDase-2 from
445 *Leishmania infantum chagasi* may be used in serodiagnostic tests for CVL,
446 allowing the detection of both subclinical and clinical forms of the disease. In this
447 context, its use in the diagnosis of CVL could help in identifying the remaining
448 asymptomatic dogs in endemic areas. As these canines serve as a major reservoir
449 for the parasite, this would be critical for the epidemiological control of this disease.

450

451 CONCLUSIONS

452 These results show the high potential of this recombinant protein for the immune
453 diagnosis of CVL. Furthermore, they could open new doors for its use in other
454 diagnostic approaches, such as in the fast lateral flow assays that could be used
455 for the control of VCL. Additional potential applications are the use of this antigen

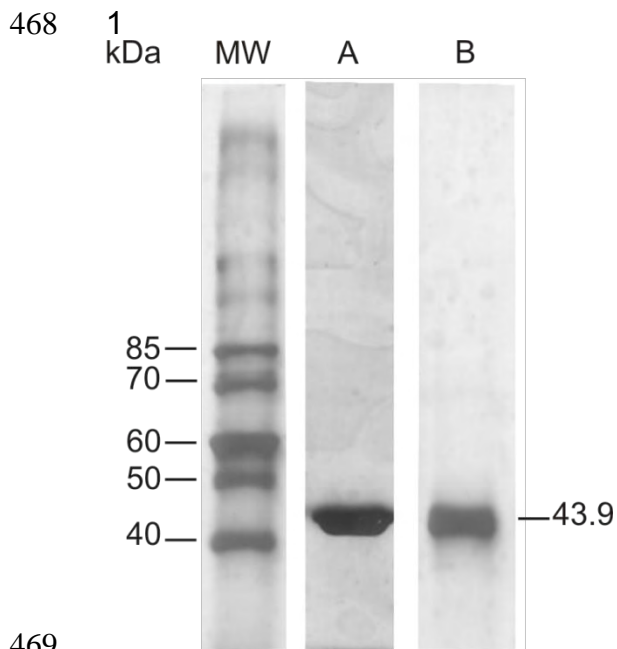
456 in human visceral Leishmaniasis diagnosis, in epidemiological inquiries or in the
457 development of new recombinant vaccines. All of these uses could contribute to
458 the control of this serious neglected disease.

459

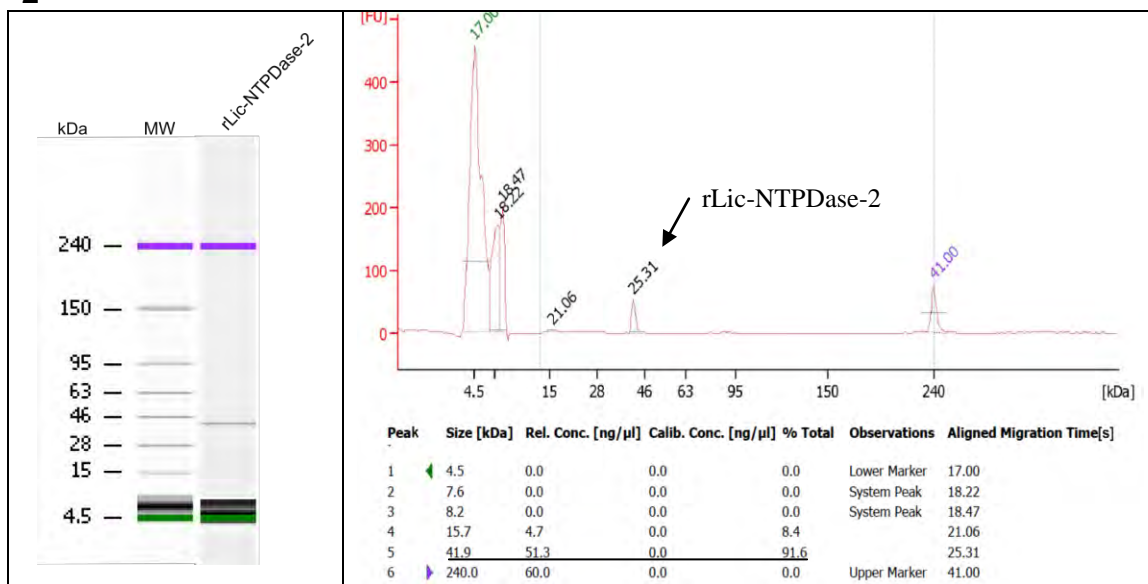
460

461 Acknowledgements-The author's gratefully acknowledge the Research Foundation
462 of the State of Minas Gerais, FAPEMIG for financial support (APQ-CBB-xxxxxx)
463 and RFS's PhD scholarship and YLS's BDTI scholarship. MTB thanks Conselho
464 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PQ- CNPq), and ISC
465 thanks Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes-
466 PD) for fellowships.

467

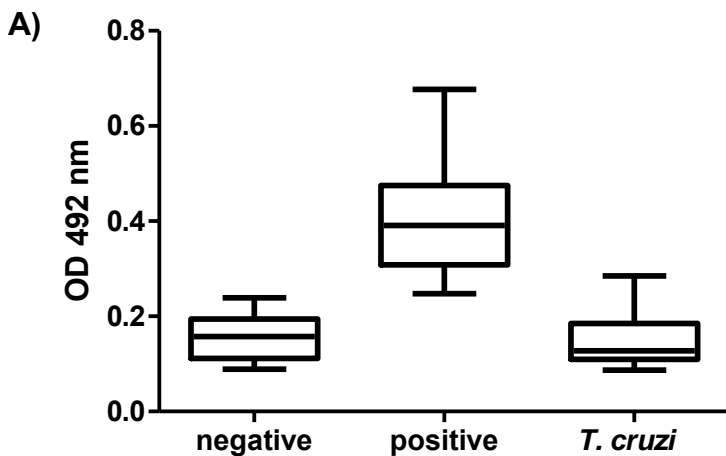


469 **Figure 1. Purified rLic-NTPDase-2.** The rLic-NTPDase-2 was expressed using
 470 the pET21b *E. coli* BL21-codon plus system and purified by Ni-agarose affinity
 471 chromatography. The purified protein was analyzed by SDS-PAGE 10% stained
 472 with silver. MW is the molecular weight marker shown in kDa. Lane A) 10 µg of
 473 rLic-NTPDase-2 purified by batch adsorption. Lane B) 10 µg of rLic-NTPDase-2
 474 purified by FPLC.
 475
 476 2

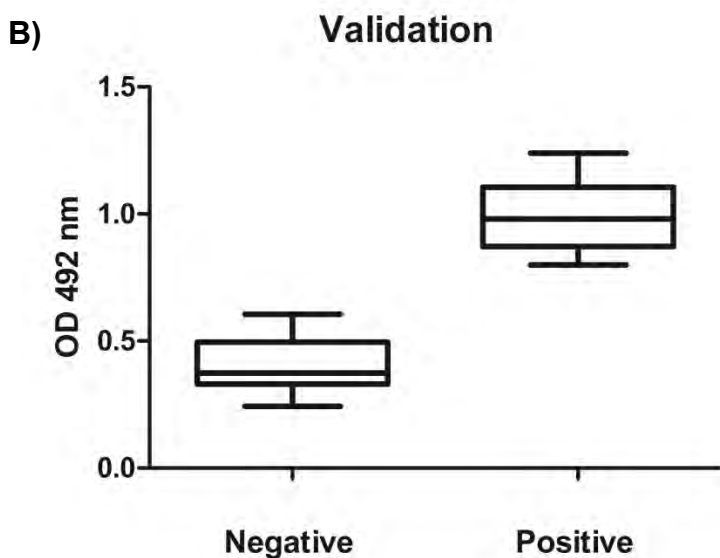


477 **Figure 2. Analysis of rLic-NTPDase-2 purity by capillary electrophoresis and**
 478 **fluorescence stain.** The purity of rLic-NTPDase-2 was analyzed using a sample of
 479 51.3 ng/µl of FPLC-purified rLic-NTPDase-2 and the LabChip® Agilent Protein 230
 480 Kit (Agilent 2100 Bioanalyzer). Panel A shows the image of the electrophoresis
 481 result after SDS-PAGE gel visualization. Only one protein band is observed in the
 482

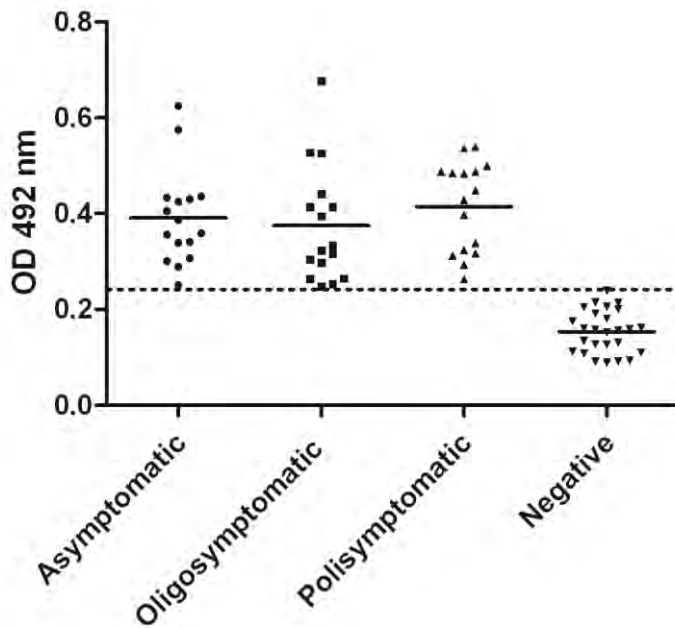
483 rLic-NTPDase-2 lane. Panel B shows the quantification of these results and
484 reveals that rLic-NTPDase-2 protein band represents 91.6 % of the total protein in
485 the sample.
486 3



487



488 **Figure 3. Box plot analysis of ELISA assay using rLic-NTPDase-2 as antigen.**
489 Panel A) ELISA assay using recombinant protein purified by batch and full sera
490 library containing CVL-negative samples from healthy dogs ("negative" (n=26)),
491 CVL-positive samples from endemic area ("positive" (n=48)), and CVL-negative *T.*
492 *cruzi*-infected samples from dogs in a non-endemic area ("*T. cruzi*" (n=48)). Panel
493 B) Reproducibility assay (validation) performed using recombinant protein purified
494 by FPLC along with 30% of the positive samples and 50% of the negative samples
495 blindly chosen and assayed in triplicate. All sera samples were diluted 1:40 and
496 assayed using 0.5 µg of purified rLic-NTPDase-2.
497
498 4



499 **Figure 4. Analysis of the correlation between the ELISA assay using rLic-**
 500 **NTPDase-2 and CVL progression.** The ELISA results were separated by the
 502 stage of CVL disease into asymptomatic (without symptoms), oligosymptomatic
 503 (with lower levels of symptoms) and polysymptomatic (with severe symptoms)
 504 according to Mancianti et al. (1988). Sera samples were diluted 1:40 and assayed
 505 in duplicate using 0.5 µg of batch-purified rLic-NTPDase-2. The dashed line
 506 represents the cut-off value calculated using a ROC curve. Insignificant differences
 507 were observed between disease stage groups using GraphPad Prism software
 508 (version 5 for Windows) program.
 509

Table 1. Sensitivity, specificity and predicted value of the ELISA assay performed with rLic-NTPDase-2 antigen of *L (L) infantum chagasi*.

Test	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PP (%)	PN (%)	Kappa
Full serum library	100	100	100	100	1
Validation	100	100	100	100	1

510 PP (Predicted Positive) and PN (Predicted Negative). The full sera library test was
 511 performed with all sera samples (48 CVL-positive, 26 CVL-negative, and 48
 512 Chagasic-positive and CVL-negative) in duplicate, using recombinant protein
 513 purified by batch adsorption. The validation test was performed with 30% of the
 514

515 CVL-positive samples and 50% of the CVL-negative samples blindly chosen and
516 assayed in triplicate using recombinant protein purified by FPLC.