

RONNY FRANCISCO DE SOUZA

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA, PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO
DO USO DA E-NTPDASE (GDPASE) DE *Leishmania major*
COMO ANTÍGENO RECOMBINANTE NO DIAGNÓSTICO DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

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

T

S729e
2009

Souza, Ronny Francisco, 1977-

Expressão heteróloga, purificação e avaliação do uso da E-NTPDase (GDPase) de *Leishmania major* como antígeno recombinante no diagnóstico da Leishmaniose visceral canina / Ronny Francisco Souza. – Viçosa, MG, 2009.

x, 65f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Juliana Lopes Rangel Fietto.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa

Referências bibliográficas: f. 54-65.

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

CDD 22.ed. 636.70896

RONNY FRANCISCO DE SOUZA

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA, PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO
DO USO DA E-NTPDASE (GDPASE) DE *Leishmania major*
COMO ANTÍGENO RECOMBINANTE NO DIAGNÓSTICO DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

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

APROVADA: 13 de fevereiro de 2009

**Prof^ª. Maria Terezinha Bahia
(Coorientadora)**

Prof. Luciano Gomes Fietto

Prof. Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo

Prof. Sérgio Oliveira de Paula

**Prof^ª Juliana Lopes Rangel Fietto
(Orientadora)**

*À fonte de material genético herdável por mim,
Rubens e Rozalina (In Memoriam)
e aos meus irmãos Rosivan e Vanderleia,*

À minha outra metade, Lidy.

Dedico

AGRADECIMENTOS

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

À Minha Orientadora, Professora Juliana Lopes Rangel Fietto, pela confiança no desempenho desse trabalho e que desde o início conduziu-me na orientação desse projeto de maneira responsável e respeitável.

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

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

À Lidiany Angélica Marques, uma pessoa maravilhosa, que desde o início do nosso primeiro encontro tem se mostrado idônea, companheira, amiga. E que tem estado ao meu lado me apoiando nesse período tão corrido que foi o desenvolver da minha dissertação. Obrigado pela convivência que tem se eternizado a cada momento.

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. Em especial, ao Bruno, Felipe e Antônio pela cooperação direta no desempenho do nosso trabalho.

Ao funcionário do laboratório Sr. Valdir, pelo auxílio.

O 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, não importando o dia, nem hora. Valeu mesmo meu Caro!

À Republica Tigrada, que desde o início e até hoje contribui para realização das minhas atividades acadêmicas, e em especial gostaria de lembrar de meus amigos contemporâneos: Mamona (Ramon) que estamos juntos mais uma vez aqui em Viçosa, Prumado (Marcelo) que continua na UFOP fazendo o mestrado, e que é um companheiroço, ao Noia (Leandro) que está sempre pronto a atender aos chamados dos Ex-Alunos e o K-paxão (Nilton), vocês são pessoas que vou levar para a vida toda.

Ao amigo Finin (Breno de Assis), um cooparticipante na minha graduação da UFOP e agora presente mais uma vez nessa jornada da Pós-Graduação aqui na UFV. Aqui compartilhamos bons e engraçados momentos, valeu meu Caro.

Aos amigos conquistados em Viçosa, Larissa, Rafael (Bliny), Edvaldo, Patrícia, Francine, Wendel, Rita de Cássia, Valeu Pessoal.

BIOGRAFIA

RONNY FRANCISCO DE SOUZA, filho de Rubens Francisco de Souza e Rozalina Maria Souza (In Memoriam), nasceu no dia vinte seis de Outubro de 1977, em Ipatinga, MG.

Em outubro de 2001, ingressou no curso de Ciências Biologia, na Universidade Federal de Ouro Preto, MG, graduando-se com o título “Licenciatura em Ciências Biológicas” em julho de 2005.

Em março de 2007 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, MG, concentrando seus estudos na área de Bioquímica e Biologia Molecular Animal.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Leishmaniose	4
2.2. Leishmaniose Visceral Canina – LVC	8
2.3. Diagnóstico da LVC	10
2.4. A Família E-NTPDase	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Isolamento e Clonagem da região codificante da GDPase de <i>L. major</i>	16
3.2. Obtenção de Células <i>E. coli</i> Competentes	18
3.3. Extração do DNA plasmidial	18
3.4. Transferência da região codificante da GDPase de <i>L. major</i> para vetor de expressão em sistema procarioto pET-21b	19
3.5. Expressão da rGDPase de <i>L. major</i> e análise em gel de SDS	20
3.6. Purificação da proteína recombinante e análise em gel de SDS	25
3.7. Western Blot	26
3.8. Quantificação da proteína recombinante	27
3.9. Produção de anticorpo policlonal anti-rGDPase	29
3.10. Titulação do soro imune anti-rGDPase de <i>L. major</i>	29
3.11. Purificação do soro imune anti-rGDPase de <i>L. major</i>	30
3.12. Ensaio de ELISA indireto usando a rGDPase como antígeno	30
3.13. Análises estatísticas	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1. Avaliação da concentração de agente indutor	32
4.2. Avaliação do tempo de indução	34
4.3. Expressão heteróloga e purificação da GDPase recombinante de <i>L. major</i>	36
4.4. Produção de antissoro policlonal anti-GDPase recombinante de <i>L. major</i>	38
4.5. Avaliação da reatividade de soros de cães infectados por <i>Leishmania</i> sp. com antígeno rGDPase de <i>L. major</i>	42
5. PERSPECTIVAS	53

RESUMO

SOUZA, Ronny Francisco, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2009.
Expressão Heteróloga, Purificação e Avaliação do uso da E-NTPDase (GDPase) de *Leishmania major* como Antígeno Recombinante no Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. Orientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto. Coorientadores: Márcia Rogéria de Almeida Lamego e Maria Terezinha Bahia.

A leishmaniose visceral canina é uma doença zoonótica emergente altamente prevalente em países tropicais. Vários estudos têm utilizado proteínas recombinantes em testes sorológicos para o seu diagnóstico. Este trabalho descreve a expressão heteróloga em sistema *Escherichia coli* BL21 (DE3) pET-21b da GDPase de *Leishmania major*. A proteína recombinante GDPase (rGDPase) foi expressa com uma cauda Hexa-HIS fusionada no C-terminal e purificada sob condições nativas por cromatografia de afinidade em resina Ni²⁺-agarose. Após a otimização da expressão e purificação, antissoro policlonal contra rGDPase de *L. major* foi produzido e purificado para retirada de anticorpos inespecíficos contaminantes anti-*E. coli*. A proteína recombinante foi utilizada como antígeno em testes sorológicos (ELISA indireto) contra soros de cães saudáveis ou cães infectados por *Leishmania* spp. com diferentes formas da doença (assintomáticos, oligossintomáticos ou polissintomáticos). Os estudos indicaram que é possível produzir essa proteína recombinante e que o antígeno recombinante pode ser utilizado nos testes soro diagnóstico, mas deve ser otimizado principalmente no que diz respeito à sua pureza.

ABSTRACT

SOUZA, Ronny Francisco, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2009.
Heterologous expression, purification and evaluation of the use of E-NTPdase (GDPase) of *Leishmania major* as recombinant antigen in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. Adviser: Juliana Lopes Rangel Fietto. Co-Advisers: Márcia Rogéria de Almeida Lamego and Maria Terezinha Bahia.

The canine visceral leishmaniasis is an emerging zoonotic disease highly prevalent in tropical countries. Several studies have used recombinant proteins in serological tests for its diagnosis. This work describes the heterologous expression in *Escherichia coli* BL21-(DE3) pET-21b system of *Leishmania major* GDPase. The GDPase recombinant protein (rGDPase) was expressed as a fusion with a Hexa-HIS tag at the C-terminal and purified under native conditions by affinity chromatography on Ni²⁺-agarose resin. After optimization of expression and purification, polyclonal antiserum against rGDPase of *L. major* was produced and purified from contaminating *E. coli* proteins. The recombinant protein was used as antigen in serological tests (indirect ELISA) against sera from healthy dogs or dogs infected by *Leishmania* spp. with disease various stages (asymptomatic, oligosymptomatic or polysymptomatic). The studies indicated that it's possible to produce this recombinant protein and that the recombinant antigen may be used in serum diagnostic tests but must be optimized mainly with respect to its purity.

1. INTRODUÇÃO

As Leishmanioses compreendem um conjunto de enfermidades cujos agentes etiológicos são espécies do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). A leishmaniose é uma doença de caráter zoonótico (Murray *et al.*, 2005) e sua transmissão se dá de forma natural principalmente pela picada de fêmeas infectadas de certas espécies de flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (Díptera: Psychodidae).

Dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção, as leishmanioses podem se manifestar como diferentes formas clínicas sendo basicamente divididas em: formas tegumentares ou visceral (Herwaldt, 1999).

Segundo a organização mundial de saúde, a leishmaniose tegumentar ou cutânea é endêmica em 82 países, e 10 milhões de pessoas atualmente sofrem com essa doença. Cerca de 1-2 milhões de novos casos de leishmaniose cutânea e 500.000 casos da forma visceral acontecem por ano e epidemias são frequentes. Mais de 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem em 10 países: Brasil, Peru, Bolívia, Colômbia, Sudão, Arábia Saudita, Irã, Iraque, Paquistão e Afeganistão e para a leishmaniose visceral mais de 90% dos casos ocorrem em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão (WHO, 2009).

A leishmaniose visceral no Brasil se concentra na região Nordeste, onde ocorrem mais de 90% dos 2 mil casos registrados anualmente no país. Na região Sudeste, alguns centros urbanos foram afetados, como Belo Horizonte, Montes Claros e Araçatuba (Funasa, 2001).

A doença na forma visceral pode iniciar de forma sintomática ou assintomática sendo geralmente fatal se não tratada (D'Oliveira *et al.* 1997). O aumento dos casos de leishmaniose de um modo geral, esta relacionado principalmente ao desenvolvimento econômico e a mudanças de hábitos e ambientais que expõem mais a população aos vetores da doença.

Seguramente estes dados demonstram a importância em se desenvolver métodos de controle destas doenças. Neste sentido um dos pontos a serem atacados é o controle de hospedeiros animais que servem como reservatório dos parasitos. Um dos principais reservatórios atualmente descrito é o cão, que por sua proximidade com o homem participa ativamente do processo de manutenção da leishmaniose (Shaw *et al.*, 2002; Lainson *et al.*, 2005).

A leishmaniose canina tem se tornado foco de vários estudos visto a importância do cão (*Canis familiaris*) como animal doméstico e à 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 (Padilla *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2007; Moreira *et al.*, 2007). Neste sentido vários trabalhos têm abordado estudos nas áreas de diagnóstico, tratamento e prevenção imune da leishmaniose canina.

No Brasil, a LVC tem sido registrada principalmente como sendo resultante da infecção por *Leishmania chagasi* (revisado por Bauzer *et al.*, 2007). A *L. chagasi* é atualmente considerada como um sinônimo de *L. infantum* (Mauricio *et al.*, 1999), sendo também denominada *L. infantum chagasi*. O primeiro vetor da *L. infantum chagasi* e principal vetor envolvido na transmissão da leishmaniose visceral na América Central e Sul são flebótomo do gênero *Lutzomyia* (revisado por Bauzer *et al.*, 2007).

A prática da eutanásia canina é recomendada a todos os animais sororreagentes e/ou parasitológicos positivos. (Alencar, 1961, Ministério da saúde, 2006). Apesar de várias drogas utilizadas para tratamento da doença ser capaz 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).

Testes sorológicos para LVC, baseada em imunofluorescência indireta (IF), ensaios de imunoadsorção ligado a enzima (ELISA) ou western blot tem mostrado alta precisão no diagnóstico na maioria dos estudos, mas estão mal adaptados ao campo (revisado por Chappuis *et al.*, 2007).

De acordo com Ferrer (1999) e Gradoni (2002), o método ideal de diagnóstico para LVC deve ser de baixo custo, rápido e mostrar uma alta razão de sensibilidade e especificidade. Dentre os métodos conhecidos para diagnóstico em geral, o método imunológico indireto por ELISA é bem explorado (Mukerji *et al.*, 1991).

Nesse trabalho exploramos o método de ELISA indireto para o diagnóstico de leishmaniose canina utilizando como antígeno uma proteína de *Leishmania major* expressa de forma heteróloga em sistema bacteriano. A proteína alvo desse estudo é denominada por similaridade de sequência como guanosina difosfatase de *L. major*. Esta proteína é membro da

família E-NTPDases (Ecto-Nucleotídeo Trifosfato Difosfohidrolsases), enzimas capazes de hidrolisar nucleotídeos di e tri-fosfatados inclusive extracelulares. O interesse nestas enzimas se baseia em dados que foram obtidos por Fietto *et al.*, (2004) estudando-as em tripanosomatídeos, bem como na literatura relacionada que sugere a participação de ecto-nucleotidases, entre outras coisas na virulência, infectividade e aquisição de purinas em parasitos (Fietto *et al.*, 2004; Pinheiro *et al.*, 2006).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Leishmaniose

O termo leishmaniose refere-se à infecção de hospedeiros vertebrados com os protozoários do gênero *Leishmania*, os quais como os outros tripanosomatídeos da ordem Kinetoplastida, apresentam caracteristicamente, um DNA extranuclear no seu citoplasma em uma organela mitocondrial, o cinetoplasto (Lessa *et al.*, 2007). Este gênero caracteriza-se por apresentar diferentes formas evolutivas durante o seu ciclo biológico nos organismos hospedeiros dentre as quais: a forma amastigota, que é parasito intracelular obrigatório em vertebrados, e promastigota, desenvolvendo-se no tubo digestivo dos vetores invertebrados.

A leishmaniose é uma doença de caráter zoonótico (Murray *et al.*, 2005), e sua transmissão se dá principalmente pela picada de fêmeas infectadas, de certas espécies de flebótomos do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomya* (Diptera: Psychodidae).

Dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção, a leishmaniose pode se manifestar como diferentes formas clínicas: formas tegumentares (cutânea, cutânea-difusa, mucosa) e visceral (Herwaldt, 1999). Nas Américas a Leishmaniose tegumentar é provocada principalmente pelas espécies: *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) venezuelensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) peruviana* (Lainson & Shaw, 1987). Já a leishmaniose visceral é causada no velho mundo por *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* e no novo mundo por *L. (L.) infantum chagasi*.

Segundo a organização mundial de saúde, uma pessoa se torna infectada contraindo leishmaniose cutânea a cada 20 segundos no mundo. A doença é endêmica em 82 países, e 10 milhões de pessoas sofrem com leishmaniose cutânea. Cerca de 1-2 milhões de novos casos de leishmaniose cutânea e 500.000 das formas viscerais acontecem por ano e epidemias são frequentes. Mais de 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem em 10 países: Brasil, Peru, Bolívia, Colômbia, Sudão, Arábia Saudita, Irã, Iraque, Paquistão e Afeganistão e para a leishmaniose visceral mais de 90% dos casos ocorrem em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão (WHO, 2007).

As leishmanioses estão relacionadas a mudanças ambientais e humanas que promovem a exposição de hospedeiros susceptíveis a insetos vetores infectados (WHO, 2000). O estabelecimento da agricultura e da pecuária próximos às áreas naturais tem proporcionado um contato entre as populações humanas e de seus animais domésticos com as populações de animais silvestres nos seus habitats. Este estreito contato facilitou a disseminação de agentes infecciosos para novos hospedeiros e ambientes, estabelecendo-se assim novas relações entre hospedeiros e parasitas (Corrêa & Passos, 2001). Assim, com algumas exceções, os seres humanos passaram a ser os hospedeiros acidentais da infecção, enquanto outros mamíferos (como roedores e cães) são hospedeiros reservatórios (Ashford, 1996 e 1997). Apesar de ser considerada de zona rural, o aparecimento da forma visceral, em grandes centros urbanos faz das leishmanioses um problema de saúde pública emergente (Santa Rosa e Oliveira, 1997; Carmo *et al.*, 2001; Brasil, 2004).

O primeiro relato de um caso de leishmaniose visceral no Brasil foi em 1913, em uma paciente de Boa Esperança, Mato Grosso (Migone, 1913 apud Maia-Elkhoury *et al.*, 2008). Desde a década de 1970, a urbanização da doença foi intensificada, especialmente nas periferias urbanas (Alencar, 1983). A leishmaniose visceral no Brasil, tem a sua importância não somente na sua alta incidência e ampla distribuição, mas também na possibilidade de assumir formas graves e letais quando associada ao quadro de má nutrição e infecções concomitantes (Gontijo & Mello, 2004).

Segundo o Ministério da Saúde, (2006) os dados epidemiológicos dos últimos dez anos revelam a periurbanização e a urbanização da leishmaniose visceral, destacando-se surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e mais recentemente as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO). As áreas de transmissão da doença no Brasil estão representadas na Figura 1.

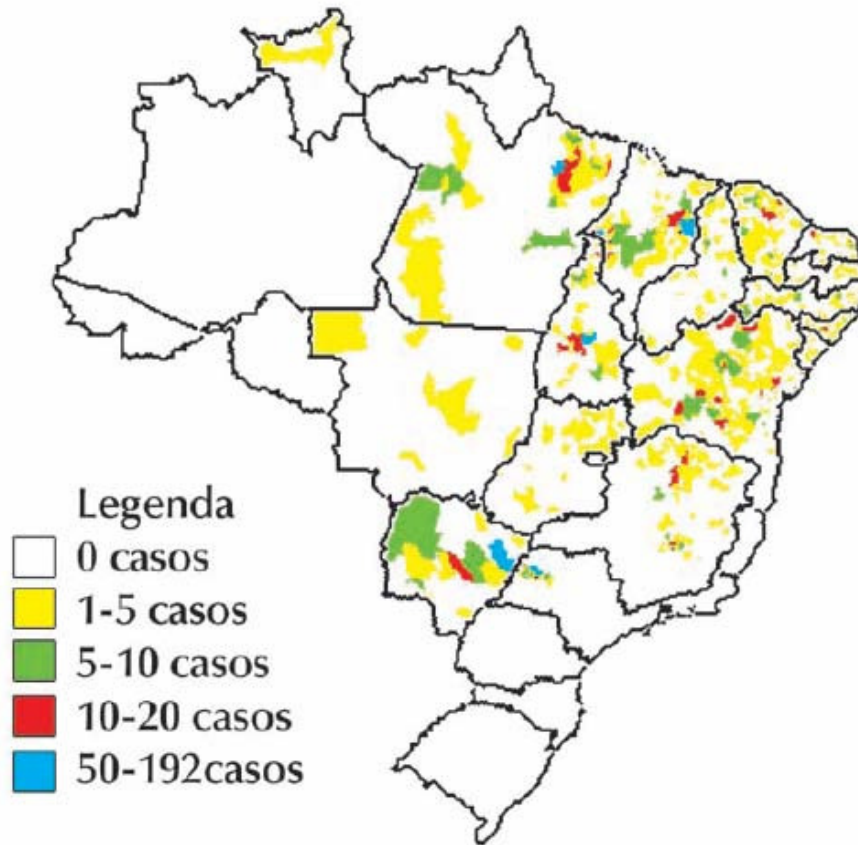


Figura 1 - Distribuição de casos de Leishmaniose Visceral segundo município, Brasil 2002. Fonte: Ministério da Saúde, 2006.

A leishmaniose visceral tem um período de incubação que varia de 3 a 8 meses (Manson-Bahr *et al.*, 1963; De Alencar *et al.*, 1982), os sintomas incluem febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, pancitopenia e hipergamaglobulinemia (Zijlstra & El-Hassan, 2001) acometendo principalmente o baço, fígado e medula óssea (Monroy-Ostria *et al.*, 1999). Alguns casos de leishmaniose visceral atípicos têm sido relatados, como infecções nos pulmões, pleura, mucosa oral, laringe, esôfago, estômago, intestino delgado, pele (Mandell *et al.*, 2005).

Uma variação da Leishmaniose visceral tem sido descrita principalmente na Índia e África como Leishmaniose Dérmica Pos-Kalazar (PKDL), que ocorrem em pequenos casos após o tratamento da leishmaniose visceral (Mandell *et al.*, 2005). Nestes casos as lesões cutâneas se caracterizam por mácula-papular e nodular. A doença pode aparecer sintomaticamente ou assintomática sendo geralmente fatal se não tratada (D'Oliveira *et al.* 1997).

O diagnóstico da leishmaniose visceral é geralmente baseado na detecção microscópica de amastigotas em esfregaços de amostras de tecido, aspirado ou biópsia (Murray *et al.*, 2005). Apesar de reações cruzadas com hanseníase, doença de Chagas, malária e esquistossomose, anticorpos de *Leishmania* total tem sido usado em teste de aglutinação direta com sensibilidade de 72% e uma especificidade de 94% (Zijlstra & El-Hassan, 2001). O DNA de *Leishmania* também pode ser detectado no tecido aspirado e do sangue periférico utilizando reação em cadeia da polimerase (PCR), que dá uma sensibilidade de 70-93% no sangue periférico (Zijlstra & El-Hassan, 2001), porém é considerado um método caro para ser usado em larga escala.

A quimioterapia tem sido largamente utilizada no tratamento da LV, dentre as drogas utilizadas podemos citar o antimônio pentavalente (Murray *et al.*, 2005) que pode ser administrados por via intravenosa ou intramuscular com igual eficácia. Existem no mercado atualmente duas formulações de antimônio pentavalente disponíveis: Stibogluconato de sódio e o antimoniato-N-metil glucamina. No Brasil, a única formulação disponível é o antimoniato N-metil glucamina, que vem sendo distribuída pelo Ministério da Saúde. Seu mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado, mas sabe-se que atua nas formas amastigotas do parasita, inibindo sua atividade glicolítica e a via oxidativa de ácidos graxos (Ministério da saúde, 2006).

Outra droga utilizada no tratamento da LV é anfotericina B. Segundo o Ministério da Saúde (2006) ela é a droga leishmanicida mais potente disponível comercialmente, atuando nas formas promastigotas e amastigotas do parasita, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e seu mecanismo

de ação se dá através da ligação preferencial com ésteres (ergosterol ou episterol) presentes na membrana plasmática da *Leishmania*, no entanto é muito tóxica. Novas formulações da anfotericina B, como a anfotericina-B-liposomal, tem sido aplicada com alta eficiência apresentando menos toxicidade (Murray *et al.*, 2005) embora até agora apresente custo elevado. Dentre outras drogas utilizadas podemos citar pentamidina, paromomicina (Sinha *et al.*, 2005).

Em PKDL, o tratamento é indicado apenas para quem tem doença grave e prolongada (revisado por Piscopo & Mallia, 2006).

2.2. Leishmaniose Visceral Canina – LVC

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma zoonose de ocorrência em diversas regiões do mundo (Moreno & Alvar, 2002). Dentre os reservatórios, são referidas espécies de animais silvestres e domésticas, sendo a família canidae considerada como o principal reservatório (Diniz *et al.*, 2008). Isso faz do cão doméstico (*Canis familiaris*) extremamente importante em termos epidemiológicos, tanto no ambiente urbano quanto no rural, devido a alta prevalência da leishmaniose canina (Moreno & Alvar, 2002)

O ciclo natural da infecção por *Leishmania* envolve os flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Seis gêneros de flebotomíneos são reconhecidos, mas apenas dois gêneros são de importância médica: *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia*, no Novo Mundo (Lane, 1993). Nesses, as formas promastigotas replicam após a transfecção de amastigotas intracelulares ingurgitadas durante o repasto sanguíneo.

Embora flebotomíneos sejam os únicos vetores adaptados biologicamente para a transmissão da leishmaniose, um possível papel na transmissão por ectoparasitas hematófagos, como carrapatos e pulgas, foi proposto (Coutinho *et al.*, 2005 e 2007). A transmissão por transfusão sanguínea foi documentada em um cão (Owens *et al.*, 2001). Além disso, alguns autores sugerem que a LVC pode ser sexualmente transmissível (Silva *et al.*, 2008).

Estima-se que no sudoeste da Europa pelo menos 2,5 milhões de cães estejam infectados (Moreno *et al.*, 2002). Na América do Sul o número de cães infectados também é estimado em milhões, na Venezuela e no Brasil há grande taxa de infecção em algumas áreas, onde uma

elevada prevalência da infecção canina está associada com alto risco de doença humana (Werneck *et al.*, 2006).

O crescente número de cães infectados em regiões não endêmicas está relacionado principalmente a viagens para áreas endêmicas com cães e a importação de cães de regiões endêmicas (Gothe *et al.*, 1997), como observado em um caso ocorrido em Goiânia e no Rio Grande do Sul (Linhares *et al.*, 2005; Krauspenhar *et al.*, 2007). Dentre outros fatores que favorecem a incidência de LVC, estão os relacionados ao uso e à ocupação desordenada de áreas de transição entre as zonas urbanas e rurais, promovendo o desequilíbrio ambiental e a conseqüente introdução do vetor e de mamíferos infectados em áreas não endêmicas.

A LVC por ser uma doença multissistêmica, apresenta sinais clínicos variáveis: dermatites, alargamento dos linfonodos, lesões oculares, alargamento do baço, caquexia, febre, sangramento do nariz, onicogribose, anemia (Ciaramella *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 1999; Peña *et al.*, 2000; Naranjo *et al.*, 2005; Baneth *et al.*, 2006; Costa-Val *et al.*, 2007). De acordo com os sinais clínicos, Mancianti *et al.*, (1988) classifica os cães infectados como: sintomáticos, aqueles que apresentam mais de três sinais clínicos como por exemplo: alopecia, eczema furfuráceo, úlceras, hiperqueratose; oligossintomáticos, de um a três sinais clínicos como por exemplo: presença de adenopatia linfóide, pequena perda de peso e pêlo opaco e cães assintomáticos, sem sinais clínicos.

O período de incubação da doença clínica em cães pode durar de três meses a sete anos, e a maioria dos cães infectados são portadores assintomáticos (Slappendel, 1988; Solano-Gallego *et al.*, 2001; Rodríguez-Corte *et al.*, 2007), no entanto testes de imunidade celular e sorológicos têm demonstrado que um espectro de resposta imune a infecção por *Leishmania* estão presentes nesses animais (Cabral *et al.*, 1998). LVC é bem caracterizada por uma significativa diminuição de células T CD4⁺ e vigorosa produção de anticorpos anti-leishmania; além disto, uma forte resposta imunológica celular específica é observada em cães assintomáticos (Pinelli *et al.*, 1994; Bourdoiseau *et al.*, 1997; Moreno *et al.*, 1999), indicando que a resposta de células T é importante como uma defesa imunológica contra o parasito.

No Brasil, a LVC tem sido registrada como sendo resultante da infecção pela *Leishmania infantum chagasi* tendo o *Lutzomyia longipalpis* como primeiro e principal vetor, envolvido na transmissão da leishmaniose visceral na América Central e Sul (revisado por Bauzer *et al.*, 2007).

A LVC ocorre endêmica em muitos estados do Brasil: Norte, Nordeste e Centro-Oeste. Também é encontrada no sudeste do país, estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e mais recentemente, na área do Noroeste do estado de São Paulo (Yamamoto *et al.*, 1988, Evans *et al.* 1990, Costa *et al.*, 1991; Paranhos-Silva *et al.*, 1996; Tafuri *et al.*, 1996, Feitosa *et al.*, 2000). No estado do Rio Grande do Norte, além de se observar uma grande quantidade de cães da zona urbana infectados, tem se visto uma maior infecção de fêmeas na zona rural (Amóra *et al.*, 2006). Em Belo Horizonte que é uma grande área metropolitana, LVC é considerado uma endemia de grande importância para a saúde pública (Silva *et al.*, 2001).

A prática da eutanásia canina é recomendada a todos os animais sororreagentes e/ou parasitológicos positivos (Alencar, 1961, 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 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 (antimoniato de meglumina, anfotericina B, isotionato de pentamidina, alopurinol, cetoconazol, fluconazol, miconazol, itraconazol), têm tido baixa eficácia, além de possibilitar 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).

Além da leishmaniose canina, outros animais domésticos e de interesse no agronegócio tem sido encontrados parasitados, como gatos e cavalos (Maroli *et al.*, 2007; Barbosa-Santos *et al.*, 1994)

2.3. Diagnóstico da LVC

O diagnóstico da LVC normalmente é feito pela demonstração das amastigotas em aspirado de gânglios linfáticos, baço e especialmente em medula óssea. No entanto, a técnica é invasiva, além da necessidade de pessoal especializado e os resultados são de baixa sensibilidade detectando apenas cerca de 60% na medula óssea a 30% em gânglios linfáticos (Ferrer, 1999).

Uma das técnicas que tem aumentado a sensibilidade de detecção quando há uma baixa carga parasitária é a imunohistoquímica, principalmente em gânglios linfáticos (Moreira *et al.*, 2007), porém este método é demorado e não é de fácil manuseio não sendo adequado para diagnóstico imediato da infecção.

O ensaio da reação em cadeia da polimerase (PCR) tem melhorado muito a sensibilidade do diagnóstico parasitológico de infecções por *Leishmania* em cães. A PCR baseada no mini DNA circular do cinetoplasto (kDNA) tem-se revelado ser mais sensível comparada ao uso de alvos no DNA genômico detectado no sangue dos animais (Lachaud *et al.*, 2002; Nasereddin *et al.*, 2006).

A PCR em tempo real é uma técnica avançada que pode detectar níveis extremamente baixos de parasitos. Um estudo em cães naturalmente infectados indicou que a detecção do kDNA do parasito em PCR em tempo real, de sangue ou medula óssea é consideravelmente mais sensível do que por PCR convencional (Francino *et al.*, 2006; Manna *et al.*, 2008). Porém todos estes métodos são considerado caros para uso em grande escala.

Existem vários métodos de diagnóstico sorológicos de LVC para detecção de anticorpos contra *Leishmania* incluindo os testes de imunofluorescência indireta (IFI), western blot, aglutinação direta, imunocromatografia e ensaio de adsorção ligado à enzima - ELISA (Alvar *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2008).

Almeida e colaboradores (2005) comparando o diagnóstico por imunofluorescência indireta (IFI) e ELISA, demonstraram através IFI uma menor sensibilidade e maior especificidade (83 e 100%, respectivamente) em relação aos resultados do ELISA (94 e 90%), quando se utilizava extrato bruto de *Leishmania*. O teste Western Blot pode ser útil no acompanhamento específico ao tratamento dos casos de LVC (Riera *et al.*, 1999; Marín *et al.*, 2007).

A aglutinação direta (DAT) é muito utilizada na maioria dos países (Zijlstra *et al.*, 1991), mas as reações cruzadas com outros agentes infecciosos são fatores limitantes.

A imunocromatografia com base em ensaios com antígenos recombinantes ou purificados têm sido desenvolvida como alternativa promissora para o diagnóstico sorológico rápido em grande escala (como em condições de inquéritos epidemiológicos para controle da doença), mas o seu desempenho ainda não é bom (Mettler *et al.*, 2005).

Diferentes antígenos recombinantes foram testados em sorodiagnóstico de LVC (Carvalho *et al.*, 2002; Boarino *et al.*, 2007) entre eles o antígeno rK39 que mostrou resultados promissores na maioria dos estudos (Parrozzi *et al.*, 2006). Em uma comparação de métodos conjugado com diferentes combinações de antígeno, ELISA usando rK39 foi altamente específica (96 a 100%), mas mostrou pouca sensibilidade (29 a 65%) na detecção de cães infectados assintomáticos (Mettler *et al.*, 2005).

Lira e colaboradores (2006), fazendo uma análise comparativa do EIE (Ensaio Imunoenzimático para Diagnostico da Leishmaniose Visceral Canina) em relação ao imunofluorescência indireta para leishmaniose visceral canina (IFI) ambos kits da Bio-Manguinhos, demonstrou uma maior sensibilidade do EIE em relação ao IFI (72% e 68% respectivamente) para detecção de cães infectados que apresentavam sinais clínicos para LVC.

2.4. A Família E-NTPDase

A atividade de hidrólise de ATP e/ou ADP na superfície de muitos tipos de células tem sido reconhecida há várias décadas (Pearson, 1985). As enzimas que são capazes de degradar nucleotídeos extracelulares 5' di-trifosfatados similares ao marcador de linfócitos CD39 são incluídas na família E-NTPDases (Zimmermann *et al.*, 1999). Na literatura atual, também é conhecida por diferentes nomes como: Ecto-apirase, NTPase, E-ATPase e ATP-difosfolidrolases, o que exigiu o desenvolvimento de uma unificação na nomenclatura (Zimmermann *et al.* 2000).

Todos os membros dessa família compartilham um conjunto de curtas sequências denominado Regiões Conservadas de Apirases (ACRs) (Grinthal & Guidotti, 2006), que supostamente são de relevância para a sua atividade catalítica, visto que mutagênese sítio-dirigido de resíduos nas regiões conservadas I e IV das apirases, afetaram severamente a atividade nucleotidásica (Smith e Kirley 1999).

A atividade nucleotidásica destas enzimas é dependente da presença de cátions divalentes usualmente Ca^{2+} ou Mg^{2+} (Christoforidis *et al.* 1995; Berrêdo-Pinho *et al.*, 2001). No entanto alguns autores sugerem que as mudanças na atividade NTPDase podem ser promovidas por zinco e cádmio (Senger, 2006).

Essa família de proteínas tem membros não só dentro do Reino Protista, mas também têm representantes no grupo das 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).

Segundo a revisão de Robson, *et al.*, (2006), oito diferentes genes *ENTPD*, codificam proteínas da família E-NTPDase em camundongos e seres humanos (Tabela 1).

Quatro das enzimas NTPDases são tipicamente localizadas na superfície celular, com sítio catalítico na face extracelular (NTPDase1, 2, 3, 8). As NTPDases 5 e 6 apresentam localização intracelular e secreção após serem expressas de forma heteróloga. As NTPDases 4 e 7 são inteiramente localizadas intracelularmente. A Figura 2 hipotetiza uma árvore filogenética composta pelos membros da família E-NTPDase.

Especificamente para protozoários, trabalhos recentes têm sugerido uma correlação entre a capacidade de hidrólise de ATP extracelular e seus derivados e processos como virulência, sobrevivência intracelular e adesão celular (Fietto *et al.*, 2004; Marques-da-Silva *et al.*, 2008).

Recentemente Marques-da-Silva *et al.*, (2008) investigando o envolvimento da via de hidrólise de nucleotídeos extracelulares, com foco na adenosina extracelular, no estabelecimento da infecção em camundongos C57BL6 por diferentes espécies de *Leishmania*, além de demonstrar que a *L. amazonensis* foi a espécie mais virulenta dos parasitos, foi verificado também que o aumento da produção de adenosina é importante para o desenvolvimento da infecção, da lesão e do parasitismo tecidual. Sugerindo que a conversão de ATP, uma molécula com atividade pró-inflamatória em adenosina, que possui propriedades imunomoduladoras, pode contribuir para o estabelecimento da infecção por *Leishmania*.

Através de pesquisa no banco de dados (Genbank) em seqüências do projeto genoma de *L. major*, foram encontrados 2 genes homólogos das E-NTPDases (gi|45120584| e gi|15487213|) que por similaridade de seqüência são denominados respectivamente de NTPDase e guanosina difosfatase (GDPase). Hoje o gene que codifica a GDPase gi|15487213|, é encontrado com o código XM_001681293 devido a uma recente atualização feita no NCBI (2005), passando a codificar uma proteína reduzida de 16 aminoácido, da seqüência original, na porção N-terminal.

Tabela 1 – Membros da família E-NTPDases de humanos e camundongos. Fonte: Robson *et al.*, (2006).

Protein name	Additional names	Gene name human, mouse	Chromosome location human, mouse	Accession number human, mouse
NTPDase1	CD39, ATPDase, ecto-apyrase [43, 44]	<i>ENTPD1, Entpd1</i>	10q24, 19C3	U87967, NM_009848
NTPDase2	CD39L1, ecto-ATPase [49, 109, 252]	<i>ENTPD2, Entpd2</i>	9q34, 2A3	AF144748, AY376711
NTPDase3	CD39L3, HB6 [50, 177]	<i>ENTPD3, Entpd3</i>	3p21.3, 9F4	AF034840, AY376710
NTPDase4	UDPase, LALP70 [253, 254]	<i>ENTPD4, Entpd4</i>	8p21, 14D1	AF016032, NM_026174
NTPDase5	CD39L4, ER-UDPase, PCPH [137, 255, 256]	<i>ENTPD5, Entpd5</i>	14q24, 12E (12D1) ^a	AF039918, AJ238636
NTPDase6	CD39L2 [257-259]	<i>ENTPD6, Entpd6</i>	20p11.2, 2G3	AY327581, NM_172117
NTPDase7	LALP1 [260]	<i>ENTPD7, Entpd7</i>	10q24, 19D1 (19C3) ^a	AF269255, AF288221
NTPDase8	liver canalicular ecto-ATPase, hATPDase [52, 174]	<i>ENTPD8, Entpd8</i>	9q34, 2A3	AY430414, AY364442

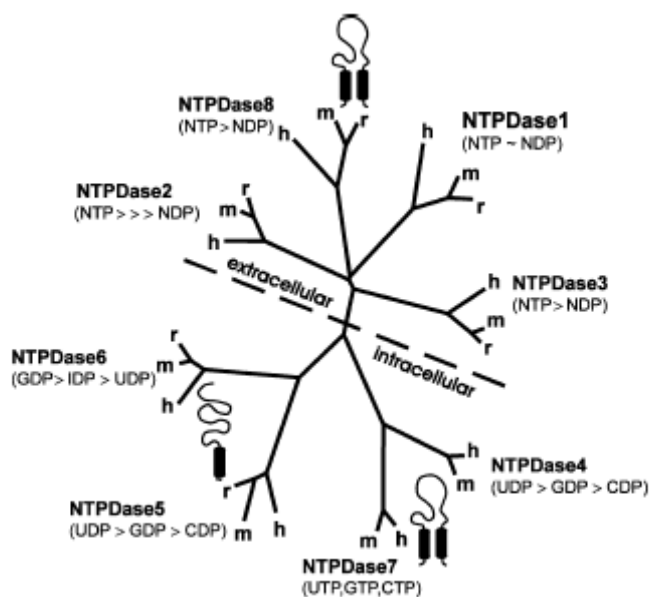


Figura 2 – Arvore filogenética hipotética dos membros da família E-NTPDase (NTPDase1- NTPDase8), de ratos, humanos e camundongos. O comprimento das linhas indica as diferenças entre as sequências de aminoácidos. O gráfico mostra uma clara separação entre as NTPDases localizadas na superfície (acima) e intracelular (baixo). O principal substrato e preferências de cada um dos subtipos previsto para cada grupo de enzimas é mostrado abaixo do nome das mesmas. A topologia da região transmembrana é indicada pelos barris. Fonte: Robson *et al.*, (2006).

Visto que a proteína GDPase de *L. major* apresenta uma identidade de 90,1% na sequência de aminoácido com a proteína de *Leishmania infantum chagasi*, neste trabalho foi realizado a expressão heteróloga, purificação e avaliação da utilização da isoforma GDPase de *L. major* como antígeno recombinante no imunodiagnóstico da leishmaniose visceral canina através de ensaio imunoenzimático (ELISA).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolamento e Clonagem da região codificante da GDPase de *L. major*

Todas as etapas de isolamento e clonagem do gene da GDPase de *L. major* foram realizadas anteriormente por Murilo Sena Amaral na Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

A cepa MHOM/IL/80/Friedlin de *Leishmania major* foi gentilmente cedida pelo Dr. Luiz Carlos Crocco Afonso do laboratório de Imunoparasitologia da UFOP. Para a extração de DNA genômico (DNAg) 1×10^8 células foram recolhidas por centrifugação a $13.000 \times g$ por 2 min, descartando o sobrenadante foi adicionado 500 μL de fenol equilibrado ao “pellet” e deixado a temperatura ambiente (T. A.) por 5 min. Em seguida foi adicionado 400 μL de 10 mM Tris (pH 8,0) estéril e homogeneizado no vortex. O homogeneizado foi submetido a centrifugação a $13.000 \times g$ por 10 min e recuperado a fase aquosa sem a interface. A essa foi adicionada 400 μL de uma mistura de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e homogeneizada no vortex.

O homogeneizado foi submetido a centrifugação a $13.000 \times g$ por 10 min e recuperada a fase aquosa sem a interface. A essa foi adicionada 400 μL de clorofórmio e homogeneizado no vortex. Sendo posteriormente centrifugada a $13.000 \times g$ por 10 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 h no freezer $-80 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo posteriormente centrifugado a $13.000 \times g$ por 20 min a 4°C . O sobrenadante foi descartado, adicionando ao precipitado 500 μL de etanol 70% gelado e a amostra foi centrifugada a $13.000 \times g$ por 5 min a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o “pellet” colocado para secar com a tampa aberta. Posteriormente o “pellet” de DNA seco foi suspenso em 50 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 pb 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 bactérias 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-100TM). A reação foi realizada em um volume total de 50 μ L, utilizando 4 μ L do DNAG; 5,0 μ L de tampão 1,5 mM MgSO₄ (fornecido pelo fabricante da Taq DNA Polimerase); 2,4 μ L do mix de 2,5mM dNTPs (dCTP, dTTP, dGTP, dATP); 2 μ L dos oligonucleotídeos em uma concentração de 20 pmol/ μ L; 0,5 μ L 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 analisadas 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 *et al.*, 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 80 V, utilizando como tampão de corrida 1X TAE. A banda de cerca de 2,1 kb foi purificada do gel de agarose utilizando o Kit “PureLinkTM Quick Gel Extraction” (invitrogenTM) conforme instruções do fabricante. Foi utilizado o sistema TOPO (InvitrogenTM) para a subclonagem inicial do gene.

A banda do amplicon foi suspensa em um volume total de 20 μ L de água ultra-pura estéril e 5 μ L desta solução foi usada na ligação feita a 16 °C por 12 h, de acordo com manual do fabricante (TOPO® TA Cloning® Kit for subcloning - Invitrogen). A mistura de ligação (~6 μ L) contendo vetor TOPO + amplicon da GDPase, foi adicionada a 100 μ L de solução contendo bactérias *E. coli* TOP 10F', previamente tornadas competentes (Sambrook *et al.*, 1989). A mistura foi incubada em gelo por 45 min, submetida a choque térmico (42 °C) por 1 min e colocada novamente no gelo. Adicionaram-se 1 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 (TECNAL).

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 mg/mL⁻¹) e incubadas por 12 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 *Bam*H I e *Sal* I) a partir do plasmídeo extraído por minipreparação plasmidial de acordo com

Sambrook *et al.*, (2000). Um dos clones isolados e confirmado foi então submetido a seqüenciamento automático parcial usando iniciadores flanqueadores da região de clonagem em aparelho Mega-Bace (GE Amershan) de acordo com instruções do fabricante. Este procedimento foi realizado pelo Laboratório de Biologia Celular e Molecular da UFOP. Os clones que continham a construção, foram estocadas em meio LB-líquido em tubos de microcentrifuga com 20% de glicerol e mantidos a -80 °C.

3.2. Obtenção de Células *E. coli* Competentes

Células de *E. coli*, linhagem TOP 10F', foram pré-inoculadas em 3 ml de meio LB-líquido contendo estreptomicina (10 µL/mL) e tetraciclina (10 µL/mL). As células foram crescidas sob agitação constante (200 rpm), por 14-16 h a temperatura de 37 °C. Após o crescimento, as bactérias foram transferidas para um erlenmeyer contendo 100 mL de LB sem antibiótico. Procedeu-se nova incubação a 37 °C, 200 rpm por um período de 2-3 h até que as células atingissem uma densidade óptica (DO₆₀₀) entre 0,6 e 0,8. Atingida a DO₆₀₀, as bactérias foram submetidas à centrifugação a 1000 x g por 8 min a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e as células foram suspensas em 40 mL de 0,1 M CaCl₂ gelado. Incubou-se no gelo por pelo menos 1 hora. Após a incubação, procedeu-se nova centrifugação a 1000 x g por 5 min a 4 °C. Desprezou-se o sobrenadante, e as células foram suspensas em 1 mL de 0,1 M CaCl₂. Aliquotas de 100 µL foram estocadas em tubos de microcentrifuga, contendo 30% de glicerol, e mantidas a temperatura de -80 °C até utilização nas transformações.

3.3. Extração do DNA plasmidial

O DNA plasmidial (DNAP) foi extraído pelo método da lise alcalina (Sambrook *et al.*, 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 mg/mL⁻¹) por 12 h a 37 °C em 180 rpm. Após o crescimento um volume de 1,5 mL de cada cultura foi transferido para tubos de microcentrifuga, e as células foram coletadas por centrifugação (Centrifuga 5415C- EPPENDORF) a 12000 x g por 1 min e 30 seg. O sedimento

celular foi lavado com 0,5 mL de STE para retirada de inibidores de endonucleases (0,1 NaCl, 10 mM Tris.Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0). Após a centrifugação foram adicionados 200 µL da solução I gelada (25 mM Tris.Cl pH 8.0, 10 mM de EDTA e 5mM de D-Glicose) e suspenso vagarosa e completamente o “pellet”. Em seguida foram adicionados 200 µL da solução II (NaOH 0,2M, SDS 1%) preparada na hora, e os tubos foram invertidos lentamente por 6 vezes e mantidos no gelo por 5 min. Após isso, 150 µL da solução III gelada (3 M Kac, 2 M Hac pH 8.0) foram adicionados e os tubos foram invertidos lentamente 6 vezes e mantidos no gelo por 5 min. Em seguida os tubos foram centrifugados por 12000 x g por 5 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 min.

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

3.4. Transferência da região codificante da GDPase de *L. major* para vetor de expressão em sistema procarioto pET-21b

O vetor de amplificação TOPO contendo o gene, foi submetido a digestão com *BamH*I e *Sal*I. Após a digestão, a mistura do vetor TOPO, foi submetida a 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 3 mostra um esquema da 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 TOPO). A seleção dos clones foi feita por análise de restrição e sequenciamento (Figura 4). Os clones positivos foram estocados em tubos de microcentrifuga, contendo 30% de glicerol, e mantidos a temperatura de -70 °C.

3.5. Expressão da rGDPase de *L. major* 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 seqüência de 6 resíduos de histidina na porção carboxi-terminal da proteína recombinante, esta esquematizado na Figura 3.

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 seqüência de aminoácidos predita está descrita na figura 4.

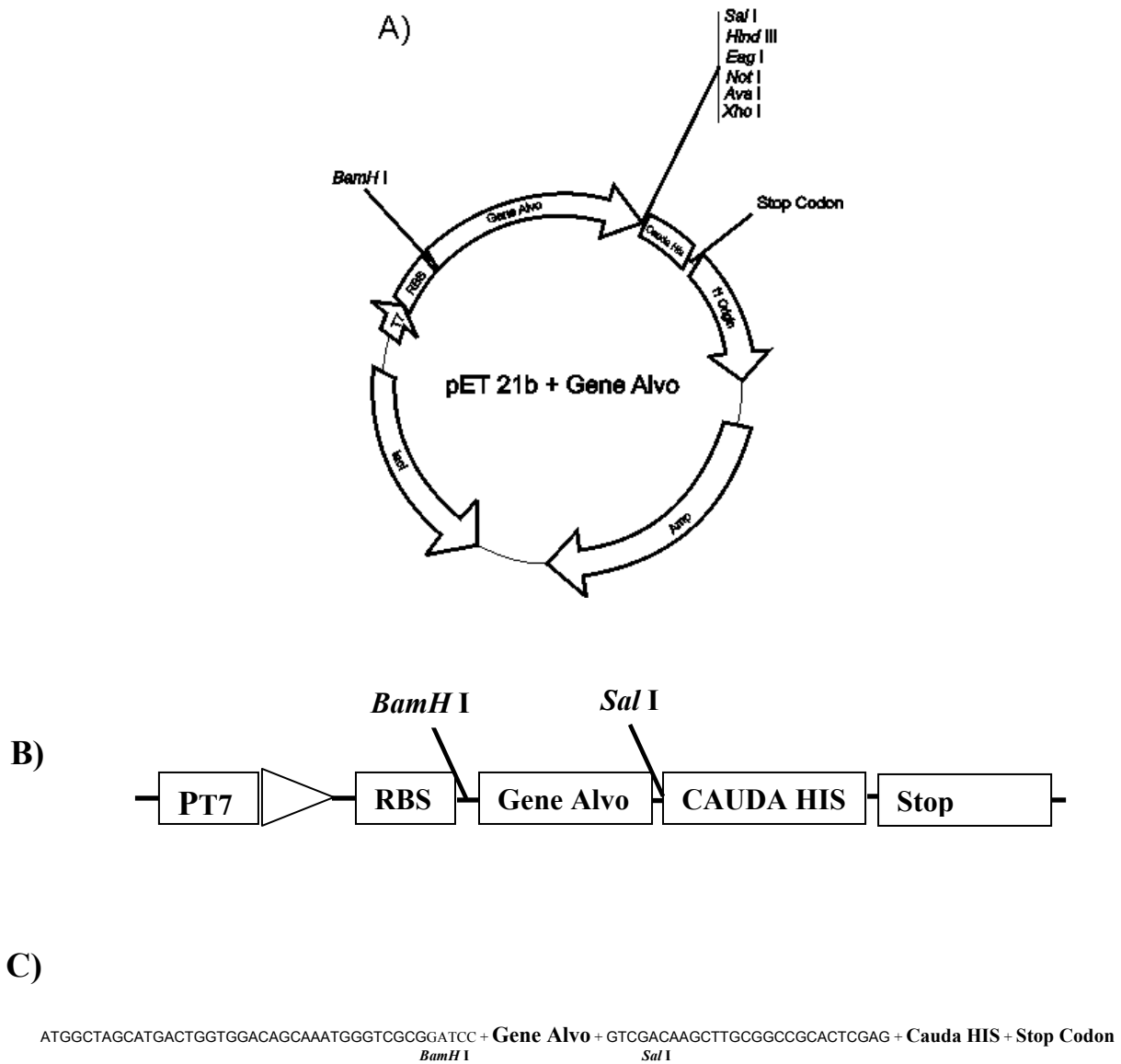


Figura 3 – Construção no vetor pET-21b contendo a região codificante do gene gi_15487213]. A) Mapa físico da construção indicando as principais regiões da construção bem como as características do vetor. B) Esquema detalhando a região de inserção do gene gi_15487213] no vetor pET-21b, mostrando o promotor T7 (local onde a RNA polimerase T7 se ligará após as células serem induzidas por IPTG), o sítio RBS correspondente a sequência shine-Delgarno, ou sítio ligador de ribossomos da *E. coli*. C) Esquema detalhando a região de clivagem por *BamHI* e *SalI* bem como os pares de bases a mais, inserido pelo vetor incluindo a cauda poli-His e o códon de parada.

M A S M T G G Q Q M G R G S M P M T D G
1 atggctagcatgactggtggacagcaaatgggtcgcggatccatgccaatgactgacggc 60
R V P G G K L R R S M S R **V V L A F F A**
61 cgcgtcccagggcgaagttacggaggagcatgagtcgctcgttcttgccttcttcgcc 120
A V L F V V F L T A Y E V G V G T A N P
121 gctgtgcttttcgctcgtctttctcacggcgtacgaagtggcgttggcactgccaacccg 180
L Q S R H M Q L T Q N A V K K S E E N L
181 cttcagtctcggcacatgcagctcacgcagaacgccgtgaagaagagtgaggaaaatcta 240
V N C R E V N T D L R S G G D V N V A R
241 gtgaactgccgcgaggtcaacacggatttaagaagtgggtggacgtcaatgctgcacgg 300
A M A E M R R Q R E E L M N I V A L E R
301 gcgatggcggagagggcggcagagagagtgatgaacatcgtcgcgctggagcgt 360
E R V V S A R S L L Q V C E D E L A S D
361 gagcgtgtagtgctggcgcgtagtctgctgcagtttgcgaggatgagctagcgcgac 420
L S V L F G V A D H N F T A R L R S L E
421 ctcagcgtactcttcgggtgctcgtgaccataacttcaactgcgcgcctccggctggtggag 480
K K R K H L E G L H S M L N T D P F G A
481 aaaaagcggaaacacttggagggttgcactcgtgctcaacacggacccttgggtgca 540
V Q L R S S S E I R A L Q A A L F H E M
541 gtgcagctgctgcagcagcagcgaatccgcgcgctgcaggcggctctctttcacgagatg 600
R A S K K K A E N G V A S G A A C A K S
601 cgcgccagcaagaagaaagcagaaaacgggtgtggcagcggcgcggcgtgcgcgaagtct 660
S V K Y S V V F **D I G S T G** N R V H V Y
661 tcggtaagtagtccgctcgtgttcgatattggcagcactggaaatcgtgttcatgtctac 720
K Y R V A P A T R T A A A A G S E L S D
721 aagtacagagtggcacctgccacgcgtaccgctgccgcggccggcagtgagctcagcgcac 780
I D L V E E L F E L N H K A L S E L E N
781 atcgacctcgtcgcgagggttatttgagctaaatcacaaagcccttagcgcgagctcgagaat 840
S V Q D A P E A L W E L F V K A K D C F V
841 tcgggtcaggatgctgcggaggctttatgggagctcttcggtgaaagccaaggactttgta 900
P A E L H A C T A A E F K **A T A G L R M**
901 ccggcggagctgcacgcacgcgcggcggcagttcaaggctaccgcgggctgcgcacatg 960
L G M E K A N E I L A G I R A R Y R N E
961 ctggggatggagaaggccaacgaaattcttgcggcattcgcgcgcgctaccgcaacgag 1020
T F W L R G N A S V R I L D **A C E E E G P**
1021 acgttctggttgcgcggcaacgcacatcagttcgcacatcttggatgcctgcgaggaggccca 1080
M A W L T V N Y L L G A F S R G A T A T
1081 atggcgtggctgacagtaactacttactgggggcatctccaggggtgcaacggcaacc 1140
D S T V A V I **D L G G G S T Q I** V F E P
1141 gactcgcaggtggccgctcagatctcggcggcggctccacgcaaatcgtcttogaacc 1200
G E S T F H G M R T D F R Y A A T L G S
1201 ggcgagagcactttccacgggatgcgcaccgatttccgctacgcggcaaccttgggcagc 1260
R S V R A Y Q H S Y E G Y G L H A A T K
1261 cggtcagtgcagcctaccagcacagctacgaaggctacggcctgcacgcggccaccaag 1320
K L L Y H I Q G K S Q E K P G G G T A T
1321 aagctgctttaccacatacaaggcaagagccaagagaagccgggcggtggcaccggccacc 1380
N T A M T T T T T A P A N G G D E V L P
1381 aacacagcaatgacgaccaccacgacagcaccggcgaacggcgggtgacgaggtcctgcct 1440
V W K A L R N L G A D G R S E R G D I V
1441 gtttgaaggctctgagaaacctgggtgcagacgggagaagcgcgagcgcgacatcgtc 1500
T K R A P P M P P P D A E A M E A F P C
1501 accaagagagcgcggccgatgccaccgcccagacgcggaggcgtggaggcgttcccgctgc 1560
F A V G Y E D P L G V K N V K R N N A E
1561 ttcgctgtcggctacgaagaccactaggggtgaagaacgtcaagagaaacaatgccgag 1620
E P V M P P N F Q A C A N L F R D R L L
1621 gagccggttatgccccgaacttccaggcttgcgcgaaccttttccgcgacatgggtgctg 1680
K P V G L T C E A V N C G I A G V M Q P

```

1681 aagccagtggggctgacatgtgaggcagtcactgcgccatcgctggtgtcatgcagcca 1740
      P L T N F T G E I Y A F S F I F D L L V
1741 ccgctgaccaacttcaccgggtgaaatctacgcgttttcgttcatctttgatctgctggtt 1800
      L A N S S L V P A G A A V S K E K F E V
1801 ttggcgaacagctccctggtgccagcgggggctgctgtgtcgaaggaaaagtttgagggtg 1860
      K L P D L A K I A E G H C A A F S L T R
1861 aagctgccggacctagcgaagatcgcgagggtcactgcgccccttctccctcaccogt 1920
      I A E A T A K G G L G S L K P E Y E C M
1921 atcgccgagggcgaccgccaaggggggctcggtagcctaaagccggagtagcagtgatg 1980
      Y Y S Y V Y A L L R Y G Y E V P E D R V
1981 tattactcctacgtgtacgcgcttctccgctacggttacgaggtgccagaggaccogtg 2040
      L H V A K K I R G Y E T A W S L G A S L
2041 ctgcacgtggcgaagaagatccgcggtacgagaccgcctgggtccctcggcgccctcactc 2100
      L S L T V D K L A A A L E H H H H H H *
2101 ctctctcttaccgtcgacaagcttgcgccgactcgagcaccaccaccaccactga 2160

```

Figura 4 – Sequência de nucleotídeos da região codificante da GDPase de *L. major* (gi_15487213) e sequência de aminoácidos predita para a proteína de fusão GDPase-6xHIS. Marcado de vermelho são os nucleotídeos e aminoácidos adicionais derivados da construção no vetor pET-21b, incluindo o códon de parada (*). A proteína predita contém 719 aminoácidos, que constituem a proteína rGDPase com massa molecular de 78,2 kDa. Verde: **Peptídeo sinal**; Amarelo: Regiões conservadas de apirases (ACRs); vermelho: **Pares de base inserido pelo vetor pET-21b**. Sublinhado se refere aos pares de base que codificam a cauda de histidina. Sequências preditas no site NCBI, e processadas no workbench (<http://workbench.sdsc.edu/>).

Um total de 45 nucleotídeos extra, correspondentes à 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.

Em seguida, realizou-se um pré-inóculo em 5 mL de meio líquido LB contendo 50 µL de de ampicilina (5 mg/mL⁻¹) a partir do clone preservado em glicerol. Este pré-inóculo foi incubado por 16 h a 37 °C sob agitação. Uma alíquota de 2,5 mL de cultura foi coletada e inoculada em um volume total de 250 mL de LB-líquido (diluição 1:100) contendo 2,5 mL de ampicilina (5 mg/mL⁻¹). Essa mistura foi incubada a 37 °C sob agitação e o crescimento celular foi acompanhado pela leitura de sua DO₆₀₀. Para indução da proteína recombinante modificada usou-se IPTG (isopropyl β-D-thiogalactopyranoside). No momento em que a DO₆₀₀ atingiu cerca de 0.6, foram adicionados aos tubos de cada clone 0,3 mM de IPTG, concentração definida previamente, conforme descrito abaixo. A incubação prosseguiu por mais 2 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 min e suspenso em tampão de lise (50 mM Tris (pH 8.0), 300 mM NaCl, em água destilada) , na proporção de 3 mL por grama de sedimento, contendo 30 µL de de PMSF (100 mg/mL), 50 µL de aprotinina (1 mg/mL), 50 µL de pepstatina (1 mg/mL). Em seguida foi adicionado 1 mg/mL de lisozima e manteve-se no gelo por 30 min.

Procedeu-se então o rompimento final das células por sonicação (Lab-Line Ultratip Labsonic System, Lab-Line instruments) por 6 vezes por 10 segundos na potência 200 W com intervalo de 10 segundos no gelo entre cada sonicação. Em seguida adicionou-se 0,1% Triton e o material foi centrifugado por 30 min a 20.400 x g (BECKMAN J2-MI, utilizando o rotor JA-20) 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 mg/mL⁻¹) e incubadas a 37 °C por 12 h sob agitação. Uma alíquota de 250 µL de cultura foi coletada e diluída para um volume total de 5 mL (diluição 1:20) 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 DO_{600} de aproximadamente 0.6, alíquotou-se 1 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 mais 2 h a 37 °C sob agitação. Ao final deste tempo 1 mL de cada cultura foram coletados (controles induzidos) e feita a leitura de DO_{600} . 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 min. Os lisados bacterianos foram analisados por SDS-PAGE 10% de acordo com Laemmli, (1970). Foi utilizado o sistema de eletroforese vertical Mini-PROTEAN[®] (BIO-RAD) pequeno (1mm de espessura). As amostras foram aplicadas na DO_{600} 3,0, para um volume total de 20 μ L 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 (Fermentas).

Para otimizar o tempo de indução, o experimento foi delineado conforme acima, sendo usado IPTG na concentração de 0,3 mM e as coletas foram feitas de hora em hora até um total de 5 h. Posteriormente os extratos foram analisados por SDS-PAGE 10%.

3.6. Purificação da proteína recombinante e análise em gel de SDS

Para purificação da proteína recombinante foram empregadas as amostras do sobrenadante (solúvel) e do “pellet” (fração insolúvel ou corpos de inclusão devidamente solubilizados, como descrito abaixo. Estas amostras foram mantidas sobre agitação na presença de 500 μ L da resina HIS-Select[™] Nickel Affinity Gel (SIGMA) devidamente preparada segundo o fabricante, em tubos de 15 mL por 1 hora 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, a esta foi adicionado um volume de 2 mL de tampão de lavagem 1 (50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl₂, 5 mM MgCl₂). Esse procedimento se repetiu por 2 vezes. Em seguida foi adicionado um volume de 2 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 vezes. Em seguida foi adicionado um volume de 2 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 vezes. Posteriormente as proteínas mais fortemente ligadas a resina foram eluídas em tampão de eluição. Um volume de 1,5 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 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 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 estocadas à 4°C e analisadas em gel de SDS 10% corado com comassie blue. As amostras foram aplicadas em um volume total de 20 µL, sendo 15 µL de amostras da purificação e 5 µL de tampão de amostra SDS-PAGE 10% 4X (Sambroock *et al.*, 2000).

Para solubilização da fração insolúvel (corpos de inclusão), ao “pellet” foi adicionado o tampão de ligação 1 (50 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl₂, 10 mM β-mercaptoetanol) e posteriormente centrifugada a 20.400 x g (BECKMAN J2-MI, utilizando o rotor JA-20) por 15 min a 4 °C e o sobrenadante foi recolhido. Esse processo foi repetido. Em seguida o “pellet” contendo os corpos de inclusão foram suspensos com auxílio de pipeta em 1 mL com tampão X (50 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl₂, 10 mM mercaptoetanol, 8M uréia). Posteriormente adicionou-se 25 mL do tampão de ligação 2 (50 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl₂, 5 mM MgCl₂) vagarosamente incubando por 30 min a temperatura ambiente. Em seguida a amostra foi adicionada a resina previamente equilibrada como descrito pelo fabricante, e os passos foram seguidos conforme descrito acima.

3.7. Western Blot

Várias amostras do processo de purificação foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE 10% e transferidas sob corrente elétrica para membrana de nitrocelulose (RPN203D Hybond ECL, Amersham Biosciences) sob a condição de transferência de 200-250 mA por 2 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 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 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 (Molico).

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 (Santos *et al.*, 2008) ou anti-rGDPase de *L. major* 1:2000 diluídos em tampão TBS-T por cerca de 16 h à 100 rpm. Posteriormente a membrana passou por 3 lavagens com tampão TBS-T por 5 min, sob leve agitação constante. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (SIGMA[®]), na diluição de 1:20.000. A membrana foi deixada sob agitação a 100 rpm por 1 hora. Em seguida, a membrana passou por mais 3 lavagens com tampão TBS-T por 5 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 μ L 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.

3.8. Quantificação da proteína recombinante

A quantificação da proteína recombinante purificada foi baseada na curva padrão da proteína soroalbumina bovina (BSA). Para tanto foi feita uma diluição seriada de BSA, iniciando de 20 até 0,0098 μ g e a quantificação foi feita utilizando o reagente Bradford da Bio Rad de acordo com manual do fabricante. As leituras de DO foram feitas a 595 nm. Os dados foram processados no programa Excel (Microsoft Office-2007) (Figura 5).

Com a equação da reta obtida, foi determinada a concentração das proteínas recombinante purificadas.

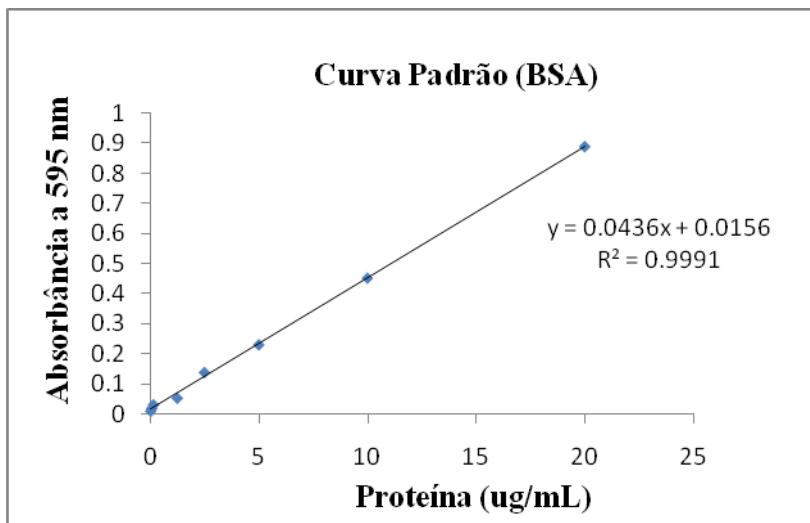


Figura 5 – Curva de calibração, utilizando diluição seriada da proteína BSA, pelo método de Bradford.

3.9. Produção de anticorpo policlonal anti-rGDPase

A produção do anticorpo foi feita utilizando um coelho (Nova Zelândia) fêmea de aproximadamente 2 meses (700g). Foram feitas inoculações na região subcutânea. As aplicações continham 40 µg da proteína recombinante purificada como descrito anteriormente e 40 µg de saponina (Saponina 5012 sample No SOSO8064 Quantity 100 g Kerry Bio- Science Ireland) como adjuvante em 800 µL de volume final acertado com PBS. Foram realizadas três imunizações com intervalos de aproximadamente 15 dias. O animal foi sangrado via plexo ocular antes das imunizações como controle (soro pré-imune) e quinze dias após a última imunização. A sangria foi feita com auxílio de pipeta pasteur estéril. O sangue coletado foi mantido a 37 °C por 30 min e posteriormente, o coágulo foi deslocado da parede do tubo com o auxílio de um palito de madeira e a amostra centrifugada a 800 x g por 15 min. Após a centrifugação o sobrenadante (soro) foi cuidadosamente coletado, aliquotado e armazenado a – 20 °C.

3.10. Titulação do soro imune anti-rGDPase de *L. major*

A titulação do anticorpo produzido foi feita por western blot. O procedimento seguiu como descrito acima, contudo o que diferiu, foi que as proteínas recombinantes purificadas foram aplicadas nas 6 canaletas do gel na mesma concentração (1 µg/µL) num total de 15 µg e posteriormente a transferência a membrana foi cortada em seis tiras que foram incubadas respectivamente com soro pré-imune ou soro imune nas diluições de 1:500, 1:1000: 1:2000; 1:5000; 1:10000 separadamente.

Para a titulação do anticorpo utilizando os extratos induzidos de *E. coli* com o vetor pET-21b contendo o gene da GDPase e o vetor pET-21b vazio, o procedimento foi feito como o descrito para a proteína recombinante purificada. No entanto a aplicação dos extratos se deu na DO₆₀₀ de 3,0 e após a transferência, a membrana foi cortada, contendo os dois tipos de extratos. As membranas foram incubadas, com o soro imune nas diluições de 1:500, 1:1000: 1:2000; 1:5000; 1:10000; 1:20000 separadamente.

3.11. Purificação do soro imune anti-rGDPase de *L. major*

Extrato de *E. coli* BL-21 transformada com o pET-21b vazio, foram submetidos a um gel de SDS. Após a corrida, foi realizada a transferência de todo o extrato para a membrana de nitrocelulose conforme descrito nos ensaios de western Blotting. Em seguida a membrana foi incubada com 1,0 mL do antissoro bruto + 4,0 mL de TBS *overnight*. Após esse período o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -20° C para posterior utilização.

3.12. Ensaios de ELISA indireto usando a rGDPase como antígeno

Os experimentos de ELISA para análise da reatividade da proteína recombinante purificada com anticorpos presentes em soros da soroteca de cães previamente diagnosticados (gentilmente cedidas pelo grupo da Dra. Maria Terezinha Bahia e Dr. George Luiz Lins Machado Coelho da Universidade Federal de Ouro Preto) foram realizados segundo método descrito por Abreu e colaboradores (2004). Todos os ensaios foram procedidos no Laboratório de Parasitologia-UFOP, coordenado pela Prof^a. Dra. Maria Terezinha Bahia, tendo colaboração do doutorando Ivo Caldas em todos os ensaios de ELISA indireto. Foram utilizados 117 soros positivos de cães infectados com *Leishmania* sp. em diferentes estágios da doença (42 soros de animais assintomáticos, 44 soros de animais oligossintomáticos e 31 soros de animais polissintomáticos) e 52 soros de animais negativos.

Para adsorção da rGDPase, placas de micro-diluição (96 well Costar[®] High Binding EIA/RIA polystyrene plates-Corning Inc., 3590) foram expostas a uma solução contendo 1,5 µg da proteína 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 três vezes com PBS-T (PBS com 0,05% Tween-20) para retirar o excesso de solução de bloqueio. Após as lavagens, foram adicionadas as diluições seriadas dos soros utilizados (1:10; 1:20; 1:40; 1:80; 1:160; 1:320; 1:640). As amostras dos soros foram diluídas em tampão contendo PBS com 0,05% Tween-20. A reação contendo diluições do soro foi incubada por 1 hora a 37 °C. A lavagem prosseguiu da mesma maneira como descrito anteriormente. A reação com o anticorpo anti-IgG de cão conjugado a peroxidase (Bethyl. laboratories, INC,

Montgomery-TX, USA) na diluição 1:5000, foi incubada por 1 hora a 37 °C. A placa foi novamente lavada conforme descrito acima. A reação da proteína recombinante com anticorpos foi evidenciada através de revelação com 5mg/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 min. A reação foi interrompida pela adição de 32 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).

O kit de ensaio Imunoenzimático (EIE) para Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (Bio-Manguinhos) foi utilizado para confirmação dos diagnósticos previamente feitos dos soros positivos e negativos. Os soros foram utilizados na diluição de 1:100, e os procedimentos foram feitos de acordo com o fabricante. A análise dos dados foi feita no programa Prisma 3.0.

3.13. Análises estatísticas

A linha de corte (*Cut-off*) foi dada pela média dos valores de DOs dos controles negativos mais o desvio-padrão desses valores, onde o número de desvio padrão utilizado na fórmula garante o nível de confiança do resultado.

$$\textit{Cut-off} = \text{média das DOs} + 2x \text{ desvio-padrão das DOs} \Rightarrow 95\% \text{ de confiança.}$$

Logo, para a amostra ser positiva, seu valor em DO deve ser maior ou igual ao valor do *Cut-off*. Na amostra negativa, sua DO é menor que o valor do *Cut-off*.

A sensibilidade e especificidade dos testes foram determinadas como segue: Sensibilidade= $VP / (VP + FN) \times 100$; Especificidade= $VN / (VN + FP) \times 100$; Valor Preditivo Positivo= $VP / (VP + FP) \times 100$; Valor Preditivo Negativo= $VN / (VN + FN) \times 100$; Precisão= $VP + VN / (VP + FP + VN + FN) \times 100$. VN: verdadeiros negativos; VP: verdadeiros positivos; FN: falsas negativos; FP: falsos positivos (Harlow & Lane, 1988).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da concentração de agente indutor

O promotor T7 presente no vetor pET-21b utilizado neste estudo, é induzido por isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG), de modo que a adição desse composto químico ao meio de cultura ativa a transcrição do gene inserido a jusante do promotor. Sendo assim, inicialmente fizemos ensaios de expressão da proteína recombinante em pequena escala para padronização da concentração do indutor a ser usada para produção em maior escala da proteína em questão. Nesse contexto, delineamos experimentos onde as células de *E. coli* BL21(DE3), que anteriormente já haviam sido transformadas com a construção pET-21b + gene da GDPase (dados não publicados), foram submetidas à indução em diferentes concentrações de IPTG por duas horas.

Os extratos protéicos foram analisados por eletroforese SDS-PAGE e por western blot usando antissoro anti-NTPDase1 de *T. cruzi* (Figura 6). Analisando o resultado do SDS-PAGE não foi possível observar diretamente a presença de uma banda protéica de 78,2 kDa distinta nos extratos induzidos em relação ao controle não induzido (Figura 6A). Para visualização da banda específica da rGDPase foi feito o western blot que indicou uma expressão visualmente similar entre todas as concentrações de indutor testadas sendo que, aparentemente para uma produção ligeiramente melhor, a concentração de IPTG para indução do promotor *lac* na transcrição do gene que codifica a rGDPase (78,2 kDa) foi a de 0,3 mM (Figura 6, canaleta 6).

A amostra de rNTPDase1 de *T. cruzi* (70 kDa) foi utilizada como controle, visto que as NTPDases são proteínas da família das E-NTPDases e apesar de serem bastante divergentes possuem regiões conservadas denominadas ACRs (Apyrase Conserved Regions) utilizadas para sua classificação dentro desta família de proteínas (Zimmermann, 2000) e capazes de produzirem anticorpos que reconhecem proteínas de organismos diferentes (Fietto *et al.*, 2004). Curiosamente o western blot não reconheceu esta proteína controle (Figura 6B, canaleta 1), o que pode ser explicado por exemplo por degradação da proteína em questão. Porém algumas bandas protéicas foram visualizadas na eletroforese em SDS-PAGE (Figura 6A, canaleta 1), sendo que estas bandas parecem ser parte da amostra da canaleta 2 que contaminou a canaleta 1.

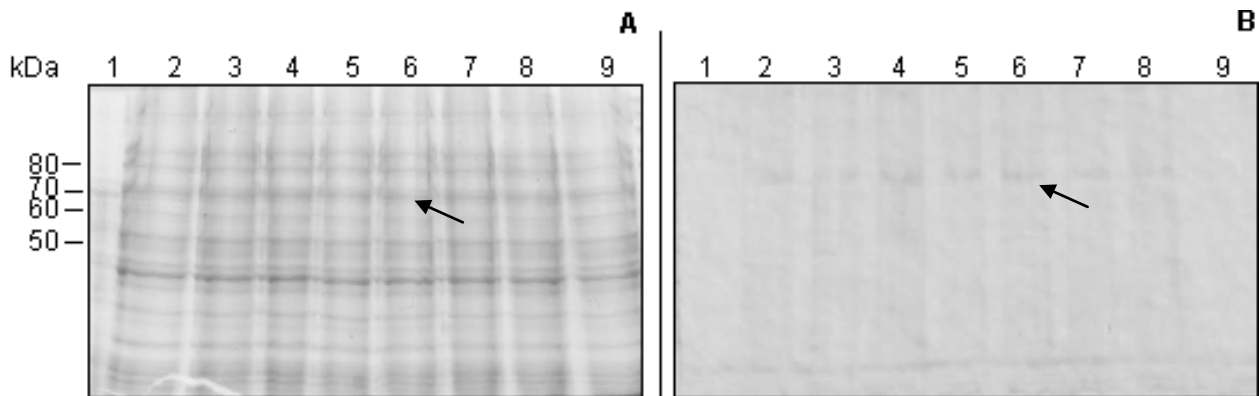


Figura 6 – (A) SDS-PAGE 10% e (B) Western Blotting usando antissoro policlonal anti-rNTPDase1 de *T. cruzi* 1:1000 em extratos de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com a construção contendo o gene da GDPase e induzidos com diferentes concentrações de IPTG. 1: rNTPDase de *T. cruzi*; 2: extrato de células induzidas com 1mM de IPTG; 3: induzidas com 0,8 mM de IPTG; 4: induzidas com 0,6 mM de IPTG; 5: induzidas com 0,4 mM de IPTG; 6: induzidas com 0,3 mM de IPTG; 7: induzidas com 0,2 mM de IPTG; 8: induzidas com 0,1 mM de IPTG; 9: sem indução.

4.2. Avaliação do tempo de indução

Dependendo do tempo em que o indutor age sobre o promotor *lac*, há variação na transcrição do gene, para a produção de proteínas recombinantes (Chakraborty *et al.*, 2008; Deirdre *et al.*, 2004; Zagursky *et al.*, 2000). Sendo assim, foram conduzidos experimentos com o intuito de determinar o melhor tempo de ação desse indutor usando a concentração de 0,3 mM. Para tanto os extratos foram recolhidos de hora em hora antes e após a indução e analisados por SDS-PAGE e western blot (Figura 7). Este resultado demonstra que nas condições testadas o melhor tempo de indução para produção da rGDPase foi de duas horas (Figura 7, canaleta 7).

As proteínas previamente purificadas rGDPase de *L. brasiliensis* e NTPDase de *T. cruzi* bem como Apirase de batata (*S. tuberosum*) (canaleta 1, 2 e 3), foram utilizadas como controle. No entanto, a rGDPase de *L. brasiliensis* não foi visualizada em nenhuma das duas técnicas e a apirase de batata não foi revelada no western blot. Possivelmente no caso da proteína de *L. brasiliensis* isso pode se dever ao fato da amostra estar em baixa concentração ou degradada. É possível que o fato da apirase de batata ser visível no SDS-PAGE (~54 kDa) mas não reconhecida no western blot, seja explicado pela diluição do anti-soro primário, o qual foi produzido com a rNTPDase de *T. cruzi*, proteína que apresenta uma alta divergência molecular (~ 0.737) com a apirase de batata.

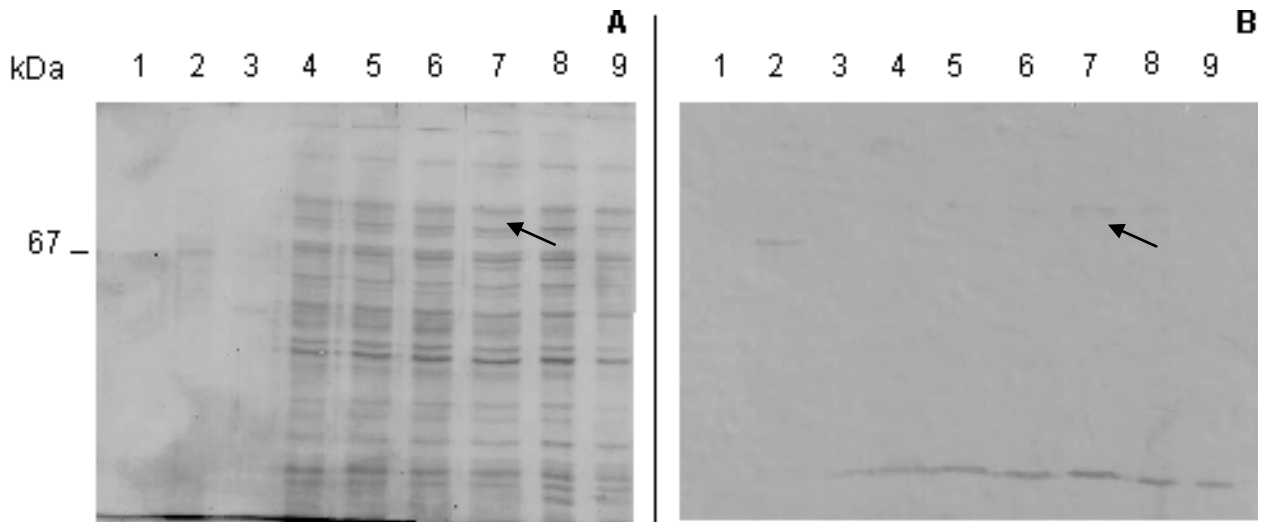


Figura 7 – (A) SDS-PAGE 10% e (B) Western Blotting usando antissoro policlonal anti-rNTPDase1 de *T. cruzi* 1:1000 em extratos induzidos de *E. coli* BL21(DE3) transformada com a construção contendo o gene da GDPase. 1: rGDPase de *L. braziliensis* purificada; 2: rNTPDase de *T. cruzi* purificada; 3: Apirase de batata (*S. tuberosum*); 4: 5h de indução; 5: 4h de indução; 6: 3h de indução; 7: 2h de indução; 8: 1h de indução; 9: tempo 0.

4.3. Expressão heteróloga e purificação da GDPase recombinante de *L. major*

No geral, as proteínas recombinantes expressas em sistema procarioto, são encontradas em maior concentração na fração insolúvel formando agregados (Bleimling *et al.*, 2008; Zebisch *et al.*, 2007; Deirdre *et al.*, 2004). No entanto, no caso da rGDPase de *L. major* o perfil eletroforético indicou que a maior concentração da rGDPase foi expressa na fração solúvel (dados não mostrados), assim a proteína recombinante foi purificada a partir desta fração.

A metodologia usada para purificar a proteína recombinante em questão foi a cromatografia de afinidade. Este é um método que tem se tornado padrão para o isolamento e purificação de proteínas recombinantes fusionadas a grupos específicos, como poli-Histidina usada no presente estudo. Para proteínas fusionadas à uma cauda de histidina utiliza-se como ligante na cromatografia de afinidade íons como níquel ou cobalto.

Na cromatografia de afinidade em coluna de agarose ligada a Ni^{2+} , as proteínas fusionadas com uma cauda de poli-histidina no C- ou N-terminal, são purificadas pela atração entre o Ni^{2+} e o grupo imidazol presente na cadeia lateral da estrutura da histidina. Na construção usada neste estudo para expressão da rGDPase de *L. major* optou-se por uso da fusão no C-terminal (Figura 3C) visto que por análise *in silico* há a predição de um peptídeo sinal para secreção na porção N-terminal da proteína (Figura 4) e neste estudo optamos por manter esta região na proteína recombinante para inclusive podermos avaliar se o mesmo seria funcional na expressão em sistema procarioto. Utilizando a metodologia de purificação descrita no materiais e métodos podemos observar que após a purificação visualizamos duas bandas protéicas majoritárias (Figura 8, canaletas 10 e 11).

A Figura 8 mostra o processo de purificação final, para se chegar à este resultado vários testes foram feitos, especialmente em relação às condições de lavagem e eluição. No processo de purificação, foi interessante repetir as lavagens a fim de obter as frações eluídas com menor impureza (canaletas 10 e 11). A eluição feita com tampão contendo 80 mM de imidazol parece ser a melhor concentração desse competidor para a eluição de maior quantidade de proteína recombinante (canaleta 10) induzida nas condições testadas.

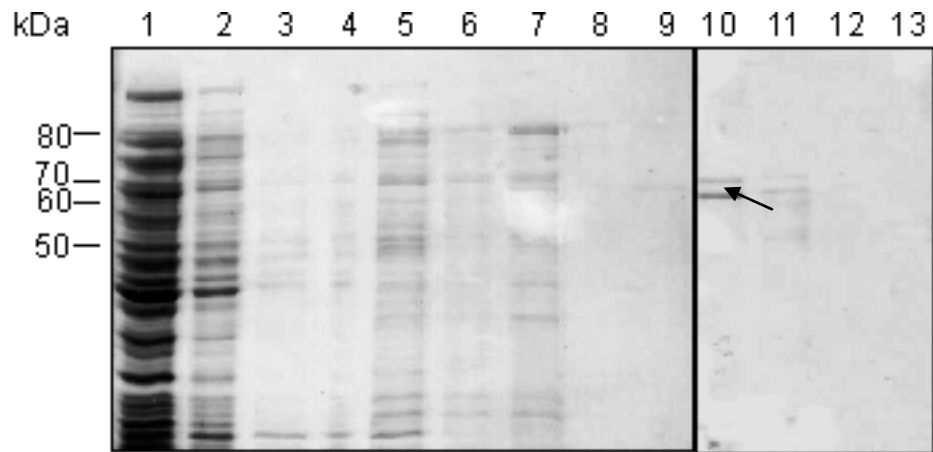


Figura 8 – SDS-PAGE 10% de amostras do processo de purificação da proteína recombinante rGDPase purificada a partir da fração solúvel. 1: volume não ligado; 2 e 3: lavagens sem imidazol; 4, 5 e 6:lavagem com 5 mM de Imidazol; 7, 8 e 9: lavagem com 10 mM de Imidazol; 10: eluição com 80 mM de imidazol; 11: eluição com 160 mM de imidazol; 12 e 13: eluição com 250 mM de imidazol.

Foi possível observar a presença de duas bandas protéicas majoritárias ~ 78 e 72 kDa na amostra purificada. É possível que a *E. coli* esteja reconhecendo e clivando o possível peptídeo sinal amino-terminal da rGDPase (Fietto *et al.*, 2004). Para confirmação desta hipótese seria necessário um ensaio de western blot para verificação do reconhecimento das duas bandas ou de somente uma das bandas.

4.4. Produção de antissoro policlonal anti-GDPase recombinante de *L. major*

Nesse trabalho utilizamos a rGDPase recombinante purificada para produção de antissoro policlonal em coelhos (ver materiais e métodos item 3.9), assim obtivemos um antissoro policlonal contendo anticorpos produzidos contra a rGDPase. Este soro foi então analisado em diferentes diluições para reconhecimento da proteína recombinante através da técnica de western blotting para determinar a sua titulação. Os resultados demonstram que o antissoro contém anticorpos que foram efetivos para estabelecimento da interação com a rGDPase em todas as diluições testadas (Figura 9). A diluição de 1:2000 (canaleta 3) sugere ser a melhor para reconhecimento direto da proteína recombinante purificada. Embora as diluições de 1:1000 e 1:500 tenham tido reconhecimento expressivo (coluna 4, 5), ficou assim definida a utilização da diluição de 1:2000 para evitar a revelação de contaminantes. Podemos observar também que o ensaio de western blot parece reconhecer somente uma banda nas amostras de rGDPase purificada, assim existe a possibilidade da segunda banda majoritária presente na amostra purificada (Figura 8, canaletas 10 e 11), ser de algum contaminante da bactéria com massa molecular similar à proteína rGDPase.

Uma vez que o soro imune foi capaz de reconhecer a rGDPase purificada, procuramos então verificar se nas mesmas diluições, a afinidade antígeno-anticorpo era mantida usando o extrato de *E. coli* BL21(DE3) transformada com a construção contendo o gene. Como controle negativo utilizamos extrato total de células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com plasmídeo vazio. Os resultados deste teste, mostrados na Figura 10, sugerem que a melhor diluição de antissoro primário, ou seja aquela capaz de reconhecer a proteína de interesse com maior especificidade, parece ser a diluição de 1:2000, como visto na canaleta 3-C.

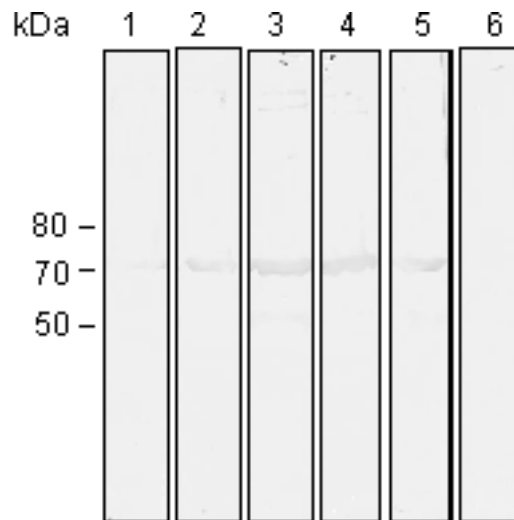


Figura 9 – Western Blotting de amostras de rGDPase purificada usando diferentes diluições do antissoro policlonal anti-rGDPase de *L. major*. 1: diluição do antissoro primário 1:10000; 2: diluição 1:5000; 3: diluição 1:2000; 4: diluição 1:1000; 5: diluição 1:500; 6: controle negativo relativo ao uso de soro pré-imune na diluição 1:500.

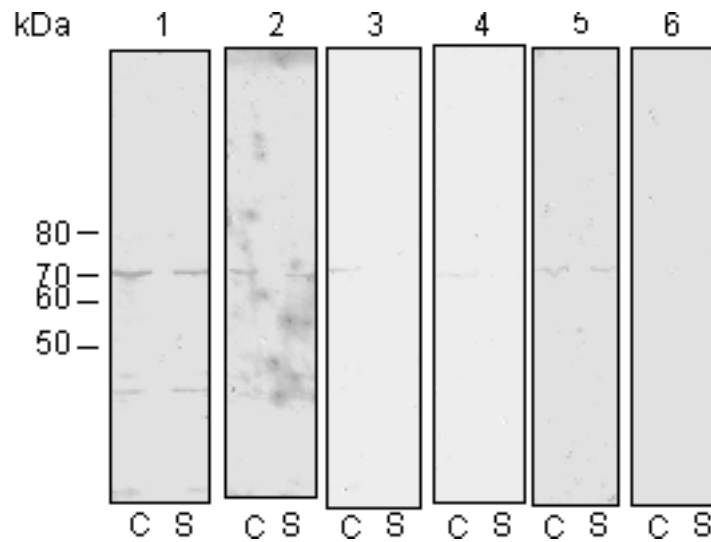


Figura 10 – Western Blotting do extrato induzido de *E. coli* BL-21 (DE3) transformada com a construção contendo o gene da GDPase (C) e transformada com o plasmídeo pET21b sem o gene (S), usando diferentes diluições do antissoro imune anti rGDPase. 1: diluição 1:500; 2: diluição 1:1000; 3: diluição 1:2000; 4: diluição 1:5000; 5: diluição 1:10000; 6: diluição 1:20000.

Surpreendentemente, o extrato de *E. coli* transformada com o vetor vazio, apresentou reatividade com anticorpos do soro imune em alguma proteína de massa molecular muito semelhante à proteína rGDPase (canaleta 1S-5S). Entretanto, o padrão de bandas revelado, foi de menor intensidade que os estabelecidos com rGDPase nos extratos induzidos, podendo sugerir a presença de epítomos semelhantes para ambas proteínas. Neste caso é possível que a proteína considerada purificada estivesse ainda contendo algum contaminante de proteína de *E. coli* que sendo incubada junto com a GDPase recombinante tenha direcionado a produção de anticorpos contra a mesma, sendo então necessário a purificação do antissoro retirando anticorpos com epítomos para proteínas de *E. coli* ou buscando uma purificação mais específica da rGDPase. Outra possibilidade é que alguma proteína contaminante de *E. coli* tenha realmente epítomos em comum com a rGDPase que tenham sido reconhecidos no ensaio acima relacionado.

Alem disso, foi conduzido outro experimento com objetivo de analisar a capacidade desse antissoro reconhecer outras E-NTPDases (Figura 11). Sendo assim, foram utilizadas as proteínas rGDPase de *L. major*, rNTPDase de *T. cruzi* e apirase de batata .

O resultado indicou que nas condições testadas o antissoro foi capaz de reconhecer a rGDPase de *L. major* (Figura 11, canaletas 1 e 2) e a rNTPDase1 de *T. cruzi* (Figura 11, canaleta 4), o que confirma a capacidade desse antissoro em reconhecer proteínas da família das E-NTPDases. Para reconhecimento da apirase de batata talvez seja necessário aumentar a quantidade de proteína ou diminuir a diluição do antissoro no ensaio de western blot.

Considerando que a proteína recombinante purificada tenha contaminantes de *E. coli*, foi conduzido um experimento afim de purificar o antissoro bruto, colocando o mesmo para interagir com extrato de *E. coli* transformada com pET-21. Neste experimento, o soro imune foi colocado em contato com o extrato protéico de *E. coli* para que os anticorpos inespecíficos fossem imobilizados na membrana, esperando assim que o sobrenadante retirado esteja livre da interferência causada por estes anticorpos inespecíficos. Após isso, o resultado da purificação foi analisado por western blot (Figura 12).

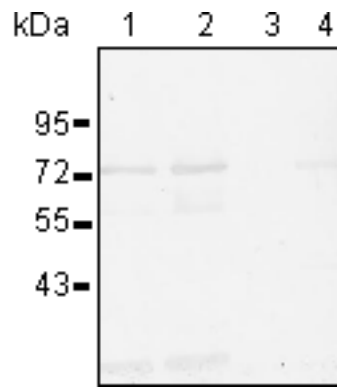


Figura 11 – Western Blotting de diferentes apirases usando antissoro imune na diluição de 1:2000. 1, 2: rGDPase de *L. major*; 3: Apirase de batata (*S. tuberosum*); 4: rNTPDase1 de *T. cruzi*.

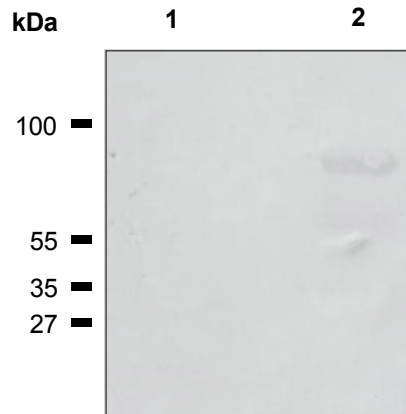


Figura 12 – Western Blotting do extrato de *E. coli* e da rGDPase utilizando o soro imune purificado. 1: Extrato de *E. coli* BL-21 (DE3) transformada com pET-21b vazio; 2: rGDPase purificada. Soro imune usado na diluição de 1:2000. O marcador de massa molecular utilizado foi PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder.

Quando comparamos os resultados obtidos nos experimentos anteriores, apresentados nas figuras 11 e 13, podemos notar que a purificação por exclusão de anticorpos anti-*E.coli* parece ter sido eficiente. Ela foi capaz de eliminar a maior quantidade de contaminates (canaleta 2), bem como confirmado na canaleta 1 onde a interação de antígenos contra proteínas de *E. coli* é imperceptível.

4.5. Avaliação da reatividade de soros de cães infectados por *Leishmania* sp. com antígeno rGDPase de *L. major*

O teste de imunodiagnóstico por ELISA possibilita a quantificação e uma rápida detecção de um antígeno ou anticorpo em uma amostra. Este tipo de teste é bastante difundido na clínica médica e veterinária por sua relativa facilidade de execução, baixo custo e muitas vezes bastante sensível e específico. Desse modo, procurando por validar o uso biotecnológico da rGDPase com vistas ao pedido de patente para o imunodiagnóstico, resolvemos avaliar seu potencial como o antígeno em testes de ELISA em soroteca de cães. Deste modo a rGDPase purificada como descrito nos materiais e métodos foi adsorvida como antígeno em placas de ELISA e ensaiada contra soro de cães infectados com diferentes estágios clínicos da leishmaniose visceral canina (assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos).

Sendo assim, para definir a melhor concentração do antígeno (Ag) na análise sorológica, foi feito um teste preliminar com quatro concentrações da rGDPase contra 3 soros negativos, três soros positivos para leishmaniose e 2 soros positivos para doença de Chagas (Tabela 2, canaletas 1, 2, 3 e 4). Como controle foi usado como antígeno, o extrato total de *Leishmania* sp. (gentilmente cedida pelo grupo da Dra. Maria Terezinha Bahia e Dr. George Luiz Lins Machado Coelho UFOP) (Tabela 2, canaleta 5). Visto que *Leishmania* spp. e *T. cruzi* são organismos evolutivamente próximos, e que ainda o *T. cruzi* apresenta NTPDase em sua superfície externa (Fietto *et al.*, 2004), foi interessante verificar a intensidade da afinidade do antígeno recombinante com anticorpos presentes em soros de cães infectados com *T. cruzi* (Tabela 2, linhas G e H e Figura 13). Os dados da Tabela 2 foram utilizados na produção do gráfico da figura 13 para melhor visualização dos dados.

A análise dos dados de DO₄₉₀ da Tabela 2 e Figura 13 demonstram que as amostras de 1,5 e 3,0 µg do antígeno recombinante parecem ter sido as melhores concentrações do antígeno

para a interação antígeno-anticorpo. Nesse ensaio preliminar, também foi possível verificar que o antígeno parece então capaz de diferenciar os soros de cães infectados com *Leishmania* sp. dos infectados por *T. cruzi*. Apesar disto o sinal para o controle usando antígeno total de *Leishmania* sp. aparece sempre superior aos dados com antígeno recombinante.

Para confirmar se a rGDPase poderia ser usada no diagnóstico por ELISA, foram conduzidos ensaios com quantidade maior de soros, utilizando o antígeno na concentração de 1,5 µg. A Tabela 3 representa a disposição dos soros nas placas ensaiadas.

Para confirmar quais soros eram positivos e negativos, foi usado o kit de Ensaio Imunoenzimático (EIE) para Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos (gentilmente cedido pela Dra. Maria Terezinha Bahia). O resultado das leituras de DO₄₉₀ com o kit da Bio-Manguinhos é visualizado na Tabela 4 onde o resultado refere-se aos números absolutos das leituras e o gráfico corresponde aos dados plotados. Como pode ser visto na Figura 14 os dados confirmam as características dos soros utilizados quanto à positividade ou negatividade para infecção por *Leishmania* sp.

Tabela 2- Ensaio de ELISA preliminar de utilização da rGDPase como antígeno em teste de ELISA indireto para detecção de leishmaniose canina.

		rGDPase [1,5 µg/mL]	rGDPase [3 µg/mL]	rGDPase [4,5 µg/mL]	rGDPase [30 µg/mL]	Ext. Total <i>Leishmania</i> [3 µg/mL]	
Diluição		1	2	3	4	5	
Controle + (<i>Leishmania</i>)	1:80	A	0.42	0.392	0.438	0.429	0.633
		B	0.396	0.402	0.413	0.444	0.616
		C	0.428	0.4	0.392	0.401	0.581
Controle -	1:80	D	0.144	0.122	0.117	0.128	0.127
		E	0.201	0.19	0.196	0.233	0.178
		F	0.159	0.117	0.122	0.133	0.184
Controle + (<i>T. cruzi</i>)	1:80	G	0.231	0.224	0.236	0.291	0.338
		H	0.286	0.274	0.31	0.363	0.43

Densidade Óptica (DO₄₉₀) das reações antígeno-anticorpo, utilizando o antígeno rGDPase em diferentes concentrações. A, B, C: Soros positivos de cães infectados com *Leishmania* sp.; D, E, F: Soros de cães controle negativo; G e H: Soros positivos para infecção por *T. cruzi*.

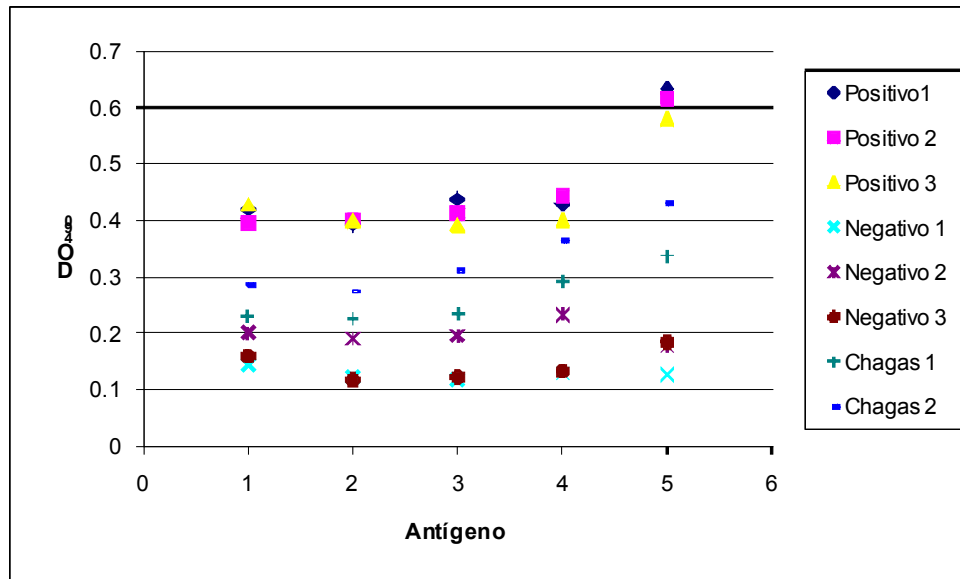


Figura 13 – Ensaio de ELISA preliminar de utilização da rGDPase como antígeno em teste de ELISA indireto para detecção de leishmaniose canina. 1: rGDPase [1,5 µg/mL]; 2: rGDPase [3,0 µg/mL]; 3: rGDPase [4,5 µg/mL]; 4: rGDPase [30 µg/mL]; 5: Extrato total de *Leishmania* sp. [3,0 µg/mL]. Soro dos cães na diluição 1:80.

Tabela 3- Disposição das amostras usadas nos testes de ELISA indireto para detecção de leishmaniose canina.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+As	+As	+As	+As	+As	+As	+As	+As	+As	+As	+As	+As
B	+As	+As	+As	+As	+As	+As	+As	+As	+As	+As	+As	+As
C	+As	+As	+As	+As	+As	+As	+As	+As	+As	+As	+As	+As
D	+As	+As	+As	+As	+As	+As	+Ol	+Ol	+Ol	+Ol	+Ol	+Ol
E	+Ol	+Ol	+Ol	+Ol	+Ol	+Ol	+Ol	+Ol	+Ol	+Ol	+Ol	+Ol
F	+Ol	+Ol	+Ol	+Ol	+Ol	+Ol	+Ol	+Ol	+Ol	+Ol	+Ol	+Ol
G	+Ol	+Ol	+Ol	+Ol	+Ol	+Ol	+Ol	+Ol	+Ol	+Ol	+Ol	+Ol
H	+Ol	+Ol	+Po	+Po	+Po	+Po	+Po	+Po	+Po	+Po	+Po	+Po

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+Po	+Po	+Po	+Po	+Po	+Po	+Po	+Po	+Po	+Po	+Po	+Po
B	+Po	+Po	+Po	+Po	+Po	+Po	+Po	+Po	+Po	-	-	-
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Disposição dos soros positivos e negativos nas placas de 96 orifícios. Positivo Assintomático: (+ As); Positivo oligossintomáticos: (+ Ol); Positivo polissintomáticos: (+ Po); Negativo: (-).

Tabela 4- Ensaio padrão de confirmação de diagnóstico de leishmaniose canina em teste de ELISA indireto usando kit comercial Bio-Manguinhos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.908	1,644	0.968	1,622	1,530	0.946	0.935	1,106	0.655	1,323	1,277	1,060
B	1,249	1,095	1,665	1,255	1,153	0.751	1,168	1,181	0.720	0.998	0.671	0.741
C	1,736	0.607	1,204	1,311	0.460	0.238	1,276	0.588	0.883	1,006	0.294	1,054
D	1,032	1,280	1,384	1,329	0.854	1,047	1,580	0.778	1,039	0.929	1,229	0.908
E	0.770	0.820	1,227	1,413	0.940	0.830	0.841	0.966	0.950	1,167	1,328	1,664
F	1,344	0.936	1,436	1,175	1,139	1,065	1,223	0.636	1,062	0.708	0.189	1,134
G	1,379	0.287	1,408	0.398	0.445	1,427	0.831	0.279	1,321	1,270	0.843	0.721
H	1,596	1,084	1,079	1,367	0.948	0.713	1,037	1,511	0.739	0.653	0.880	0.958

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,143	1136	1,224	0.838	0.844	0.932	0.999	1239	1328	0.978	0.882	0.983
B	0.617	0.508	1207	1316	0.707	0.848	0.708	1239	0.853	0.039	0.042	0.039
C	0.04	0.041	0.041	0.038	0.038	0.042	0.094	0.039	0.054	0.055	0.047	0.049
D	0.049	0.104	0.041	0.045	0.046	0.041	0.087	0.025	0.063	0.039	0.062	0.063
E	0.041	0.04	0.063	0.05	0.036	0.045	0.049	0.049	0.077	0.045	0.151	0.078
F	0.079	0.069	0.082	0.048	0.049	0.039	0.078	0.044	0.067	0.066	0.045	0.04
G	0.038											
H	<u>0.778</u>	<u>0.765</u>	<u>0.092</u>	<u>0.089</u>	<u>0.039</u>	<u>0.044</u>						

Leituras de DO₄₉₀ das reações antígeno-anticorpo, utilizando o Kit Bio-Manguinhos com os soros de cães na diluição de 1:100. Barras Vermelhas em H1, H2= Controle positivo; Barras Verdes em H3, H4= Controle negativo; Barras Azuis em H5 e H6= Branco.

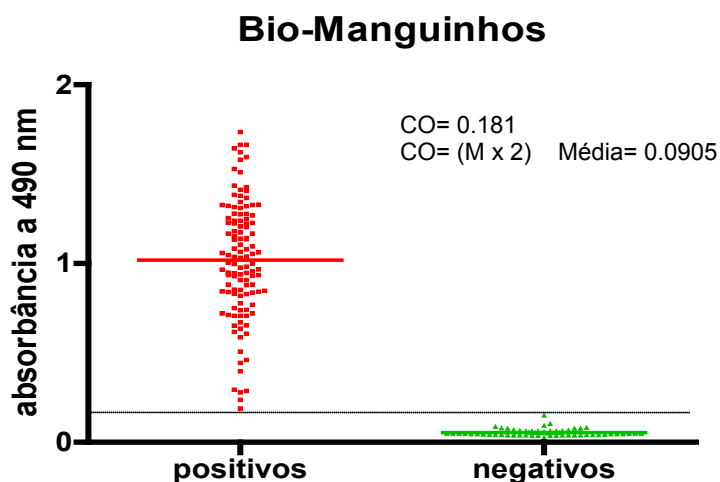


Figura 14 – Gráfico relativo aos resultados das reações antígeno x anticorpo no ensaio de ELISA indireto, utilizando o Kit BioManguinhos. As barras indicam a média ponderada dos dados. A linha tracejada indica a linha de corte (CO) relativo aos dados dos soros negativos. *Cut-Off*: CO; Média: M.

A partir disso, foram conduzidos ensaios com os mesmos soros em diferentes diluições contra o antígeno recombinante rGDPase de *L. major*, com o intuito de definir a diluição do soro dos cães para uso do antígeno recombinante e avaliar em uma amostragem maior a possibilidade da proteína completa expressa e purificada ser um antígeno recombinante adequado para este tipo de diagnóstico.

A Figura 15 representa graficamente esses resultados. Os pontos de corte “*Cut off*” (CO) foram calculados como descrito em materiais e métodos item 3.13. Como pode ser visto na figura todas as diluições de soro testadas em relação ao antígeno recombinante apresentaram muitos resultados de soros que são sabidamente positivos como negativos (abaixo do *cut off*) e soros que são sabidamente negativos apresentaram resultados similares aos conhecidos positivos, mostrando que a amostra do antígeno recombinante não parece ser adequada para testes de diagnóstico por ELISA, pelo menos no estado de pureza analisado e de forma a apresentar a proteína completa como antígeno alvo. A Tabela 5 compara qualitativamente esses mesmos resultados com os dados obtidos pelo kit da Bio-Manguinhos (Tabela 4). Aqui notamos que a sensibilidade é aumentada nas diluições de 1:320 e 1:640 (25,6 e 44,1 respectivamente), enquanto a especificidade permanece alta (90,3% a 98%). Esses dados sugerem que esteja havendo um reconhecimento melhor das amostras negativas em relação às amostras positivas. É possível que a proteína esteja em um estado ainda semi-purificado contendo contaminantes de proteínas de *E. coli* na preparação usada. Esta possibilidade é reforçada pelos dados mostrados anteriormente onde o SDS-PAGE da amostra purificada mostra mais de uma banda proteica e o western blot do soro imune produzido contra a proteína recombinante mostra reatividade cruzada com extrato de *E. coli* que não contém a proteína GDPase de *L. major*. É possível também, que a diluição do conjugado usado não seja o ideal para esses ensaios (Harlow & Lane, 1988) visto que foi utilizado ao longo de todos os ensaios a diluição de 1:5000.

Na comparação dos resultados das diferentes diluições, observou-se não haver separação dos soros de cães contaminados dos não contaminados na maioria das condições testadas. Em quase todas as diluições o valor do *cut-off* está acima da média dos soros positivos. Apenas na diluição de 1:640, o *cut-off* está abaixo da média mostrando uma boa quantidade de soros positivos como realmente positivos e negativos idem. Dado confirmado pela maior sensibilidade (44,1%) nessa mesma diluição, nesse ensaio (Tabela 5). Porém vários soros conhecidos positivos não se mostraram como tal o que demonstra que de alguma forma este antígeno ainda

não está em condições ideais para ser usado diretamente no imunodiagnóstico realizado. É importante verificar que a grande maioria dos soros conhecidamente negativos permaneceram como tal nesta diluição, o que nos encoraja a continuar os estudos com este antígeno recombinante.

Dessa forma, utilizamos a diluição 1:640 para verificar se era possível a separação das formas clínicas, utilizando o antígeno recombinante (Figura 16 e Tabela 6). Analisando estes dados somente pelo gráfico da figura 19 parece que nas condições usadas este antígeno também não foi capaz de separar os animais positivos com diferenciadas condições clínicas em relação aos animais negativos de forma satisfatória, pois o nível de reação (avaliada pela leitura de absorbância a 490nm) naqueles soros que coincidem com o diagnóstico conhecido não mostram diferenças entre os soros separados por formas clínicas. Porém analisando a Tabela 6 vemos que há um aumento na sensibilidade do teste em animais sintomáticos, tanto os oligossintomáticos quanto polissintomáticos. Os assintomáticos apresentaram a menor sensibilidade no entanto a sua especificidade permaneceu alta dados corroborados com Mettler e colaboradores (2005).

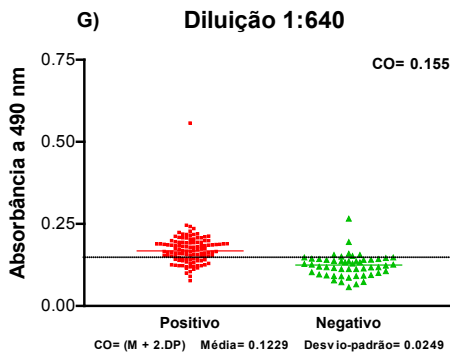
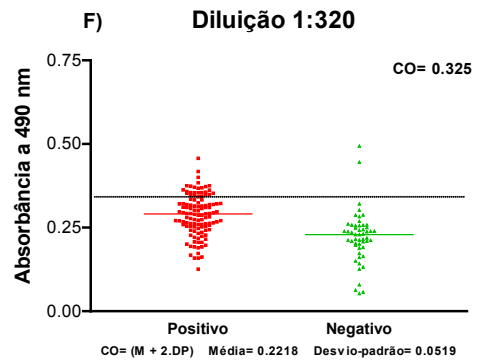
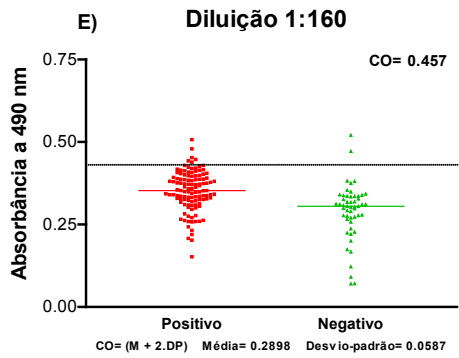
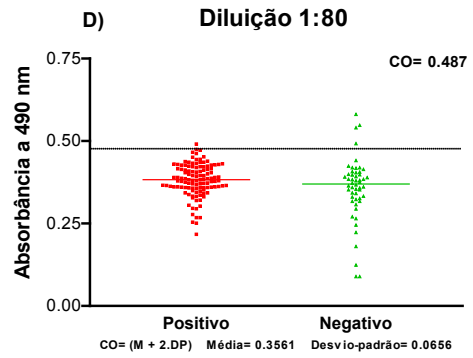
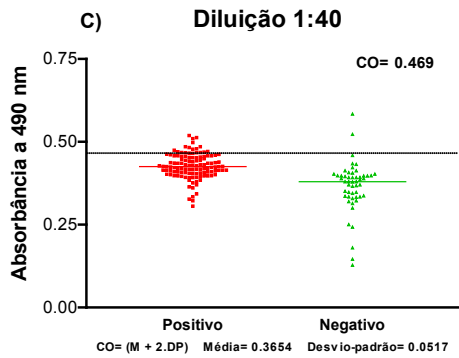
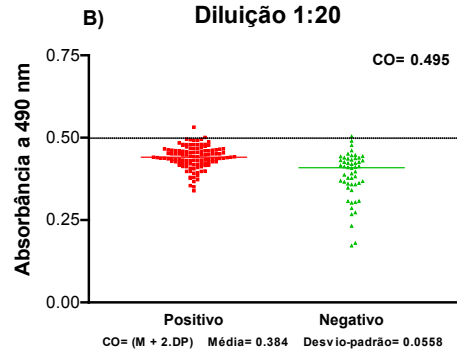
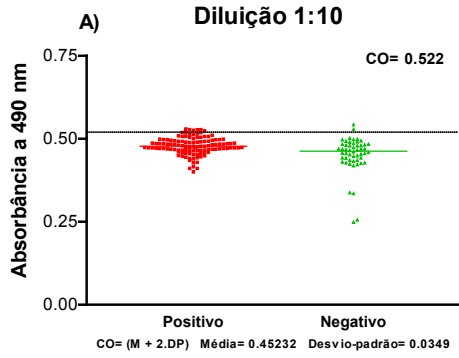


Figura 15 – Análise do resultado do teste de ELISA indireto usando soros de cães previamente diagnosticados como positivos e negativos para infecção por *Leishmania* sp. Usando diferentes diluições dos soros em relação ao uso da rGDPase de *L. major* a 1,5 µg/mL. As barras indicam a média ponderada dos dados. As linhas tracejadas indicam o ponto de corte relativo aos dados dos soros negativos. *Cut-Off*: CO; Média: M; Desvio Padrão: DP.

Tabela 5 – Porcentagens de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e precisão em teste de ELISA por rGDPase para sorodiagnóstico da LVC

DILUIÇÃO	Sn	Es	VPP	VPN	Pr
1:10	5,1	96,1	75	31	33,1
1:20	3,4	98	80	31	32,5
1:40	11,1	96,1	86,6	32,4	37,2
1:80	1,7	92,3	33,3	29,4	29,5
1:160	1,7	96,1	50	30,3	30,7
1:320	25,6	96,1	93,7	36,4	47,3
1:640	44,1	90,3	93,7	52,8	72,1

Sn: Sensibilidade; Es: Especificidade; VPP: Valor preditivo positivo; VPN: Valor preditivo negativo; Pr: Precisão.

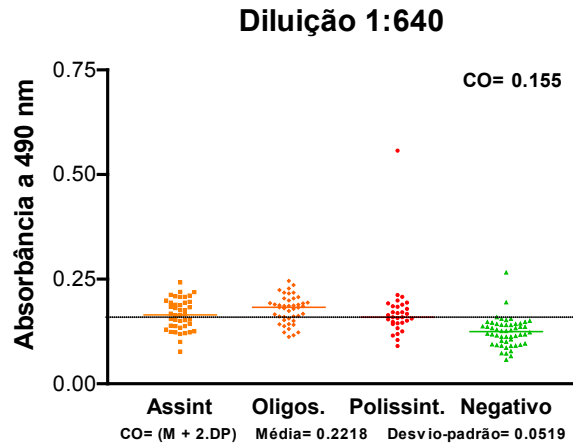


Figura 16 – Ensaio de ELISA indireto usando antígeno recombinante rGDPase de *L. major* e soros de cães na diluição 1:640 separados por diagnóstico clínico relativo às diferentes formas da leishmaniose canina (Assint= assintomáticos; Oligos= oligossintomáticos e Polissint= polissintomáticos). A linha tracejada indica o valor da linha de corte (*Cut-off*)

Tabela 6– Porcentagens de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e precisão em teste de ELISA, na diluição 1:640 para os diferentes sinais clínicos.

SINAIS CLÍNICOS	Sn	Es	VPP	VPN	Pr
Assintomático	57,1%	90,3%	82,7%	72,3%	77,6%
Oligossintomático	75%	90,3%	86,8%	81%	83,3%
Polissintomático	61,2%	90,3%	79,1%	79,6%	79,5%

Sn: Sensibilidade; Es: Especificidade; VPP: Valor preditivo positivo; VPN: Valor preditivo negativo; Pr: Precisão.

Coletivamente, esses resultados indicam que nessas condições, a rGDPase não apresentou dados significativos, para ser um bom antígeno para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina. Entretanto é possível que futuramente este antígeno se torne um bom antígeno para tal diagnóstico visto que a questão de restar ainda contaminantes de proteínas de *E. coli* na preparação parece ser o principal fator a levar às reações cruzadas entre soros positivos ou negativos e o antígeno em questão. Além disto como comentado acima a diluição maior testada (1:640) mostrou uma melhora considerável na capacidade de coincidência entre o diagnóstico esperado e o verificado pelo ensaio.

O diagnóstico de LVC é complexo, porque suas características clínicas são compartilhadas por uma série de outras doenças como: malária, tuberculose, toxoplasmose, algumas das quais podem estar presentes juntamente com LVC em áreas de regiões tropicais e subtropicais (Farajnia *et al.*, 2008). A princípio a rGDPase demonstrou ser capaz de separar os cães contaminados por *Leishmania* sp. dos contaminados por *T. cruzi*, além de ter apresentado uma maior separação dos contaminado dos não contaminados. É possível, que isso deva ser explicado pela diferença de pureza do antígeno ou até mesmo, por uma menor amostragem dos soros de cães utilizados. Porém com o uso de uma amostragem maior verificamos que o antígeno não se encontra ainda em estado que possa ser efetivamente usado no imunodiagnóstico, apesar de se mostrar ainda promissor (dados da diluição 1:640). Foram testadas também diluições maiores que esta para pelo menos 9 soros de cães a fim de verificarmos se haveria alguma melhora na capacidade de separação dos soros negativos de positivos mas este efeito não foi observado (dados não mostrados).

Atualmente, vários antígenos de *Leishmania* foram caracterizados e através da tecnologia recombinante, têm sido utilizados para desenvolver ensaios de imunodiagnóstico (Raj *et al.*, 1999; Maalej *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2006). Como resultado do elevado grau de purificação, antígenos recombinantes significativamente melhoram a especificidade dos testes diagnósticos (Rosati *et al.*, 2003; Boarino, 2008; Silvestre *et al.*, 2008). Sendo assim, aumentar a pureza na purificação da rGDPase é condição necessária para esclarecer esse obscuro resultado e demais, podemos posteriormente utilizar epítomos imunodominantes específicos da rGDPase para potencializar seu uso, neste tipo de técnica de diagnóstico, sendo este tipo de abordagem previamente sugerida como alternativa para melhorar do diagnostico da LVC (Rosati *et al.*, 2003).

5. PERSPECTIVAS

Estabelecemos aqui como perspectivas realizar experimentos para avaliar se o reconhecimento dos soros negativos em relação a amostra da GDPase purificada se devem a presença de proteínas contaminantes ou ao reconhecimento direto da proteína recombinante por epítomos em comum com outras proteínas, as quais os cães já tenham tido contato prévio com formação de anticorpos específicos. Um ensaio possível seria western Blot, onde será incubado, alguns soros dos cães utilizados nos ensaios sorológicos, com as proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose, no lugar dos soros de coelhos anti-rGDPase. Será utilizado soros sabidamente positivos e negativos. Se na afinidade com o soro positivo e negativo, a proteína recombinante for reconhecida somente no positivo, e outras proteínas forem evidenciadas tanto no positivo quanto no negativo, indicará a impureza da proteína recombinante. Serão então traçados ensaios objetivando a purificação com a definição de maior pureza dessa proteína. Que poderá possivelmente resolver e explicar esse dúbio resultado, onde até os soros negativos demonstram um alto reconhecimento.

Caso contrario, a proteína recombinante sendo reconhecida tanto pelos soros positivos quanto negativos indicará necessidade de procura por epítomos específicos. Neste caso, a proteína purificada será submetida a uma proteólise parcial e novamente utilizada em ensaios de western blot, com os soros dos cães negativos e positivos. Aqueles peptídeos que forem reconhecidos exclusivamente pelos soros positivos testados, serão seqüenciados e posteriormente produzidos sinteticamente para o uso no diagnostico, objetivando identificar epítomos específicos para o teste sorológico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, J. E. Expansão do Calazar no Brasil. **Ceará Méd**, 5: 86-102, 1983.

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

ALVAR J., CANAVATE C., MOLINA R., MORENO J., NIETO J. Canine leishmaniasis. **Adv Parasitol**, 57: 1–88, 2004.

AMÓRA S. S. A., SANTOS M. J. P., ALVES, N. D., COSTA S. C. G., CALABRESE K. S., MONTEIRO A. J.S, ROCHA, M. F. G. Factors related to positive testing of dogs for visceral leishmaniasis in endemic area in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. **Ciência Rural**, S. Maria, 36: 1854-1859, 2006.

ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clin Dermatol**, 14: 523–32, 1996.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as model zoonoses. **Ann Trop Med Parasitol**, 91: 693–70, 1997.

BARBOSA-SANTOS E. G., MARZOCHI M. C., URTADO W., QUEIRÓS F., CHICARINO J., PACHECO R. S. Leishmaniasis disseminated by *Leishmania braziliensis* in a mare (*Equus caballus*) immunotherapy and chemotherapy assays. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 89: 217-20

BAUZER, L. G., SOUZA, N. A., MAINGON, R. D.C., PEIXOTO, A. A. *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 102: 1-12, 2007.

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

BERRÊDO-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 Mg-Dependent Ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and Its Possible Role in Adenosine Acquisition and Virulence. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 391:16–24, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília-DF: Editora MS., 120p. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Editora MS., 122p. 2006.

BOARINO, E. BOLLO, L. PRUNOTTO, L. CANALE, F. USLENGHI, P. POLETTI. Application of a recombinant protein for the serological diagnosis of canine leishmaniasis A. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, 2008.

BOURDOISEAU, G., BONNEFONT, C., HOAREAU, E., BOEHRINGER, C., STOLLE, T., CHABANNE, L. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum* infected treated and untreated dogs. **Vet. Immunol. Immunopathol**, 59: 21–30, 1997.

CABRAL, M., O'GRADY, J.E., GOMES, S., SOUSA, J.C., THOMPSON, H., ALEXANDER, J. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. **Vet. Immunol. Immunopathol**, 76: 173–180, 1998.

CARMO, V. T; MODENA, C. M., SANTA ROSA, I. C. A. Percepção e Representação de Clínicas Veterinárias de Pequenos Animais sobre a Leishmaniose Visceral Americana em Belo Horizonte. **In: Anais do Simpósio Internacional Programa de Treinamento Controle de zoonoses e as Interações Homem Animal**. São Paulo: Arca Brasil. p.87, 2001.

CARVALHO, F. A., CHAREST, H., TAVARES, C. A., MATLASHEWSKI, G., VALENTE, E. P., RABELLO, A., GAZZINELLI, R. T. AND FERNANDES, A. P. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 43: 289–295, 2002.

CHAPPUI, F., SUNDA S., HAILU A., GHALIB H., RIJAL S., PEELING, R. W., ALVAR J. AND BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Microbiology**, 5: 7-16, 2007.

- CIARAMELLA, P., OLIVA, G., LUNA, R. D., GRADONI, L., AMBROSIO, R., CORTESE, L., SCALONE, A., PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniosis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet. Rec**, 141: 539–543, 1997.
- CORRÊA, S. H. R., PASSOS, E. C. Wild Animals And Public Health. *In*: Fowler, M.E.; Cubas, Z.S. *Biology, Medicine, And Surgery Of South American Wild Animals*. Ames: **Iowa University Press**, 493-499, 2001.
- COUTINHO, M.T.Z. et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.** 128, 149–155, 2005.
- COUTINHO, M.T.Z. AND LINARDI, P.M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Vet. Parasitol.** 147, 320–325, 2007.
- CHAKRABORTY, S., SAKKA, M., KIMURA, T., SAKKA, K. Cloning And Expression Of A *Clostridium Kluyveri* Gene Responsiblefor Diaphorase Activity. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 72: 735–741, 2008.
- COSTA, C.A., GENARO, O., LANA, M., MAGALHÃES, P.A., DIAS, M., MICHALICK, S.M., MELO, M.N., COSTA, R.T., MAGALHÃES ROCHA, N.M., MAYRINK, W. Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, 24: 21–25, 1991.
- COSTA-VAL, A. P., CAVALCANTI, R. R., GONTIJO, N., MICHALICK, M. S. M., ALEXANDER, B., WILLIAMS P., MELO, M. N. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* infectivity. **The Veterinary Journal**, 174: 636–643, 2007.
- CHRISTOFORIDIS, S., PAPAMARCAKI, T., GALARIS, D. Purification and properties of human placental ATP diphosphohydrolase. **Eur J Biochem**, 234: 66–74, 1995.
- DE ALENCAR, J. E., NEVES, J. Leishmaniose visceral (calazar). *In*: Veronesi R, ed. **In: Doencas infecciosas e parasitarias**, 7th edn. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan SA, 724. 1982.

- DINIZ, S.A., SILVA, F. L., CARVALHO NETA, A. V., BUENO, R., GUERRA, R. M. S. N. C., ABREU-SILVA, A. L., SANTOS, R.L. Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. *J. Infect. Developing Countries* 2, 24–33, 2008.
- D'OLIVEIRA, J. A., COSTA, S. R., BARBOSA, A. B., ORGE, M. G. AND CARVALHO, E. M. Asymptomatic *Leishmania chagasi* infection in relatives and neighbors of patients with visceral leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92: 15–20, 1997.
- EVANS, T. G., VASCONCELOS, I. A .B., LIMA, J. W., TEIXEIRA, J. M., MCAULLIFE, I. T., LOPES, U. G., PEARSON, R. D., VASCONCELOS, A. W. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assessment of serodiagnostic methods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 42: 118–123 1990.
- FEITOSA, M. M., IKEDA, F. A., LUVIZOTTO, M. C. R., PERRI, S. H. V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). *Clin. Vet.* 28: 36–44, 2000.
- FERREIRA E. C., LANA M., CARNEIRO, M., REIS, A. B., PAES, D. V., DA SILVA, E. S., SCHALLIG, H., GONTIJO, C. M. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet. Parasitol.* 146: 235–241, 2007.
- FERRER, L. M. CLINICAL ASPECTS OF CANINE LEISHMANIASIS. Canine leishmaniasis: an update. **In: Proceeding of the International Canine Leishmaniasis Forum**, Spain, pp. 6–10, 1999.
- FIETTO, J. L. R., DEMARCO, R., NASCIMENTO, I. P., CASTRO, I. M., CARVALHO, T. M. U., SOUZA W., BAHIA, M. T., ALVES, M. J. M., AND VERJOVSKI-ALMEIDA S. Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316: 454–460, 2004.
- FRANCINO, O., ALTET, L., SÁNCHEZ-ROBERT, E., RODRIGUEZ, A., SOLANO-GALLEGO, L., ALBEROLA, J., FERRER, L., SÁNCHEZ, A., ROURA, X. Advantages of a real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 137: 214–221, 2006.

- FUNASA (Fundação Nacional da Saúde). CENEPI. **Situação da prevenção e controle de doenças endêmicas e de notificação compulsória no Brasil (Versão preliminar)**. Mimeo, 41 p. Brasília, maio de 2001.
- GAO X. D., KAIGORODOV V., JIGAMI Y. N. D. A homologue of GDA1, encodes membrane-bound apyrase required for golgi N- and O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, 274: 21450–21456, 1999.
- GOMES, Y.M., PAIVA, CAVALCANTI, M., LIRA, R. A., ABATH, F. C., ALVES, L. C. Diagnosis of visceral canine leishmaniasis: biotechnological advances. **Vet J**, 31: 26–36, 2006.
- GONTIJO, C. M. F., MELO, M. N. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Rev. Bras. Epidemiol.** Vol. 7, 2004.
- GOTHE, R., NOLTE, I., KRAFT, W. Leishmaniasis in dogs in Germany: epidemiological case analysis and alternatives to conventional therapy. **Tierarztl. Prax**, 25: 68–73, 1997.
- GRADONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. **In: Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum**, Sevilla, Spain, pp. 7–14, 2002.
- GRINTHAL A., GUIDOTTI G. CD39, NTPDase 1, is attached to the plasma membrane by two transmembrane domains. Why? **Purinergic Signalling**, 2: 391–398, 2006.
- HANDA, M., GUIDOTTI, G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). **Biochem Biophys Res Commun**, 218:916–923,1996.
- HARLOW, E., LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
- HERWALDT B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**, 1999; 354:1191–9.
- KRAUSPENHAR, C., BECK, C., SPEROTTO, V., SILVA, A. A., BASTOS, R., RODRIGUES, L. Visceral leishmaniasis in a dog in Cruz alta, Rio Grande do Sul, South Brazil. **Ciências Rural**, S. Maria, 37: 907-910, 2007.

- KOUTINAS, A. F., POLIZOPOULOU, Z. S., SARIDOMICHELAKIS, M. N., ARGYRIADIS, D., FYTIANOU, A., PLEVRAKI, K.G. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989 –1996). **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, 35: 376–383, 1999.
- LACHAUD, L., MARCHERGUI-HAMMAMI, S., CHABBERT, E., DEREURE, J., DEDET, J. P., BASTIEN, P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **J. Clin. Microbiol.**, 40: 210–215, 2002.
- LAINSON R, SHAW JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In R Killick-Kendric, WPeters (eds), **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**, Academic Press, London, p. 1-120. 1987
- LAINSON, R. AND SHAW, J.J. New World Leishmaniasis - The neotropical *Leishmania* species. **Microbiology and Microbial Infections**, 10 ed., 313-349, 2005.
- LANE RP. Sand flies (Phlebotominae). In: Lane RP, Crosskey RW, editors. Medical insects and arachnids. 1st edition. **New York: Chapman and Hall**, 78–119, 1993.
- LESSA, M. M.; LESSA, H. A.; CASTRO, T. W. N.; OLIVEIRA, A.; SCHERIFER, A.; MACHADO, P.; CARVALHO E. M. Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. **Rev. Bras. Otorrinolaringol**, 73: Sao Paulo Nov./Dec., 2007.
- LINHARES, G. F. C., CHAVES, N. S. T., DUARTE, S. C., FERNANDES P. R., AMARAL, A. V. C. E SOUZA M. A. Relato De Um Caso Clínico De Leishmaniose Visceral Em Um Cão Na Cidade De Goiânia. **Revista De Patologia Tropical**, 34: 69-72, 2005.
- LIRA, R.A., PAIVA, CAVALCANTI M., NAKAZAWA, M., FERREIRA, A.G.P., SILVA, E.D., BATH, F.G.C., ALVES, L.C., SOUZA, W.V., GOMES, Y.M. Canine visceral leishmaniosis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and theIFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. **Veterinary Parasitology**, 137: 11–16, 2006.
- MAALEJ, I. A., CHENIK, M., LOUZIR, H., BEN SALAH S.A., BAHLOUL, C., AMRI, F. Comparative evaluation of ELISA based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens

- for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, 68: 312–20, 2003.
- MAIA-ELKHOURY, A. N. S., ALVES, W. A., SOUSA-GOMES, M. L., SENA, J. M., LUNA, E. A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 24: 2941-2947, 2008.
- MANDELL, G. L., BENNETT, J. E., DOLIN, R. Principles and practice of infectious diseases. **Elsevier** :2428–2442, 2005.
- MANNA, L. Real-time PCR assay in Leishmania-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. **Vet. J**, 177: 279–282, 2008.
- MANSON-BAHR, P. E. C., SOUTHGATE, B. A., HARVEY, A.E.C. Development of kala-azar in man after inoculation with a leishmania from a Kenyo sandfly. **BMJ**, 1: 1208–10, 1963.
- MARÍN, C., LONGONI, S. S., MATEO, H., DIEGO, J. A., ALUNDA, J. M., MINAYA, G., SÁNCHEZ-MORENO, M. The use of an excreted superoxide dismutase in an ELISA and Western blotting for the diagnosis of Leishmania (Leishmania) infantum naturally infected dogs. **Parasitol Res**, 101: 801–808, 2007.
- MAROLI, M., PENNISI, M. G., MUCCIO, T. D., KHOURY, C., GRADONI, L., GRAMICCIA M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with Leishmania infantum. **Veterinary Parasitology**, 145: 357–360, 2007.
- 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. Extracellular nucleotide metabolism in Leishmania: influence of adenosine in the establishment of infection. **Microbes and Infection**, 10: 850 e 857, 2008.
- MAURICIO, I. L., HOWARD, M.K., STOTHARD, J.L., MILES, M.A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology** 119: 237– 246, 1999.
- METTLER, M., GRIMM, F., CAPELLI, G., CAMP, H., DEPLAZES, P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescence-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic Leishmania infection in dogs. **J. Clin. Microbiol**, 43: 5515–5519, 2005.

- MIGONE LE. Un caso de kala-zar a Asunción (Paraguay). **Bull Soc Path Exot**, 6: 118-20, 1913.
- MOREIRA, M. A. B., LUVIZOTTO, M. C. R., GARCIA, J. F., CORBETT, C. E. P., LAURENTI, M. D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Vet. Parasitol**, 145: 245–252, 2007.
- MOREIRA, M. A. B., LUVIZOTTO, M. C. R., GARCIA J. F., CORBETT, C. E. P., LAURENTI, M. D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, 145: 245–252, 2007.
- MORENO, J. AND ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends Parasitol**, 18: 399–405, 2002.
- MUKERJI, K., PAL, A., BASU, D., NASKAR, K., MALLICK, K.K., GHOSH, D.K. Direct enzyme-linked immunosorbent assay: a simple immunoassay using *Leishmania donovani* promastigote for diagnosis of kala-azar. **J. Clin. Lab. Anal**, 5: 299–301, 1991.
- MURRAY H. W., BERMAN J.D, DAVIES C.R., Saravia, N. G. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, 366: 1561–77, 2005.
- NARANJO, C., FONDEVILA, D., LEIVA, M., ROURA, X., PEÑA, T. Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniosis. **Vet. Parasitol**, 133: 37–47,2005.
- NASEREDDIN, A., EREQAT, S., AZMI, K., BANETH, G., JAFFE, C. L., ABDEEN, Z. Serological survey with PCR validation for canine visceral leishmaniasis in northern Palestine. **J. Parasitol**, 92: 178–183, 2006.
- NOLI, C. AND AUXILIA, S. T. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. **Vet. Dermatol**, 16: 213–232, 2005.
- OWENS, S. D., OAKLEY, D. A., MARRYOTT, K., HATCHETT, W., WALTON, R., NOLAN, T.J.,NEWTON, A., STEURER, F., SCHANTZ, P., GIGER, U. Transmission of visceral

- leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc**, 219: 1076–1083, 2001.
- PARANHOS-SILVA, M., FREITAS, L. A. R., SANTOS, W. C., GRIMALDI JR., G., POTES DE CARVALHO, L. C., OLIVEIRA DOS SANTOS, A. J. Acrosssectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **Am. J. Trop. Med**, 55: 39–44, 1996.
- PEÑA, M. T., ROURA, X., DAVIDSON, M.G. Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993 – 1998). **Vet. Ophthalmol**. 3: 35–41, 2000.
- PIETRANGELI, C. E., SKAMENE, E., EDELSON, P. J., KONGSHAVN, P. A. L. Measurement Of 5'-Nucleotidase In Mouse Peritoneal Macrophages In Listeriosis. **Infection And Immunity**, 1206-1210, 1981.
- PINELLI, E., KILLICK-KENDRICK, R., WAGENAAR, J., BERNADINA, W., DEL-REAL, G., RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect. Immun**, 62: 229–235, 1994.
- PINHEIRO C. M., MARTINS-DUARTE E. S., FERRARO R. B., SOUZA A. L. F., GOMES M. T., LOPES, A. H. C. S., VANNIER-SANTOS M. A., SANTOS, A. L. S., MEYER-FERNANDES, J. R. *Leishmania amazonensis*: Biological and biochemical characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities. **Experimental Parasitology**, 114: 16–25, 2006.
- RAJ, V. S., GHOSH, A., DOLE, V. S., MADHUBALA, R., MYLER, P. J., STUART, K.D. Serodiagnosis of leishmaniasis with recombinant ORFF antigen. **Am J Trop Med Hyg**, 61: 482–7, 1999.
- RIERA, C, VALLADARES, J. E, GALLEGO, M., AISA, M.J., CASTILLEJO, S., FISA, R. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. **Vet Parasitol**, 84: 33–47, 1999.
- ROBSON, S. C., SÉVIGNY J., ZIMMERMANN, H.. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, 2: 409–430, 2006.

- RODRÍGUEZ-CORTÉS, A., OJEDA A., LÓPEZ-FUERTES L., TIMÓN M. , ALTET L. , SOLANO-GALLEGO L., SÁNCHEZ-ROBERT E., OLGA FRANCINO C., ALBEROLA J. A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. **International Journal for Parasitology**, 37: 683–693, 2007
- ROSATI, S., ORTOFFI, M., PROFITI, M., MANNELLI, A., MIGNONE, W., BOLLO, E., GRADONI, L.. Prokaryotic Expression and Antigenic Characterization of Three Recombinant *Leishmania* Antigens for Serological Diagnosis of Canine Leishmaniasis. **Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology**, 1153–1156, 2003.
- SAMBROOK, J., MANIATS, T.E. & FRITSCH, E.F. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor, 1989.
- SANTA ROSA, I. C. A., OLIVEIRA, I. C. S. Leishmaniose Visceral: Breve Revisão sobre uma Zoonose Reemergente. **Clín. Vet**, 11: 24-28, 1997.
- SANTOS, R. F., PÔSSA, M. A. S., BASTOS, M. S., GUEDES, P. M. M., ALMEIDA, M. R., DEMARCO R., VERJOVSKI-ALMEIDA S., BAHIA M. T. AND FIETTO J. L. R. Influence of Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase Activity on *Trypanosoma cruzi* Infectivity and Virulence, **PLoS Neglected Tropical Diseases**, in press, 2009.
- SENGER, M. R., ROSEMBERG, D. B., RICO, E. P., ARIZI M. B., DIAS, R. D., BOGO, M, R., BONAN C. D.. In vitro effect of zinc and cadmium on acetylcholinesterase and ectonucleotidase activities in zebrafish (*Danio rerio*) brain. **Toxicology in Vitro**, 20 :954–958, 2006.
- SHAW, J. J. **New World Leishmaniasis: the ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America**. World Class Parasites: *Leishmania*, pp. 11-31, 2002.
- SILVA, E. S., GONTIJO, C. M. F., PACHECO, R. S., FIÚZA, V. O. P., BRAZIL, R. P. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 96: 285–291, 2001
- SILVA, F. L., OLIVEIRA, R. G., SILVA, T. M. A., XAVIER M. N., NASCIMENTO, E. F., SANTOS, R. L. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, 2008.

SILVESTRE, R., SANTARÉM, N., CUNHA, J., CARDOSO, L., NIETO, J., CARRILLO, E., MORENO, J., CORDEIRO-DA-SILVA, A. NABELA. Serological evaluation of experimentally infected dogs by LicTXNPx-ELISA and amastigote-flow cytometry. **Veterinary Parasitology**, 158: 23–30 2008.

SINHA, P. K., RANJAN, A., SINGH, V. P., DAS V. N., PANDEY, K., KUMAR, N., VERMA, N., LAL, C. S., SUR, D., MANNA, B., BHATTACHARYA, S. K. Visceral leishmaniasis (kala-azar)-the Bihar (India) perspective. **J Infect**, 10: 1016, 2005

SLAPPENDEL, R. J. Canine Leishmaniasis. A Review Based On 95 Cases In The Netherlands. **Vet. Q**, 10: 1–16, 1988.

SMITH, T. M., KIRLEY T. L. 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, 1999.

SOLANO-GALLEGO L., RIERA C., ROURA X., INIESTA L., GALLEGO M., VALLADARES J. E. Leishmania infantum-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. **Vet Parasitol**, 96:65–76, 2001.

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

TAFURI, W. L., BARBOSA, A. J. A., MICHALICK, M. S. M., GENARO, O., FRANÇA-SILVA, J. C., MAYRINK, W., NASCIMENTO, E. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with Leishmania (*Leishmania*) chagasi. **Rev. Inst. Med. Trop**, 38: 81–89, 1996.

WERNECK, G.L. Multilevel modeling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. **Epidemiol. Infect**, 135, 195–201, 2006.

WHO (World Health Organization). **Control of the Leishmaniasis**. disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/WHO_CDS_NTD_IDM_2007.3_eng.pdf. 20h 54 min. 20-01-2009.

YAMAMOTO, Y. I., NUNES, V. L. B., JUNIOR, F. A. R., OSHIRO, E. T., DORVAL, M. E. M. C. Estudo da eficiência das reações de imunofluorescência e de hemaglutinação passiva no diagnóstico da leishmaniose visceral em cães. **Rev. Fac. Med. Vet. Zootec**, 25: 143–152. 1988.

ZIJLSTRA, E. E., ALI, M. S., EL-HASSAN, A. M., EL-TOUM, I. A., SATTI, M., GHALIB, H. W. AND KAGER, P. A. Direct agglutination test for diagnosis and seroepidemiological survey of kala-azar in the Sudan. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 85: 474–476, 1991.

ZIJLSTRA E.E., EL-HASSAN A.M. Visceral leishmaniasis. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg**, 95(Suppl 1):S 27–58. 2001.

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

ZIMMERMANN, H., BEAUDOIN, A. R., BOLLEN, M. Proposed nomenclature for two novel nucleotide hydrolyzing enzyme families expressed on the cell surface. **In Vanduffel L (ed): Second International Workshop on Ecto-ATPases and Related Ectonucleotidases, Maastricht, The Netherlands, 1999–2000**. Diepenbeek, Belgium: Shaker Publishing; 1–9. 1999.