



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE HUMANA E
ANIMAL**

EDUARDA NATTALY FERREIRA NOBRE SANTOS

**ESTUDO COMPARATIVO DA RESPOSTA DO ANTÍGENO rK39 EXPRESSA EM
SISTEMA EUCARIOTO E PROCARIOTO PARA UTILIZAÇÃO NO DIAGNÓSTICO DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

FORTALEZA - CEARÁ

2018

EDUARDA NATTALY FERREIRA NOBRE SANTOS

ESTUDO COMPARATIVO DA RESPOSTA DO ANTÍGENO rK39 EXPRESSA EM
SISTEMA EUCARIOTO E PROCARIOTO PARA UTILIZAÇÃO NO DIAGNOSTICO DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal do Programa de Pós-Graduação do MPBiotec da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biotecnologia. Área de Concentração: Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Fraga van Tilburg.

Coorientadora: Prof.^a Mrs.^a Lucelina da Silva Araújo.

FORTALEZA - CEARÁ

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Santos, Eduarda Nattaly Ferreira Nobre

Estudo comparativo da resposta do antígeno rk39 expressa em sistema eucarioto e procarioto para utilização no diagnóstico da leishmaniose visceral canina [recurso eletrônico] / Eduarda Nattaly Ferreira Nobre Santos.– 2018.

1 CD-ROM: il.; 4 ¾ pol.

CD-ROM contendo o arquivo em formato PDF do trabalho acadêmico com 126 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Dissertação (mestrado profissional) – Universidade Estadual do Ceará, Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, Fortaleza, 2018.

Área de Concentração: Biotecnologia.

Orientação: Prof. Dr. Mauricio Fraga van Tilburg.

Coorientadora: Prof.^a Mrs.^a Lucelina da Silva Araújo.

1. Diagnóstico. 2. Leishmania. 3. Proteína Recombinante. 4. Sistema Vegetal.
5. Proteína K39. I. Título.

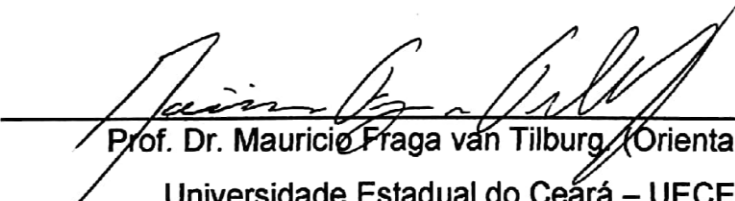
EDUARDA NATTALY FERREIRA NOBRE SANTOS

ESTUDO COMPARATIVO DA RESPOSTA DO ANTÍGENO K39 RECOMBINANTE
EXPRESSA EM SISTEMA EUCARIOTO E PROCARIOTO PARA UTILIZAÇÃO NO
DIAGNOSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal do Programa de Pós-Graduação do MPBiotec do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Aprovada em: 26 de Junho de 2018.

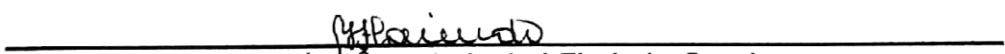
BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Mauricio Fraga van Tilburg (Orientador)

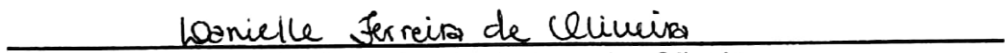
Universidade Estadual do Ceará – UECE


Prof.ª Mrs.ª Lucelina da Silva Araújo (Coorientador)

Universidade Estadual do Ceará – UECE


Prof.ª Dr.ª Maria Izabel Florindo Guedes

Universidade Estadual do Ceará – UECE


Prof.ª Dr.ª Danielle Ferreira Oliveira

Universidade Estadual do Ceará – UECE

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por que ele é o maior responsável por essa conquista nessa longa caminhada, sempre sendo meu guia e a minha maior fortaleza;

Agradeço a minha família, em especial a minha mãe Lúcia de Fátima Ferreira Nobre pelo apoio, dedicação, compreensão, por está sempre ao meu lado e nunca permitir que eu fraqueje, por ser minha base e meu maior exemplo de ser humano;

Agradeço ao laboratório de Biotecnologia e Biologia molecular e toda a sua equipe, foi esse ambiente que me permitiu concluir o presente trabalho, além de ter me permitido conhecer tantas pessoas incríveis e queridas, vocês são a minha segunda família, seria injusto citar nomes e correria o risco de esquecer-me de alguém, então, agradeço a todos pelo conhecimento, aprendizagem e crescimento profissional que adquiri ao lado dessa grande família nos últimos anos;

Agradeço a professora Maria Izabel Florindo Guedes pelas oportunidades, por acreditar e me permitir fazer parte dessa grande família, a senhora tornou possível essa conquista; ao Eridan Tramotina Florean e a empresa GreenBean que muito contribuiu financeiramente e em apoio para a conclusão desse projeto e amadurecimento profissional e ao professor Maurício Fraga van Tilburg obrigada por toda ajuda e orientação;

Agradeço aos meus queridos amigos que me ajudaram, socorreram, deram apoio e motivação, em especial agradeço a professora Lucelina da Silva Araújo por toda dedicação, paciência, compreensão, ensinamento, conversas e pelas muitas horas dedicadas, em bancada e fora dela; a Dra. Danielle Ferreira de Oliveira pela amizade, carinho e por toda a ajuda, durante a escrita da dissertação; a Renata Araújo e Silva por sempre acreditar, as vezes, mais até do que eu mesma e ao rapaz, dessa querida lista, Bruno Bezerra da Silva, desculpa te perturbar tanto, meu amigo, obrigada pela paciência, preocupação, conhecimento e sua boa vontade sempre em ajudar e sanar minha duvidas, não conseguiria sem cada um de vocês;

Agradeço a Universidade Estadual do Ceará, CNPq e Funcap pelo apoio financeiro a esse projeto e ao Centro de Controle de Zoonose de Fortaleza.

RESUMO

A Leishmaniose representa um grave problema de saúde pública principalmente nos países em desenvolvimento. No Brasil, o cão doméstico é considerado o principal reservatório epidemiológico para o gênero *Leishmania*, sendo um elo na transmissão e manutenção da Leishmaniose Visceral Zoonótica Humana. As principais medidas de controle, atualmente, aplicadas são direcionadas para a detecção e eliminação de cães infectados. Dessa forma, o diagnóstico precoce em caninos é crucial para o controle da doença, possibilitando uma intervenção rápida. Diferentes plataformas de expressão podem ser usadas para a obtenção de proteínas que podem ser utilizadas em kits de diagnóstico. O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho da proteína rk39 expressa em plataformas diferentes, utilizando a *Escherichia coli* como plataforma procariótica e a *Nicotiana Benthamiana* como plataforma eucariótica ou vegetal, e comparar a sensibilidade e especificidade apresentada por ambas as proteínas no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC). Para isso, utilizou-se as proteínas rk39 frente a soros de animais diagnosticados pelo Centro de Controle de Zoonoses – CCZ, com base em dois testes sorológicos, o DPP® e o ELISA-EIE®, recomendados pelo ministério da saúde para diagnóstico de LVC no Brasil. A metodologia utilizada para avaliação das proteínas foi feita através do teste imunoenzimático indireto (ELISA). Dentre os principais resultados pode ser verificada uma sensibilidade de 99% e especificidade de 30%, da rk39 expressa em sistema eucarioto, frente a uma sensibilidade de 92% e especificidade de 40%, apresentada pela rk39 produzida na plataforma procariótica. O desempenho, utilizando a rK39/eucarioto para a confirmação da infecção em casos clínicos apresentou alta positividade, com alta sensibilidade para detectar cães confirmados. Dessa forma, os resultados apresentados nesse estudo associado ao baixo custo e a menor biointerferência da plataforma vegetal tornam a rK39/eucarioto uma promissora proteína para uso em diagnóstico da LVC, em programas de controle e estudos epidemiológicos.

Palavras chave: Diagnóstico. *Leishmania*. Proteína Recombinante. Sistema Vegetal. Proteína K39.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a serious public health problem, especially in developing countries. In Brazil, the domestic dog is considered the main epidemiological reservoir for the genus *Leishmania*, being a link in the transmission and maintenance of Human Zoonotic Visceral Leishmaniasis. The main control measures currently applied are directed to the detection and elimination of infected dogs. Thus, early diagnosis in canines is crucial for the control of the disease, allowing rapid intervention. Different expression platforms can be used to obtain proteins that can be used in diagnostic kits. The objective of this study was to evaluate the performance of the rk39 protein expressed in different platforms using *Escherichia coli* as a prokaryotic platform and *Nicotiana benthamiana* as a eukaryotic or vegetal platform, and to compare the sensitivity and specificity presented by both proteins in the diagnosis of Visceral Canine Leishmaniasis (LVC). For this, the rk39 proteins were used against sera from animals diagnosed by the Center for Zoonoses Control (CCZ), based on two serological tests, DPP® and ELISA-EIE®, recommended by the Ministry of Health for the diagnosis of LVC in Brazil. The methodology used to evaluate the proteins was made through indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Among the main results, a sensitivity of 99% and specificity of 30% of rk39 expressed in eukaryotic system can be verified, compared to a sensitivity of 92% and specificity of 40%, presented by rk39 produced in the prokaryotic platform. The performance, using the rK39 / eukaryote to confirm the infection in clinical cases showed high positivity, with high sensitivity to detect confirmed dogs. Thus, the results presented in this study, associated to the low cost and lower biointerference of the plant platform, make rK39 / eukaryote a promising protein to use in LVC diagnosis, control programs and epidemiological studies.

Keywords: Diagnosis. Leishmania. Recombinant Protein. Plant System. Protein K39.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Diagrama de classificação das espécies do <i>Leishmania</i>	19
Figura 2 – <i>Lutzomyia</i> vetor de transmissão da Leishmaniose.....	25
Figura 3 – Principais formas evolutivas do parasita.....	27
Figura 4 – Ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	29
Figura 5 – Manifestações clínicas da doença.....	31
Figura 6 – Representação gráfica da sequência recombinante k39.....	54
Figura 7 – Mapa do plasmídeo pUC-K39 contendo a sequência recombinante.....	55
Figura 8 – Representação do mapa circular do vector de expressão pET-28a.....	57
Figura 9 – Confirmação da sequência rK39 da <i>L. chagasi</i> localizada entre os sítios de restrição <i>EcoRI</i> e <i>BamHI</i> pelo sequenciamento.....	67
Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose do plasmídeo pUC-k39 digerido com as enzimas de restrição.....	67
Figura 11 – Mapa do plasmídeo de expressão recombinante (pET-28a-k39)....	69
Figura 12 – Confirmação do plasmídeo nas colônias DH5 α após transformação e digestão do plasmídeos de expressão.....	70
Figura 13 – Expressão da proteína rk39 em concentrações diferentes de IPTG.....	71
Figura 14 – Expressão de diferentes colônias de BL21(DE3) transformadas com o plasmídeos recombinantes pET-28a-k39.....	73
Figura 15 – Teste de solubilidade da proteína rK39 expressa em cultura bacteriana de <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	73
Figura 16 – Confirmação da presença da rk39 após lise da cultura bacteriana por <i>Western Blotting</i>	74
Figura 17 – Confirmação da proteína rk39 produzida em <i>E.coli</i> após a purifica- ção por cromatografia de afinidade ao níquel.....	76
Figura 18 – <i>Western Blotting</i> do extrato puro de Bactéria e Planta incubados com os soros do controle positivo e negativo.....	77
Figura 19 – Avaliação das proteínas rk39 de procarioto e eucarioto frente á soros de animais positivos e negativos de LVC por ELISA indireto	83

Figura 20 – Curva ROC das proteína rK39/Procarioto e rK39/Eucarioto..... 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais acontecimentos que contribuíram para os avanços na engenharia genética.....	36
Tabela 2 – Representação da análise dos resultados obtidos em teste por ELISA indireto.....	63
Tabela 3 – Interpretação do teste de acordo com a área sob a curva ROC.....	65
Tabela 4 – Desempenho do ELISA/Bactéria em amostras de soro de cães soronegativos para LVC.....	81
Tabela 5 – Desempenho do ELISA/Planta em amostras de soro de cães soronegativos para LVC.....	81
Tabela 6– Área sob a curva (AUC).....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCZ	Centro de Controle de Zoonose
LV	Leishmania Visceral
LVC	Leishmania Visceral Canino
PAHO	Pan American Health Organization
WHO/OMS	World Health Organization/Organização Mundial de Saúde
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
ROC	Características Operacionais do Receptor
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LC	Leishmaniose Cutânea
syn	Sinônimo
EUA	Estados Unidos da América
pH	Potencial Hidrogeniônico
Ti	Indução de Tumor
Vir	Região de Virulência
T-DNA	DNA de transferência
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
IgG	Imunoglobulina G
RIFI	Teste de Aglutinação Direta
DPP	Imunofluorescência Indireta (RIFI)
DAT	Teste de Aglutinação Direta
LT	Leishmaniose Tegumentar
rk39	Proteína k39 recombinante
ng/ug	Unidades de Medidas: nanograma/micrograma
ul/ml	Unidades de Medidas: microlítro/mililítro
rpm	Rotação por minuto
LB	Meio Luria Bertani
nm	Nanômetros

U	Unidades
RNA	Ácido Ribonucléico
mM/M	Milímolar/Molar
IPTG	Isopropil β -D-1- tiogalactopiranosida
O.D.	Densidade Óptica
PMSF	Fluoreto de Fenilmetanosulfonil
W.B.	Western Blotting
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de Dodecil Sulfato de Sódio-poliacrilamida
PBS	Tampão Fosfato de Sódio
DAB	Diaminabenzidina
Ní	Níquel
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
<i>cut-off</i>	Ponto de Corte
VPP	Valor Preditivo Positivo
VPN	Valor Preditivo Negativo
RVP	Razão de Verossimilhança Positiva
RVN	Razão de Verossimilhança Negativa
AC	Acurácia
AUC	Área Sob a Curva ROC
CV	Coeficiente de Variação
pb	Pares de Base
U.V.	Radiação ultravioleta
RNA _m	Ácido Ribonucleito Mensageiro
RBS	Ribossomo
kDa	Unidade de Massa Atômica
°C	Grau Celsius
SBNT	Sobrenadante
HIS	Histidina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	SOBRE A LEISHMANIOSE.....	18
2.2	HISTÓRICO DE LEISHMANIOSE NO MUNDO E NO BRASIL	21
2.3	EPIDEMIOLOGIA.....	22
2.4	VETOR E HOSPEDEIRO.....	24
2.4.1	Vetor	24
2.4.2	Hospedeiro	25
2.5	CICLO DE VIDA DO PARASITA	26
2.5.1	Ciclo biológico no hospedeiro invertebrado e vertebrado	28
2.6	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	29
2.6.1	Leshimaniose visceral	31
2.6.2	Leishmaniose visceral canina	34
2.7	BIOTECNOLOGIA.....	35
2.8	PROTEÍNAS RECOMBINANTES	37
2.9	SISTEMAS DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS.....	38
2.9.1	Expressão em Sistema Procarioto	38
2.9.2	Expressão em Sistema Eucarioto	40
2.10	PROTEÍNA RECOMBINANTE DA LEISHMANIA.....	45
2.11	DIAGNÓSTICO	46
2.11.1	Diagnóstico clínico	48
2.11.2	Diagnóstico parasitológico	48
2.11.3	Diagnóstico molecular	49
2.11.4	Diagnóstico sorológico	50

3	OBJETIVOS	53
3.1	OBJETIVO GERAL	53
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
4	MATERIAIS E MÉTODOS	54
4.1	OBTENÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	54
4.1.1	Escolha e construção do inserto	54
4.1.2	Clonagem em sistema procarioto.....	54
4.1.3	Ligação dos genes ao vetor de expressão (pET-28a).....	55
4.1.4	Expressão da proteína rk39.....	57
4.1.5	Purificação da proteína recombinante	57
4.2	IMUNOENSAIO - TÉCNICA DE ELISA.....	60
4.2.1	População de estudo	60
4.2.2	Antígenos.....	61
4.2.3	Padronização do ensaio imunoenzimático (ELISA)	61
4.3	TESTE DAS AMOSTRAS POR ELISA.....	61
4.3.1	Determinação do limiar de reatividade (cut off)	62
4.3.2	Cálculo da sensibilidade e especificidade do teste de imunodiagnóstico..	62
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA DO ELISA.....	65
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5.1	OBTENÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	66
5.1.1	Confirmação da construção do inserto rK39.....	66
5.1.2	Clonagem no vetor de expressão pET-28a	67
5.1.3	Expressão e Purificação da rK39 em Sistema Procarito	70
5.1.4	Purificação da proteína recombinante	75
5.2	SORODIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL POR ELISA.....	78
5.2.1	Padronização da técnica de ELISA.....	78

5.2.2	Ensaio das proteínas recombinantes no ELISA para LVC	79
6	CONCLUSÃO	86
	REFERÊNCIAS.....	87
	ANEXO A – FOLHA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	104
	ANEXO B - ARTIGO.....	105

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose representa um grave problema de saúde pública nos países em desenvolvimento tendo a Leishmaniose Visceral (LV) como a forma mais grave da doença (CAVALCANTE; VALE, 2014; MARTINS; DE LIMA, 2013; SAUDA *et al.*, 2018). A Leishmaniose Visceral Canina (LVC), conhecida também como calazar, acomete canídeos silvestres e domésticos. No Brasil o principal agente etiológico da doença é a *Leishmania chagasi* e os cães são os principais reservatórios e o principal ele de transmissão para humanos (DABIRI; MOTAZEDIAN; MIKAEILI, 2016). A LV em humanos é endêmica em 12 países das Américas, sendo, o Brasil sozinho responsável por 96% dos casos registrados (PAHO/WHO, 2018). A região nordeste do Brasil é considerada a mais endêmica, pois concentra o maior número de casos registrados da doença, responsável por uma incidência de 6,4/100.000 habitantes (CEARÁ, 2014).

Até o momento ainda não se tem um método, para diagnóstico de LVC, que utilizado sozinho garanta a máxima sensibilidade e especificidade, mostrando-se eficiente na identificação de cães doentes e/ou portadores. Também não existem testes que sejam capazes de distinguir cães sintomáticos, assintomáticos e animais vacinados, dificultando, desta forma, o diagnóstico definitivo (MENDES *et al.*, 2017). Apesar de existir diferentes métodos para o diagnóstico da LVC, os métodos sorológicos ou de imunodiagnóstico são os mais utilizados em decorrência da facilidade, baixo custo, rapidez, capacidade da doença de ativar a produção de anticorpos e à resposta imune humoral da doença (BARBOSA, 2005; SOUSA; FRANCISCO; SANTOS, 2015).

Os métodos de sorodiagnóstico podem utilizar proteínas bruta ou recombinante, como antígenos para detectar anticorpos específicos. A eficiência destes testes depende da especificidade das proteínas a serem utilizadas. Assim, estudos de caracterização molecular do parasita são importantes, pois contribuem para a descrição e identificação de novas proteínas do protozoário, permitindo seu uso e aplicação (SANTOS, 2016).

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante tornou-se possível obter proteínas recombinantes a partir da clonagem molecular de genes capazes de codificar

proteínas antigênicas (MAIA; CAMPINO, 2008). Atualmente, muitos pesquisadores em busca de desenvolver métodos mais específicos para o diagnóstico da LV, tanto canina como humana, tem feito uso dessa tecnologia. Pesquisas feitas com antígenos purificados comprovam que essa ferramenta é capaz de melhorar a sensibilidade e especificidade dos testes de diagnóstico (ANNÉ; ECONOMOU; BERNAERTS, 2016). Segundo Paiva-Cavalcanti e colaboradores (2015), a proteína k39 recombinante (rk39) da *Leishmania chagasi*, vem sendo utilizada no diagnóstico da LVC, obtendo resultados promissores quando empregado em testes de imunodiagnóstico.

A expressão de proteínas recombinantes em procarioto utilizando a bactéria *Escherichia coli* é uma técnica bem estabelecida, sendo a plataforma de expressão mais utilizada, entretanto apesar das vantagens oferecidas, essa técnica apresenta significativas desvantagens e limitações (DE ABREU *et al.*, 2014). Na prática, a expressão de proteínas eucarióticas em plataforma procariótica favorece a formação de corpos de inclusão e sua degradação devido ao aumento das taxas de expressão (SINGHA *et al.*, 2017). Além disso, é comum ocorrer a inatividade e a não expressão de proteínas mais complexas (ROSANO; CECCARELLI, 2014). Dessa forma, têm-se investido no desenvolvimento de novos sistemas de expressão de proteínas que minimizem esses problemas e que favoreçam a produção em larga escala, objetivando aumentar a produção e reduzir os custos (NÓBREGA, 2014).

Nas duas últimas décadas a biotecnologia tem investido no uso da plataforma vegetal (eucariótica), o qual tem se destacado como um sistema eficiente para a produção de proteínas recombinantes podendo ser um substituto da plataforma procariótica. Os resultados positivos advindos de testes utilizando plantas transgênicas e transientes levaram ao aprimoramento dessa técnica e seu amplo uso dentro da biotecnologia (SOUZA, 2014).

Diante do exposto, o presente trabalho busca avaliar e comparar a sensibilidade e especificidade da proteína rk39, da *Leishmania chagasi*, produzida nas duas plataformas de expressão, procarioto e eucarioto, por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA).

2 REVISÃO DE LITERATURA

PARTE I

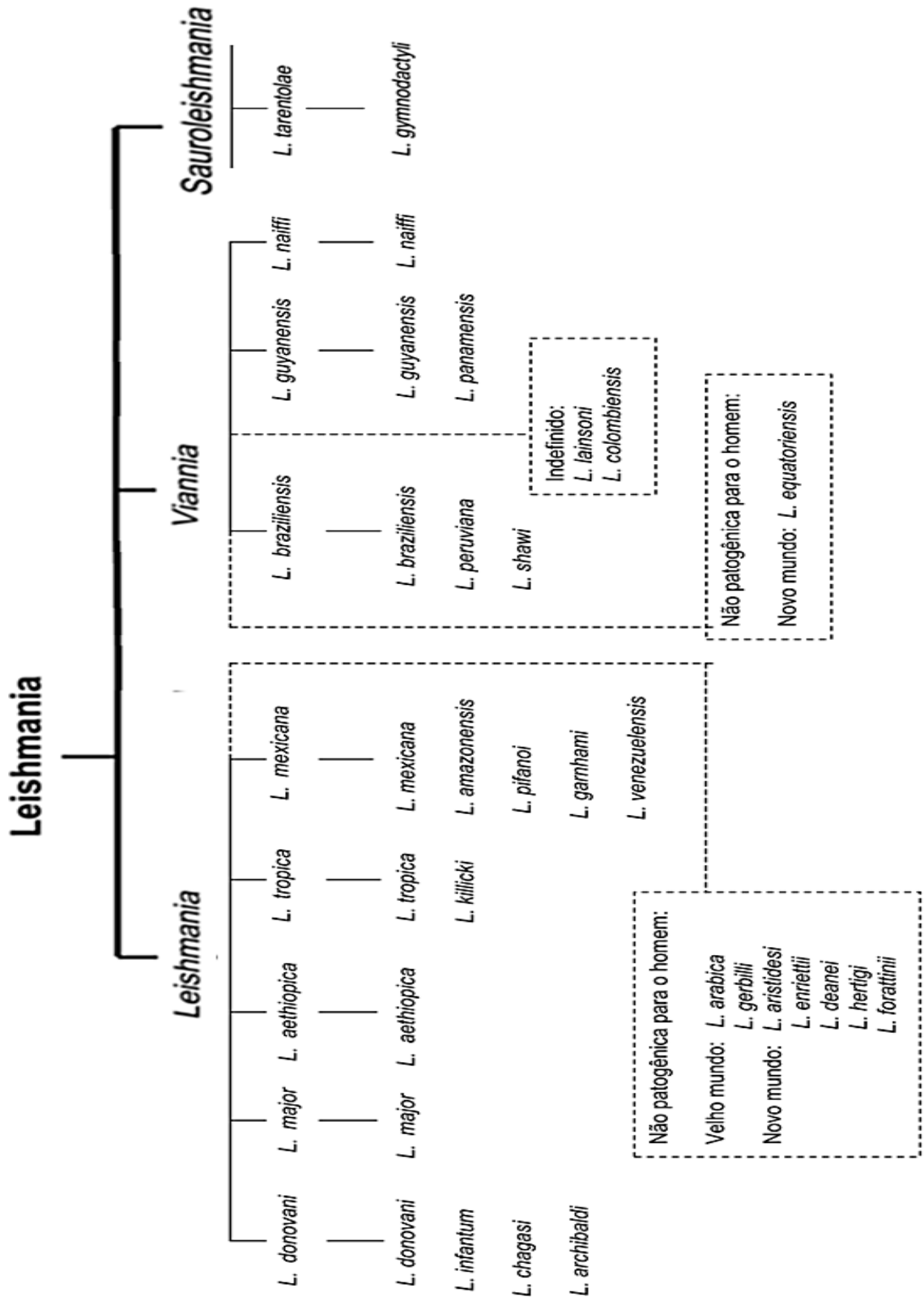
2.1 SOBRE A LEISHMANIOSE

As leishmanioses são caracterizadas como um conjunto de doenças infecto-parasitárias causadas por protozoários digenéticos (heteroxênico), ou seja, parasitas que vivem alternadamente em hospedeiros vertebrados (nos fagócitos do sistema retículo-endotelial) e nos insetos vetores (no trato intestinal), intercalando seu ciclo de vida e parasitando dois tipos de hospedeiros (AKHOUNDI *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2016).

O agente etiológico causador da leishmaniose são protozoários pertencentes ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora e devido a presença de flagelo são classificados como pertencentes ao sub-filo Mastigophora, apresentam uma mitocôndria única modificada que possui uma porção rica em kDNA (material genético mitocondrial), denominado cinetoplasto incluindo-os na ordem Kinetoplastida. Os protozoários da ordem Kinetoplastida que possuem apenas um flagelo pertencem à família Trypanosomatidae que se divide nos gêneros: *Trypanosoma*, responsável pelas doenças de Chagas e doença do sono; e *Leishmania*, responsável pelas leishmanioses que infectam inúmeros mamíferos, incluindo o homem (DABIRI; MOTAZEDIAN; MIKAEILI, 2016; LAINSON, 1987; NUNES *et al.*, 2007; SILVA, 2014).

O gênero *Leishmania* ainda se subdivide em 3 subgêneros *Leishmania*, *Viannia* e *Sauroleishmania* que apresentam o mesmo perfil monofilético (MUGASA, 2010). O agrupamento das espécies nesses subgêneros é feito de acordo com o desenvolvimento do parasita no intestino do inseto (LAINSON; SHAW, 1992). Esse último o subgênero *Sauroleishmania* (inclui as espécies *L. tarentolae* e *L. gymnodactyl*) é constituído de espécies que se desenvolvem no intestino posterior do inseto vetor e têm os répteis como seus hospedeiros vertebrados (NASCIMENTO, 2014). Os outros dois subgêneros englobam apenas as espécies causadoras de infecções em mamíferos, o subgênero *Viannia* e o subgênero *Leishmania* (LAINSON, 1987) (Figura 1).

Figura 1 - Diagrama de classificação das espécies do *Leishmania*



No subgênero *Viannia* (que inclui o complexo *braziliensis*, *guyanensis*, *lainsoni*, *naifi*), as Leishmanias desenvolvem-se no intestino posterior do inseto vetor aderido à parede, na região do piloro e depois migram para o intestino médio e anterior (peripilária). Seu crescimento é pobre em meio de cultura convencional e possuem um desenvolvimento lento no hospedeiro vertebrado. No subgênero *Leishmania* (que inclui os complexos *mexicana*, *infantum*, *amazonensis*, *enriettii*, *hertigi*) o desenvolvimento ocorre no intestino médio e anterior do inseto (suprapilária). Apresenta um bom crescimento em meio de cultura além de provocar grandes lesões nodulares nos hospedeiros vertebrados (LAINSON, 1987; LAINSON; SHAW, 1992).

As primeiras classificações das espécies de *Leishmania* foram feitas levando em consideração apenas os aspectos clínicos das doenças (KONTOS; KOUTINAS, 1993). Porém a partir da década de 60 a classificação do parasita passou a englobar outros critérios como o comportamento em cultura, em animais experimentais e em seus vetores, levando a distinção das espécies em complexos diferentes. Com o tempo, o surgimento da microscopia eletrônica e de novos avanços científicos na biologia molecular, bioquímica e imunologia proporcionaram uma amplificação da taxonomia e a aplicação de novos métodos para sua classificação (NOVO *et al.*, 2016).

As espécies do gênero *Leishmania*, apesar de serem morfologicamente semelhantes são espécies que possuem uma ampla diversidade quanto a patogenicidade e o ciclo biológico. Essas espécies possuem alta taxa de heterogeneidade genética mesmo em isolados geográficos próximos, o que dificulta a classificação e identificação. Dessa forma, a taxonomia da *Leishmania* por ser bastante complexa ainda é um assunto controverso que gera diversas discussões entre pesquisadores da área (BAKIRCI *et al.*, 2016; CHANCE; SIES; BOVERIS, 1979).

Até o momento, aproximadamente cinquenta e três espécies de *Leishmania* foram descritas, destas trinta e uma são conhecidas como parasitas de mamíferos e mais de vinte são patogênicas ao homem (AKHOUNDI *et al.*, 2016; CATTAND *et al.*, 2006; QUEIROZ, 2008; SILVA, 2014). As espécies de *Leishmania* são encontradas principalmente em áreas tropicais e subtropicais, estando presentes na América do Norte, Central e Sul, bem como na bacia do Mediterrâneo, sudeste da Europa, Oriente Médio, Ásia Central, Índia e África (AKHOUNDI *et al.*, 2016).

Das espécies identificadas nas Américas, foi confirmada a espécie *Leishmania (Leishmania) infantum*, como a mais frequente e a principal causadora da leishmaniose visceral, além de onze espécies dermatrópicas (*Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (Leishmania.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) venezuelensis* e *L. (L.) pifanoi*.) de *Leishmania*, causadoras de infecções cutâneas ou mucocutâneas em humanos e oito espécies em animais. Das espécies dermatofíticas, no Brasil, já foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia (Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawie* e *Leishmania (Viannia) lindenberg* e um do subgênero *Leishmania (L.) (L.) amazonenses* (ARAÚJO *et al.*, 2015; LOPES *et al.*, 2016).

2.2 HISTÓRICO DE LEISHMANIOSE NO MUNDO E NO BRASIL

A leishmaniose possui seus primeiros relatos informais datados desde o século I d.C. (BASANO; CAMARGO, 2004). Em 1756, Alexander Russell fez a primeira descrição clínica da doença apresentado por um paciente na Turquia (BARI, 2006). Posteriormente, Douglas Cunningham observou a presença de microrganismos em material de biópsia de um paciente, em Calcutá, Índia, em 1885. No entanto, ele não reconheceu a natureza etiológica e descreveu-o como de origem fúngica. Só em 1898, o Sargento Russo D.F. Borovsky conseguiu descrever o agente causador identificando-o como protozoário, porém ele não o nomeou. A doença só tornou-se conhecida pela comunidade científica como Leishmaniose após William Leishman, um médico de Glasgow que serviu ao exército britânico na Índia, cultivar cepas de *Leishmania*, em 1901, vindas do baço de um soldado britânico (CARIDAD, 2015; SAEED, 2010).

W. Leishman foi responsável por descrever e identificar o agente etiológico da doença publicando seus resultados em 1903 na revista *British Medical Journal*. Nesse mesmo ano Charles Donovan, independentemente, descreveu e publicou o parasita em seus estudos em pacientes com calazar. No final de 1903, Ronald Ross criou o gênero *Leishmania* e denominou de *Leishmania donovani* o agente etiológico do calazar, como homenagem aos dois descobridores. James Homer Wright, ainda no mesmo ano, classificou como *Leishmania tropical* o agente etiológico do botão do

oriente sendo o primeiro a observar o parasita dentro de macrófagos (CARIDAD, 2015; DONOVAN, 1903; SAEED, 2010).

Após as primeiras descrições da doença e de seu agente etiológico vários relatos e notificações de Leishmaniose foram feitas, inclusive associações de surtos que ocorreram antes da sua denominação como Leishmaniose como a epidemia de calazar descrita por Archibadi em 1922, que ocorreu nos Montes Garo de Assam e na Arábia Saudita em 1870 (DATTA; GUPTA; RAYCHAUDHURY, 2011). O calazar também foi dito como responsável pela morte de mais de 75.000 pessoas durante um período de três anos, marcando a primeira grande epidemia da doença no distrito de Jessore de Bengal (atualmente localizado no sudoeste de Bangladesh), entre 1824-1827 (CHOWDHURY *et al.*, 2014).

Em 1908 relatos feitos por, Nicolle e Comte, demonstraram pela primeira vez o parasita em cães, na Tunísia, sugerindo que os mamíferos, incluindo cães poderiam atuar como hospedeiros reservatórios da *Leishmania* (DATTA; GUPTA; RAYCHAUDHURY, 2011; GENARO *et al.*, 2000). A primeira descrição dessas doenças, já conhecidas como Leishmaniases, na América do Sul, foi feita por Migone no Paraguai em 1911 (NASCIMENTO, 2014). Swaminath e colaboradores provaram em 1942, com experimentos feitos com voluntários humanos, que os parasitas de *Leishmania* poderiam ser transmitidos por Phlebotomíneos (DATTA; GUPTA; RAYCHAUDHURY, 2011).

O primeiro relato de um caso de LV no Brasil foi em 1913, em uma paciente de Boa Esperança, Mato Grosso. Posteriormente, em 1934, foram encontradas formas amastigotas de *Leishmania* (responsável por parasitar o sistema fagocítico-mononuclear de mamíferos) em cortes histológicos de fígado de pessoas que morreram com suspeita de febre amarela, passando a despertar os primeiros interesses científicos no país. Vinte anos depois, houve o registro do primeiro surto da doença em Sobral, no Ceará (SOUZA, 2009).

2.3 EPIDEMIOLOGIA

Conforme a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2018b), as leishmaniases classificam-se como o segundo grupo de doenças letais causadas por protozoários,

ficando atrás apenas da malária, porém mesmo com a alta mortalidade a doença ainda é negligenciada, tornando-se emergente em muitos países.

As leishmanioses são endêmicas em noventa e oito países e em cinco continentes estima-se que cerca de 12 milhões de pessoas estão infectadas por *Leishmania* no mundo e outras 380 milhões de pessoas correndo risco de serem contaminadas. A incidência da doença é de aproximadamente 1,5 - 2,0 milhões de novos casos ao ano, porém somente 600.000 casos são relatados oficialmente (COELHO *et al.*, 2016; MORTAZAVIDEHKORDI *et al.*, 2016; SILVA, 2014; SOUSA; FRANCISCO; SANTOS, 2015). Em virtude de seu caráter crônico, letalidade e da ampla distribuição mundial a leishmaniose é a quinta doença, na categoria de doenças infectoparasitárias, de maior importância em todo mundo (VASCONCELOS, 2015; SOUSA, 2007). Levando a uma mortalidade mundial de 59.000 óbitos por ano (ARAÚJO *et al.*, 2015).

A leishmaniose possui uma alta incidência e ampla distribuição geográfica principalmente nas Américas. No Brasil, segundo a secretária da Saúde do Estado do Ceará foi notificada, no período de 1990 a 2016, 772.702 casos de leishmaniose (tegumentar e visceral). O último relatório de novembro de 2017 informa que, nesse mesmo período foram registrados 84.922 casos confirmados da LV. Do total de casos registrados de Leishmaniose, 276.484 casos (220.782 tegumentar e 55.702 visceral) foram registrados só na região do Nordeste o que correspondendo a 35.78% do total de casos registrados no país (BRASIL, 2017b).

Nesse mesmo relatório é possível observar que a doença vem se expandindo para regiões, como na região Sul que até o ano 2000 não havia registro de casos de LV. Em 2016 foram registrados 3.200 novos casos de LV, sendo a região Nordeste a que apresenta maior taxa de incidência 47,59% (1.523), demonstrando que apesar do deslocamento e expansão da doença para outros municípios a região ainda predomina com um número bastante elevado de novos casos. Dentre os estados da região Nordeste, o Maranhão (655), o Ceará (283) e a Bahia (191) são os 3 estados mais endêmicos, o Ceará ficando em 2ª lugar (18,58%). A região Nordeste também é a que apresenta maior número de óbitos, foram 133 dos 265 óbitos, confirmados com a doença, em 2016 (BRASIL, 2017b).

2.4 VETOR E HOSPEDEIRO

2.4.1 Vetor

A principal forma de transmissão do parasita para o homem e outros hospedeiros mamíferos é através da picada de insetos fêmea (infectados) pertencente à ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae conhecidos como flebotomíneos ou vulgarmente, como “mosquito-palha”, “cangalhinha” e “birigui” (AKHOUNDI *et al.*, 2016; MAIA; DEPAQUIT, 2016).

Lewis *et al.* (1977) propuseram a subdivisão dos flebotomíneos em 5 gêneros (2 para espécies do velho mundo (*Phlebotomus* e *Sergentomyia*) e três gêneros para espécies do novo mundo (*Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileya*). Entre as 800 espécies reconhecidas atualmente (464 novo mundo e 375 no velho mundo) trinta espécies são vetores de transmissão comprovados os quais pertencentes a dois gêneros *Phlebotomus* (EUROPA) e *Lutzomyia* (AMERICA) (AKHOUNDI *et al.*, 2016; SOUZA; FRANCISCO; SANTOS, 2015; FARIA, 2014; SILVA, 2014).

No Brasil, existem atualmente seis espécies de protozoários responsáveis por causar doença em humanos sendo a principal espécie transmissora o *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis*, o qual é responsável pela transmissão da *L. chagasi* (GONTIJO; MELO, 2004; JUSI *et al.*, 2015; VASCONCELOS, 2015). A *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *cruzi* também é uma espécie bastante presente no Brasil em diversas regiões, principalmente no Mato Grosso (DUARTE, 2010) (Figura 2).

Os Flebotomíneos são insetos que possuem o corpo revestido de pelos de coloração clara, cor de palha, por isso são conhecidos popularmente como mosquito-palha. São animais pequenos medem de 1 a 3 mm de comprimento possuem grandes asas pilosas orientadas para trás e para cima, cabeça flexionada para baixo e longos palpos maxilares. Ao voar esses animais deslocam-se em pequenos saltos e pousam com as asas entreabertas. Durante a fase larval o seu desenvolvimento ocorre em ambientes terrestres úmidos, ricos em matéria orgânica e de baixa incidência luminosa (NASCIMENTO, 2014).

Figura 2- *Lutzomyia* vetor de transmissão da Leishmaniose



A imagem mostra um flebotomíneo responsável pela propagação da doença parasitária transmitida por protozoários do gênero *Leishmania*.

Fonte: Centers for Disease Control and Prevention, 2018b

Inicialmente, as espécies de flebotomíneos, encontradas em áreas endêmicas do Brasil, eram tidas como silvestres, pois eram encontradas, sobretudo em regiões florestais, com umidade e temperatura, que eram favoráveis a sua manutenção. Porém com o aumento da urbanização, sua aproximação dos limites das florestas e o desmatamento de zonas florestais ao redor das médias e grandes metrópoles, assim como, a aproximação de animais silvestres reservatórios, para próximo das cidades. Esses fatores levaram a uma adaptação e deslocamento do vetor e do agente etiológico que passaram a residir em áreas urbanas e periurbanas contribuindo para a expansão da leishmaniose canina e humana (ARAÚJO *et al.*, 2015; BALANCO, 2004).

2.4.2 Hospedeiro

Os hospedeiros vertebrados naturais da *Leishmania* são mamíferos pertencentes às ordens: Edentata (tatus e preguiças), Carnivora (cães e gatos), Rodentia (ratos), Primata (humanos e macacos), Marsupialia (gambás) e Perissodactyla (cavalos) (DANTAS-TORRES, 2007; LIMA *et al.*, 2016). Com destaque ao cão doméstico (*Canis familiaris*), o qual tem sido encontrado naturalmente infectado pelas

seguintes espécies de *Leishmania*: *L. (L.) infantum*, *L. (L.) donovani*, *L. (L.) tropica*, *L. (L.) chagasi*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) peruviana* (SOUSA; FRANCISCO; SANTOS, 2015).

A infecção em cães antecede o aparecimento de casos em humanos, o que mostra a associação direta do animal com a infecção em humanos sendo considerado um importante reservatório doméstico da doença. No Brasil, os principais reservatórios silvestres são a raposa (*Dusicyon vetulus*) no Ceará, e o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), no estado do Pará e em Minas Gerais (DUARTE, 2010).

2.5 CICLO DE VIDA DO PARASITA

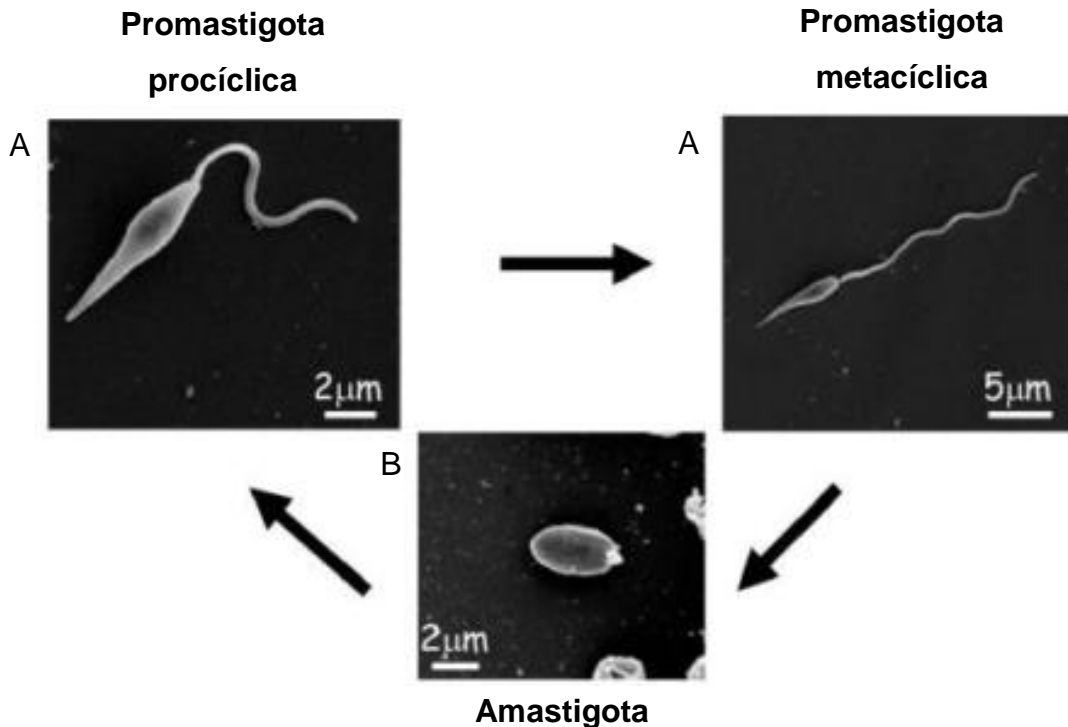
As leishmanias são parasitas que apresentam três formas evolutivas básicas durante o seu ciclo de vida: amastigotas, paramastigotas e promastigotas (MARTINS *et al.*, 2015). As amastigotas são responsáveis por parasitar o sistema fagocítico-mononuclear de mamíferos, elas vivem, principalmente, no interior de células fagocitárias: células de defesa e células apresentadoras de antígenos como as células de Langherans, dendríticas e granulócitos (SOUZA *et al.*, 2013; VASCONCELOS, 2015). Possuem uma forma oval ou esférica com membrana citoplasmática, internamente pode ser verificada a presença de vacúolos; núcleo; cinetoplasto e uma bolsa flagelar contendo um rudimento de flagelo (sem flagelo livre). Seu tamanho varia entre as espécies, medindo entre 3,0 a 6,5 µm de comprimento e de 1,5 a 3,0 µm de largura (SOUSA, 2014) (Figura 3).

As formas paramastigotas, conhecidas também como promastigotas procíclica são formas intermediárias, que parasitam o inseto ficando aderidas ao epitélio do trato digestivo dos flebotomíneos pelo flagelo. São muito parecidas com as formas promastigotas, apresentando como diferença o fato de serem mais arredondadas e com cinetoplasto próximo ao núcleo. Seu tamanho varia entre 5,0 e 10,0 µm de comprimento e 4,0 e 6,0 µm de largura (NEVES *et al.*, 2011).

Por fim, a terceira forma são as promastigotas ou promastigotas metacíclicas, são as formas livres que se diferenciaram pelo processo de metaciclogênese até atingirem o estágio infectivo terminal, originando as promastigotas infectivas e são encontradas na porção anterior do aparelho digestivo dos vetores

(MEDEIROS; NASCIMENTO; HINRISCHSEN, 2005). Elas possuem morfologia alongada com flagelo livre na região anterior, que permite sua locomoção, seu núcleo é semelhante ao das formas amastigotas. O tamanho varia entre 10,0 e 40,0 μm de comprimento, por 1,5 a 3,0 μm de largura (NEVES *et al.*, 2011) (Figura 3).

Figura 3- Principais formas evolutivas do parasita



A- Formas Promastigotas evolutivas de *Leishmania* sp. encontradas no trato digestivo do hospedeiro invertebrado (procíclica e metacíclica) e B- Forma Amastigota presente no hospedeiro vertebrado.
Fonte: Nascimento, 2014.

A manutenção do ciclo de vida do protozoário se dá através da transmissão entre os invertebrados e os vertebrados, ou seja, das formas promastigotas e amastigotas. A infecção começa quando o vetor inocula formas promastigotas metacíclica (forma infectante) através da pele do hospedeiro, no momento do repasto sanguíneo (FERNANDES, 2016; MONTEIRO, 2014). Após cada novo repasto sanguíneo, os músculos responsáveis pela sucção relaxam provocando o refluxo das formas promastigotas, infectando um novo hospedeiro (NASCIMENTO, 2014).

2.5.1 Ciclo biológico no hospedeiro invertebrado e vertebrado

O ciclo biológico do protozoário no hospedeiro invertebrado tem início após o repasto sanguíneo, quando os macrófagos infectados são capturados pelo flebotomíneo. Em seguida, a forma amastigota passa a se reproduzir intensamente por divisão binária se transformando em promastigotas procíclicas. Essas formas juntamente com o sangue ingerido, vão se localizar no intestino médio do inseto, protegidas pela matriz peritrófica, que é composta de proteínas e quitina secretadas pelo endotélio do vetor (FERNANDES, 2016; MONTEIRO, 2014). O processo de diferenciação e divisão continua e os parasitas se diferenciam agora nas formas promastigotas nectomonas (formas migratórias), que se acumulam na região anterior da matriz (MARTINS, 2011; NASCIMENTO, 2014).

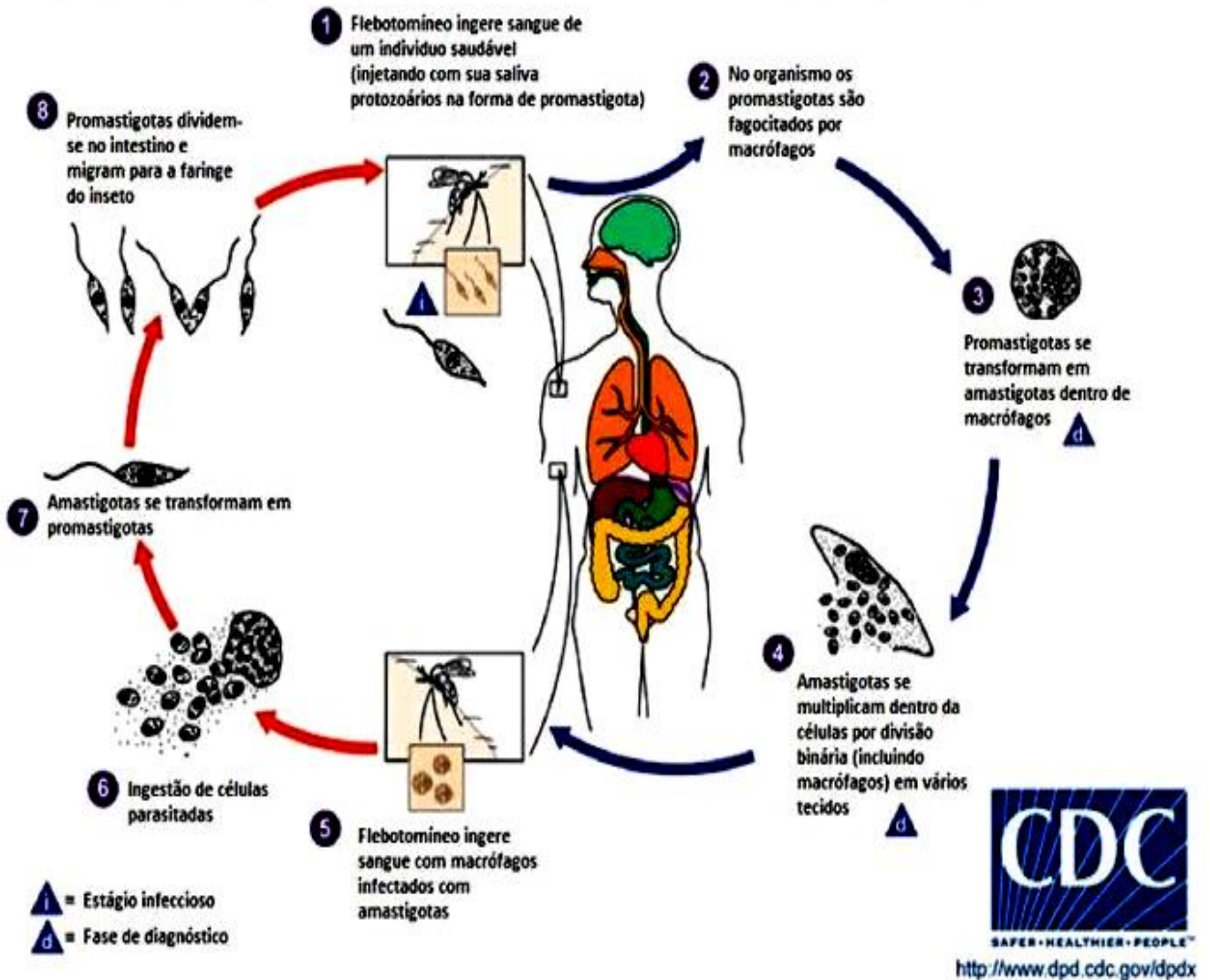
Em seguida, a matriz peritrófica se degenera e as promastigotas migram para o segmento anterior do tubo digestivo onde sofrem mais divisões e diferenciação formando agora as formas leptomonas, que são menores e se dividem mais rapidamente. Essas formas migram para a região do esôfago, faringe e válvula estomodeal onde se diferenciam até se transformarem em promastigotas metacíclicas. A forma metacíclica não se divide e é a forma infectante para o hospedeiro vertebrado. Esse processo de divisão e diferenciação (3-5 dias), é chamado de metaciclogênese e ocorre no interior do tubo digestivo do vetor (MARTINS, 2011; NASCIMENTO, 2014) (Figura 4).

No hospedeiro vertebrado as formas promastigotas metacíclicas infectam rapidamente as células do sistema fagocítico mononuclear (macrófagos), que são atraídos pela reação inflamatória, presente no local da picada. Ao ocorrer a fagocitose o fagossomo se funde com os lisossomos formando os fagolisossomos, que são vacúolos que possuem o ambiente intracelular em condições ácidas. Para se adaptarem as condições desse ambiente os protozoários transformem-se rapidamente, dentro de um período de 12 a 24 horas, em formas amastigotas que é a forma intracelular obrigatória do parasita (FERNANDES, 2016; NASCIMENTO, 2014).

Nessa forma o parasita é capaz de se desenvolver e se multiplicar intensamente por divisão binária simples. Após várias divisões ocorre o rompimento da célula infectada (lise celular) e a disseminação do parasita para o meio extracelular,

onde as formas amastigotas podem ser novamente fagocitadas por outras células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) dando continuidade a infecção (Figura 4).

Figura 4- Ciclo de vida do *Leishmania*



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention, 2018a.

2.6 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Dependendo da espécie de *Leishmania* que infecta o animal vertebrado, a interação entre a resposta imune do hospedeiro, a invasividade e a patogenicidade deste parasita, a manifestação da doença pode se desenvolver de 4 formas (imunopatologias) diferentes: 1) Leishmaniose Cutânea (LC); 2) Leishmaniose

Mucocutânea (LMC); 3) Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) e 4) Leishmaniose Visceral (LV) (COELHO *et al.*, 2016; PUROHIT *et al.*, 2012).

A **leishmaniose cutânea** (LC) caracteriza-se pela presença de lesões ulceradas que aparecem em áreas expostas, como face, braços e pernas, podendo ser localizada ou disseminada. Na primeira ocorre lesão única enquanto que na segunda ocorre a formação de numerosas lesões em várias partes do corpo (RODRIGUES, 2000). As lesões da LC começam formando uma área vermelha com posterior inchaço no local da picada. As lesões aumentam de tamanho, e depois de 3 a 4 semanas desenvolvem-se numa úlcera plana típica, com margem em relevo. As principais espécies causadoras da doença no Brasil são: *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* e *L. lainsoni*. (FONSECA, 2013b) (Figura 5A).

A **leishmaniose mucocutânea** (LMC) compreende as formas infiltrativas iniciais, ulcerosas, vegetantes e ulcero-vegetantes que após um intervalo assintomático de meses ou anos, as lesões podem destruir parcial ou totalmente as regiões de mucosa (FONSECA, 2013b). A LMC acomete as regiões da nasofaringe, laringe e cavidade oral. É de natureza metastática podendo ou não está acompanhada de quadro cutâneo (ASSIS *et al.*, 2008; JUSI *et al.*, 2015) (Figura 5B).

A **leishmaniose cutânea difusa** (LCD) caracteriza-se pela formação de lesões papulosas ou nodulares semelhantes às lesões de lepra lepromatosa (FONSECA, 2013b). As lesões são crônicas e distribuem-se amplamente na superfície corporal, são deformantes e muito graves. As lesões ulceradas variam de tamanho podendo medir 0,25 cm a 3,0 cm de diâmetro e manifestam-se com 15 dias ou depois de vários anos após a picada (RODRIGUES, 2000). O tratamento é difícil. A principal espécie causadora da doença no Brasil é: *L. amazonenses* (FONSECA, 2013b) (Figura 5C).

A **leishmaniose visceral** (LV) caracteriza-se por ataques irregulares de febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia (aumento do baço e fígado) e anemia. É classificada como a forma clínica mais grave da leishmaniose, devido às frequentes complicações que quando não tratada, podem levar o paciente a morte. A principal espécie causadora da doença no Brasil é a *Leishmania chagasi* (WHO, 2018b).

Figura 5- Manifestações clínicas da doença



Em (1) Leishmaniose cutânea, (2) Leishmaniose mucocutânea, (3) Leishmaniose cutânea difusa, (4) Leishmaniose visceral.

Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018.

2.6.1 Leishmaniose visceral

A forma mais grave da leishmaniose recebe a denominação de leishmaniose visceral (LV) também conhecida como calazar é geralmente uma doença sistêmica, crônica que afeta órgãos internos, baço, fígado e medula óssea, caracterizada por febre, esplenomegalia, perda de peso, astenia, anemia (AKHOUNDI *et al.*, 2016; ARAÚJO *et al.*, 2015; MARTINS *et al.*, 2016). A LV é causada por *Leishmania donovani* na Índia, Sudão, Bangladesh, Paquistão, Nepal e no leste da África; e por *L. chagasi* na região do Mediterrâneo, no Oriente Médio, no Norte da África, nos países asiáticos e na América latina (CHÁVEZ-FUMAGALLI *et al.*, 2013; SOUZA; FRANCISCO; SANTOS, 2015). Aproximadamente 90% dos casos de LV registrado no mundo ocorrem em cinco países: Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil (BARBOSA, 2016; GONTIJO; MELO, 2004, PEIXOTO; OLIVEIRA; ROMERO, 2015).

Atualmente, a LV é endêmica em 62 países e acredita-se que cerca de 200 milhões de pessoas vivem sob risco de contrair a doença (SOUZA; FRANCISCO; SANTOS, 2015; VASCONCELOS, 2015). Com um registro anual de 200-400 mil novos casos clínicos aproximadamente 90% dos casos, quando não tratado devidamente leva o paciente a morte, gerando uma média 20 á 30 mil óbito por ano (MARTINS *et al.*, 2016; PAHO/WHO, 2017; WHO, 2018a).

O principal agente etiológico da LV em humanos é o protozoário *Leishmania chagasi* (*sin. Leishmania infantum*) (JÚNIOR, 2011). No continente Americano a doença é endêmica em 12 países, porém a maior prevalência da doença está no Brasil, onde são registrados 96% dos casos e o número de mortes pela doença vem crescendo desde 2012. A taxa de mortalidade das Américas atingiu 7,9% em 2016, registrando a maior taxa em comparação com outros continentes (PAHO/WHO, 2018).

No Brasil, atualmente são registrados uma média de 4.200 novos casos de LV por ano com presença de focos endêmicos em 20 Unidades Federativas. Sendo a região Nordeste a que apresenta maior taxa de letalidade, atingindo uma média de 5,8% (ARAÚJO *et al.*, 2015; SOUZA, FRANCISCO, SANTOS, 2015; PEIXOTO, OLIVEIRA, ROMERO, 2015).

No Estado do Ceará, a doença encontra-se disseminada, entre 2008 a 2017 foram notificados 9.247 casos da doença e confirmados 5.312 (57,4%), gerando nesse período uma média anual de 531 casos confirmados. Dos municípios no estado do Ceará 175 (95,0%) confirmaram casos de LV durante este período. Fortaleza é o município com maior incidência de LV em humanos, já foram confirmados 1.984 (32,4%) casos e 125 (36,8%) óbitos. No ano de 2017, até o mês de novembro, 499 casos foram notificados e 191 confirmados no Estado (CEARÁ, 2011; JÚNIOR 2011; BRASIL, 2017a).

Na região norte, há uma alta incidência de LV ocorrendo em todo o estado de Tocantins em decorrência das modificações eco-epidemiológicas, como o intenso fluxo migratório (SOUSA, 2007). A região Sul, era considerada como a única região do país livre da doença, até o ano de 2008, quando o primeiro registro de LVC foi feito, no ano seguinte, ocorreu o primeiro caso em seres humanos, na cidade de São Borja, no Rio Grande do Sul (SOUZA *et al.*, 2013).

A LV pode ser considerada zoonótica, quando a transmissão ocorre do animal para o vetor e deste para o homem ou antroponótica quando a transmissão é do homem para o vetor e deste novamente para o homem (SOUZA; FRANCISCO; SANTOS, 2015). A forma de transmissão antroponótica ocorre apenas em países onde o agente etiológico é *Leishmania donovani* (FARIA; ANDRADE, 2012). No Brasil, a zoonose era considerada eminentemente rural, sendo mais frequente na região nordeste, a partir da década de 80 passou a ocorrer à expansão para áreas urbanas de médio e grande porte e para outras regiões que não eram consideradas endêmicas (SOUZA *et al.*, 2013).

Desde então, a transmissão da doença vem sendo descrita em vários municípios de todas as regiões do Brasil, se tornando um crescente problema de saúde pública no país e em outras áreas do continente americano (FONSECA, 2013b). Até o ano 2000 o Nordeste brasileiro era responsável por um registro de quase 90% dos casos, atualmente, com a expansão para outras regiões esse percentual diminuiu para 48% dos casos registrados no país (BRASIL, 2017b).

Essa expansão para outras áreas está, sobretudo, relacionada à importância do cão (*Canis familiaris*) na epidemiologia da doença, sendo considerado o principal reservatório no ciclo de transmissão da LV. Dessa forma a ampliação para áreas urbanas está relacionada com a presença de cães domésticos e o relacionamento próximo entre o homem e o animal infectado. Isso ocorre devido à alta susceptibilidade do cão para a infecção em áreas endêmicas e pelo intenso parasitismo de formas amastigotas na pele do animal, oferecendo assim alta capacidade de transmissão para os flebótomos (FARIA; ANDRADE, 2012; GARCIA *et al.*, 2017; MARTINS *et al.*, 2015; SHIRALI *et al.*, 2015; SOUZA; FRANCISCO; SANTOS, 2015).

Deste modo, a prevalência de LV em humanos está diretamente relacionada com a quantidade de cães infectados com LVC (SHIRALI *et al.*, 2015). Estes dados tornam a LVC o foco de vários estudos em virtude da importância do cão como animal doméstico e a sua relevância como reservatório da doença, principalmente porque o controle da doença em humano está diretamente relacionado ao controle da doença na população canina.

2.6.2 Leishmaniose visceral canina

Os cães infectados por *L. chagasi* (*syn. L. infantum*) de acordo com as características clínicas apresentadas podem ser classificados de três formas: assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos (MANCIANTI *et al.*, 1988). Os assintomáticos são cães com ausência de sinais clínicos característicos de infecção por *Leishmania*, porém apesar de aparentemente saudáveis esses animais são reservatórios ativos e contribuem para a disseminação da doença. Essa manifestação clínica é a forma mais comum da doença em cães, variando de 40 a 60% em uma população soropositiva (DUARTE, 2010; ISABEL, 2010).

Em oligossintomáticos ocorre a presença de até três dos sinais clínicos característicos da infecção. Já os cães sintomáticos são aqueles que apresentam mais de três sinais clínicos, como: alopecia, dermatite furfurácea, úlceras, hiperqueratose, onicogribose, emagrecimento, ceratoconjuntivite, adenopatia linfóide, opacificação das córneas e opacificação do pêlo (MANCIANTI *et al.*, 1988). No cão a doença também pode ser sistêmica e crônica podendo chegar a estágios graves quando ocorre intenso parasitismo podendo levar o animal ao óbito em poucas semanas (DUARTE, 2010).

Em regiões endêmicas a soroprevalência da LVC em animais varia entre 3,4% e 40% (cães sintomáticos e assintomáticos respectivamente). Os dados relacionados aos animais assintomáticos, cujo diagnóstico é mais difícil, mostram a importância da vigilância e intervenção da infecção, principalmente por esse ser o principal elo na transmissão da doença no homem (PEIXOTO; OLIVEIRA; ROMERO, 2015). No estado do Ceará foram 47.117 animais soro reagentes para LVC entre 2014 e 2017 com uma média de percentual de animais positivos de 9,6% (BRASIL, 2017a).

PARTE II

2.7 BIOTECNOLOGIA

O termo biotecnologia foi criado pelo engenheiro húngaro Karl Ereky em 1919, e oficialmente aceito em 1992 na Convenção sobre Diversidade Biológica (FERRO, 2010). A Biotecnologia é definida como uma área de aplicação da biologia para fins tecnológicos e comerciais ela permite o uso da matéria prima biológica na geração de produtos, processos e serviços capazes de agregar valor, renda e bem-estar a população (RAMOS; MELO; SILVA, 2016). Apesar de a aplicabilidade ser algo recente seu uso vem de técnicas milenares usadas na produção de cerveja e pão, iniciada no antigo Egito entre 4.000-2.000 a.C, bem como, na produção de queijo e de vinhos (FERRO, 2010).

Atualmente, a biotecnologia é uma ciência profundamente orientada pelo método científico. Sua introdução e aplicabilidade ganhou força a partir da década de 50, quando foi feitas importantes descobertas científicas, que posteriormente passariam a ser a base dessa ciência. A primeira delas se deu a partir dos estudos feitos por Alfred Hershey e Margaret Chase, em 1952, levando a conclusão de que o DNA era a molécula portadora das informações genéticas presentes nas células (RAMOS; MELO; SILVA, 2016).

Em 1953, outra importante descoberta veio com os relatos feitos por James Watson e Francis Crick, sobre os aspectos fundamentais da molécula do DNA, eles determinaram que a estrutura do DNA era formada por uma dupla hélice em forma de escada retorcida. Além disso, mostraram também que essa molécula era formada por bases complementares sendo que as sequências dessas bases era uma forma de informação genética e que essa complementaridade entre as bases poderia ser importante nas replicações (WATSON; CRICK, 1953).

A descrição da estrutura do DNA foi apenas o primeiro passo de uma longa caminhada. Pois a evolução da biotecnologia se deu de um processo com importantes fatos científicos incorporados a biologia ao longo dos últimos anos. Todas essas descobertas proporcionaram um avanço muito rápido da tecnologia de DNA

recombinante, conhecida como engenharia genética. A tabela 1 trás os principais acontecimentos científicos que contribuíram no avanço da engenharia genética.

Tabela 1 – Principais acontecimentos que contribuíram para os avanços na engenharia genética

ANO	PRINCIPAIS ACONTECIMENTOS NA ENGENHARIA GENÉTICA
1955	Purificação e caracterização da DNA polimerase de <i>Escherichia coli</i> por Arthur Kornberg (LEHMAN <i>et al.</i> , 1958)
1960	Foi descoberto as funções biológicas das endonucleases de restrição por Werner Arber (ARBER, 1978)
1966	O código genético foi decifrado por Marshall Nirenberg e H. Gobind Khorana (GOLDBERG; WITTES, 1966)
1970	Foi descoberta a enzima transcriptase reversa por Howard Temin e David Baltimore (TEMIN; BALTIMORE, 1972)
1973	Foi produzida a primeira molécula de DNA recombinante por Stanley Cohen e Herbert Boyer (COHEN, <i>et al.</i> , 1973)
1977	Ocorreu a primeira aplicação da engenharia genética através da produção de hormônio de crescimento humano em bactérias (MARTIAL <i>et al.</i> , 1979)
1982	Foi produzido o primeiro produto comercial advindo do uso da tecnologia do DNA recombinante (insulina humana) (WILLIAMS, <i>et al.</i> , 1982)
1983	Foi descrito o processo de amplificação de DNA a partir da reação em cadeia de polimerase (PCR) por Kary Mullis (MULLIS, 1990)
1990	As vacinas de DNA foram descritas, após a inoculação de plasmídeo contendo genes que codificavam a beta-galactosidase, obtendo assim a expressão do mesmo no músculo de camundongos (WOLFF <i>et al.</i> , 1990)
1995	Os primeiros alimentos transgênicos passam a serem comercializados nos EUA (DALE, 1995)
1996	A ovelha Dolly é o primeiro mamífero clonado (Keith Campbell e Ian Wilmut) (CAMPBELL <i>et al.</i> , 1996)
1997	<i>Escherichia coli</i> foi sequenciada (BLATTNER <i>et al.</i> , 1997)

2001	Nasce o primeiro primata transgênico (WOLFGANG <i>et al.</i> , 2001)
2003	O sequenciamento do genoma humano é finalizado (MUNGALL <i>et al.</i> , 2003)

Fonte: Elaborada pelo autor

O avanço da engenharia genética se deu principalmente após a década de 70 com a descoberta da enzima de restrição (capaz de reconhecer uma pequena sequência de pares de bases e cortar o DNA nesse sítio específico) e da enzima de ligação (capaz de ligar dois fragmentos de DNA) que permitiu recombinar o DNA inserindo sequências de outro DNA, promovendo a introdução de genes específicos que não seria possível através do cruzamento sexual (LIRA, 2016).

Essa nova tecnologia permitiu o surgimento da indústria da biotecnologia tornando possível que proteínas de interesse terapêutico ou comercial fossem produzidas e comercializadas. Na área da saúde a engenharia genética trouxe contribuições ao ter suas técnicas aplicadas na realização de diagnósticos mais rápidos e precisos, na produção de vacinas, anticorpos, biofármacos, terapia gênica e celular entre outras (GIBSON *et al.*, 2010).

A engenharia genética permitiu o desenvolvimento de anticorpos monoclonais e anticorpos policlonais, uma ótima escolha para uso em diagnóstico, pois possuem alta especificidade podendo detectar com precisão antígenos específicos (LIRA, 2016). A produção e uso de proteínas recombinantes nesse setor tem levado a resultados bastante satisfatórios impulsionando a busca por novas proteínas ou proteínas mais eficazes (DE ABREU *et al.*, 2014).

2.8 PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Na natureza os níveis de expressão de muitas proteínas, geralmente são muito baixos, não sendo suficiente para uso em estudos estruturais e funcionais nem para os setores industriais, fazendo-se necessário a expressão amplificada de proteínas recombinantes. Além disso, as proteínas recombinantes são consideradas excelentes antígenos para uso no diagnóstico de campo, porque são facilmente

adsorvidos em várias superfícies, o que facilita seu uso e produzem resultados reprodutíveis, o que aumenta a confiabilidade de testes (TRAVI *et al.*, 2018).

As técnicas empregadas na engenharia genética permitiu a produção de proteínas recombinantes em grande escala, tornando sua utilização indispensável em diferentes setores: na indústria, na pesquisa e no desenvolvimento de novos medicamentos e kits de diagnósticos (ANNÉ; ECONOMOU; BERNAERTS, 2016). A codificação de proteínas recombinantes pode ser feita em vários sistemas de expressão utilizando diferentes organismos como bactérias, fungos filamentosos, leveduras, algas unicelulares e células de insetos e mamíferos. Dentre estes organismos, a mais amplamente usada é expressão em bactéria utilizando a *Escherichia coli* (MERLIN *et al.*, 2014).

Cada hospedeiro tem vantagens e desvantagens e sua escolha depende diretamente da proteína de interesse. O uso da *E.coli* na expressão de proteínas recombinante se dá por esse ser um organismo de fácil acessibilidade e manuseio, com crescimento rápido e alta produtividade, baixo custo, além de ser um organismo simples com a genética, fisiologia e metabolismo bem caracterizado, o que facilita a manipulação genética, permitindo a expressão de proteínas recombinantes, incluindo proteínas de membrana (AHMAD *et al.*, 2017).

Teoricamente, a produção de proteína recombinante em *E. coli* é relativamente direta, começa pela identificação do alvo, clonagem do gene em um vetor, transformação em uma cepa hospedeira adequada, indução para expressão amplificada e depois a purificação e caracterização de proteínas.

2.9 SISTEMAS DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS

2.9.1 Expressão em sistema procarioto

O avanço da biologia molecular permitiu à produção de proteínas (heterólogas) em diferentes organismos, como alternativa a extração de proteínas originais que normalmente apresentam concentrações baixas e níveis de pureza insuficientes para eliminar contaminações tóxicas, pirógenas ou infecciosas (LIMA, 2013).

Com isso, uma técnica amplamente empregada é a utilização de cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) como produtoras de proteínas heterólogas (DE ABREU *et al.*, 2014). No entanto, essa síntese não é natural do microrganismo, em questão, podendo levar a um estresse metabólico e instabilidade do plasmídeo, desencadeando respostas celulares que podem afetar a produção da proteína de interesse (BONOMO *et al.*, 2015; COSTA, 2016).

Dessa forma, para a obtenção dessas proteínas na conformação correta, em estado solúvel e ativo se faz necessário um planejamento correto da sua produção. “Identificação e localização do gene de interesse, inserção do gene alvo num vetor adequado, introdução do vetor no hospedeiro, seleção de células transformantes e multiplicação/expressão do gene escolhido no hospedeiro” são as principais fases desse processo (LIMA, 2013). Além disso, as condições de cultivo como temperatura, pH, velocidade de agitação, composição do meio de cultura, tipo de indutor empregado, concentração de nutrientes, técnicas de cultivo e condições de aeração são fatores que também afetam diretamente a síntese proteica (BONOMO *et al.*, 2015, COSTA, 2016).

A *E. coli* é uma bactéria gram-negativa, envolvida por uma membrana externa contendo lipopolissacarídeos que é uma fonte de endotoxinas e também impede a secreção de proteínas no ambiente extracelular (ANNÉ; ECONOMOU; BERNAERTS, 2016). A temperatura ótima de crescimento da *E. coli* é a 37 °C, essa é a temperatura corporal de muitos mamíferos, que são normalmente hospedeiros para a *E. coli*, favorecendo seu crescimento (NGUYEN, 2006). Em temperaturas muito altas como a 45 °C esse crescimento é inibido e algumas características fenotípicas normais da bactéria são podem ser desabilitadas (NOOR *et al.*, 2013). Além disso, alguns promotores podem ser sensíveis se tornando instáveis a temperaturas mais altas do que 37 °C (ROSANO, CECCARELLI, 2014).

Assim como a temperatura o pH também é um fator importante para o crescimento bacteriano podendo influenciar positivamente ou negativamente na obtenção de proteínas recombinante. O meio de cultura com pH ácido gera estresse as células podendo ocasionar a perda do plasmídeo. O ideal é ter um meio tamponado que seja capaz de manter o pH estabilizado entre 6,5 - 7,5, uma vez que a *E. coli* produz ácido acético o que favorece a acidez do meio (WANG *et al.*, 2014). Além disso,

uma boa aeração é necessária para expressão de mais de 200 genes e manutenção e um crescimento acentuado (10 vezes mais), a manutenção de um alto crescimento celular se dá na presença de componentes em concentrações ótimas para evitar inibição durante o crescimento e a formação de complexos insolúveis (COSTA, 2016).

As principais vantagens do uso da *E. coli* para a síntese de proteínas recombinantes dá-se em virtude da facilidade de manipulação genética, cultura de baixo custo, crescimento rápido e alto nível de expressão (HUANG; LIN; YANG, 2012). No entanto o uso da *E. coli* como sistema de expressão possui algumas limitações.

A incapacidade de realizar modificações pós-tradicionais, comum em eucariotos e que podem ser essenciais para a obtenção de proteínas ativas e/ou complexas; ausência de um sistema de secreção capaz de liberar a proteína recombinante para o meio de cultura; e a facilidade de formação de corpos de inclusão. Além disso, a produção no citoplasma da bactéria de proteínas contendo ligações dissulfureto é um desafio (DE ABREU *et al.*, 2014; HAN *et al.*, 2018; LIMA, 2013).

O tamanho da proteína e os limites do domínio são outros fatores que influenciam na síntese proteica, de forma que, a probabilidade de expressão da proteína diminui com o aumento do peso molecular. Essas desvantagens podem dificultar a produção de proteínas em *E. coli*.

2.9.2 Expressão em Sistema Eucarioto

A substituição de fontes nativas de produção de proteínas por sistemas recombinantes microbianos foi bastante utilizada por questão de economia e segurança. Porém as desvantagens e limitações surgidas com o uso desse sistema; associado a busca constante por testes de diagnósticos mais rápidos, com um menor custo e que possam ser aplicados em larga escala, tem proporcionado o aumento de investimentos para o desenvolvimento de pesquisas que buscam novos sistemas de expressão a fim de obterem melhores resultados (AMARO, 2009).

As plantas sempre foram uma importante fonte de várias moléculas com propriedades medicinais e nutritivas para o homem. Nas duas últimas décadas a biotecnologia tem investido no uso delas como uma plataforma eficiente com vantagens para a produção de proteínas recombinantes (BEIHAGHI *et al.*, 2018).

A utilização desse sistema teve início a partir da descoberta da *Agrobacterium* e de suas habilidades em transferir DNA plasmídial. Essa característica permitiu que Fraley e colaboradores fizessem a primeira planta transgênica em 1983. Os resultados advindos dos testes em plantas transgênicas levaram ao aprimoramento da técnica e o seu amplo uso dentro da biotecnologia. Desde então, muitas outras proteínas humanas foram expressas utilizando sistema de planta (SOUZA, 2014). Além disso, as plantas formam um sistema capaz de produzir eficientemente certas proteínas humanas, tais como reguladores do crescimento e inibidores do ciclo celular (PECONICK, 2010).

O uso de um sistema vegetal permite a introdução de genes que tenham necessidades de serem expressos em grandes quantidades ou que contenham propriedades medicinais (MADEIRA, 2008). Estima-se que essas proteínas possam ser produzidas por esse sistema com uma redução de 10 - 50%, pelo menos, ao custo final quando comparado ao sistema bacteriano (BONNET, 2010). O hormônio do crescimento humano foi a primeira proteína produzida no setor farmacêutico em plantas, expresso em tabaco transgênico em 1986 por Barta e colaboradores (1986).

A utilização de planta nesse processo tem como vantagens possuir maquinaria de processamento pós-tradicionais necessária para a atividade de proteínas eucarióticas complexas, como as encontradas em mamíferos, garantindo expressão eficiente de uma diversidade de proteínas para prevenção, diagnóstico e terapias. Possui uma ampla flexibilidade em relação à escala, custo, segurança e atividades regulatórias, não produzem endotoxinas, não carregam víruses, patógenos ou oncogênese humanos, sendo mais segura. Com um menor risco de contaminação gera menos custos com processos de purificação e descontaminação (AMARO, 2009; SOUZA, 2014; MERLIN *et al.*, 2014).

Dessa forma, tem-se buscado produzir diversas proteínas comerciais através do sistema de expressão em vegetal como, anticorpos, antígenos, fatores sanguíneos, citosinas, fatores de crescimento, hormônios, enzimas e vacinas. Tiwari *et al.* (2009), faz uma revisão mostrando diversos trabalhos que produzem antígenos vacinais em plantas. Esses antígenos produzidos em planta têm se mostrado bastante promissores, não só pela capacidade de expressão eficiente de proteínas e diversas moléculas, mas

principalmente, porque em estudos clínicos de fase 1, esses antígenos têm se apresentado mais seguros e com alta capacidade de induzir resposta imunológica. Outro fator importante é a alta taxa de produção que é determinada sobre: a espécie de planta escolhida, a construção do cassete de expressão e o tipo de transformação aplicada (MADEIRA, 2008; TIWARI *et al.*, 2009).

Com o avanço e a ampla utilização desse sistema muitas pesquisas se empenham no aperfeiçoamento de técnicas metodológicas para a transformação eficiente das plantas com genes recombinantes. Existem várias técnicas de transformação em planta: as transformações diretas podem ser na forma de biobalística, eletroporação ou microinjeção; e as indiretas consistem no uso de um vetor capaz de intermediar a transferência do DNA (LIRA, 2016).

As técnicas mais utilizadas são a transformação indireta do genoma da planta, através da utilização de *Agrobacterium* (KLAFKE, 2010; MADEIRA, 2008), que consiste de um sistema com alta eficiência de transformação, baixo custo operacional, simplicidade na realização dos protocolos e a utilização de vírus recombinantes, cuja estratégia é infectar plantas com vírus que expressem os transgenes durante sua replicação no hospedeiro (AMARO, 2009).

A escolha da técnica que será utilizada deve levar em consideração a espécie a ser transformada, o tipo da célula ou tecido utilizado, a capacidade de regeneração e a disponibilidade de materiais (LIRA, 2016). Segundo Amaro (2009) o método ideal de transformação deve combinar: descontaminação do tecido infectado pela bactéria; seleção das células que foram transformadas e que expressam o gene marcador e regeneração dessas células em plantas. O tipo de expressão da proteína heteróloga pode ser dividido, em dois grupos: os de expressão estável (plantas transgênicas) e os de expressão transiente (plantas infectadas por vetor viral vegetal e plantas agroinfiltradas) (BONNET, 2010).

O sistema de transformação transiente denominado *Agrobacterium tumefaciens transient assay* (ATTA), permite a transformação indireta do vegetal através do uso de uma suspensão de *Agrobacterium* contendo um plasmídeo. Essa suspensão é infiltrada na folha da planta por meio de uma seringa ou sistema a vácuo. Toda a parte aérea da planta pode ser infiltrada e o tecido pode ser coletado para

análise após 3-6 dias, devido às vantagens de ser um método econômico, simples e rápido, esse sistema é bastante usado para verificar a funcionalidade de cassetes de expressão e para validar funcionalidade das proteínas recombinantes (BEIHAGHI *et al.*, 2018; MADEIRA, 2008).

As agrobactérias são organismos aeróbicos, gram-negativos que possuem a forma de bastão e são tipicamente encontrados no solo. O gênero *Agrobacterium*, pertencente à família Rhizobiaceae, está subdividido em cinco espécies que diferem entre si pela patogenicidade e pelo modo de infecção em diferentes plantas (AMARO, 2009; KLAFKE, 2010). A espécie *A. tumefaciens* é o agente etiológico da galha-da-coroa, doença que causa crescimentos celulares neoplásicos (tumores) em tecidos vegetais (KERN, 2003). Mais de 600 espécies vegetais são conhecidas como suscetíveis à infecção por *A. tumefaciens* tornando-a um eficiente mecanismo de transformação principalmente em plantas dicotiledôneas (KLAFKE, 2010).

A infecção pela agrobactéria inicia através de uma lesão sofrida pela planta, onde nessa lesão as moléculas-sinais (acetoseringona) liberadas pelas células lesionadas atraem a agrobactéria permitindo sua penetração. Essas moléculas-sinais também são responsáveis pela ativação de genes que estão localizados no plasmídeo Ti (Indução de Tumor), formado por uma fita dupla de DNA, com cerca de 200 kb que promove a transferência de genes específicos de DNA (DNA de transferência ou T-DNA) da bactéria para a célula vegetal, permitindo sua expressão na célula hospedeira. Esses genes são delimitados por duas sequências repetidas de 25 pb, conhecidas como extremidades direita e esquerda. No plasmídeo Ti está presente também uma região de virulência chamada região *Vir* que é composto de seis a oito *operons*, os quais codificam diversas proteínas que vão promover essa transferência e são responsáveis pela virulência das agrobactérias (AMARO, 2009; PITZSCHKE, 2013; SUBRAMONI *et al.*, 2018).

A região *Vir* processa o T-DNA do plasmídeo, produzindo uma molécula de fita-simples de T-DNA (também chamada de fita-T). A fita-T chega ao citoplasma da planta por um canal de transporte (formado por proteínas *virD4* e *virB*). Dentro da célula ela se liga a uma molécula *virD2* na extremidade 5' fosfato e outras proteínas *virE2* formando um complexo de transporte (complexo-T) que é encaminhado para o interior

do núcleo da célula vegetal onde ocorre a integração do genoma da bactéria ao genoma vegetal e expressão de maneira estável (KERN, 2003; GELVIN, 2005).

Para a infecção de plantas são necessárias apenas as duas extremidades direita e esquerda, assim os genes que causam a proliferação celular podem ser removidos e genes de interesse podem ser inseridos em seus lugares permitindo a expressão de bactérias heterólogas (AMARO, 2009).

Além disso, o T-DNA do plasmídeo Ti é transferido para um segundo plasmídeo (plasmídeo binário) facilitando a manipulação dos genes e tornando estas bactérias incapazes de produzir os sintomas patológicos. Para isso deve ser eliminado do T-DNA os genes codificadores de enzimas sintetizadoras de reguladores de crescimento vegetal e de opinas (KERN, 2003). Um gene marcador pode ser acrescentado a esse conjunto para identificar células ou tecidos da planta que tenham integrado com êxito o gene de interesse (PECONICK, 2010).

A escolha correta da planta é um importante fator para se obter sucesso na produção de proteínas recombinantes (KLAFKE, 2010). Devendo ser observado aspectos biológicos como o ciclo de vida, o rendimento relacionado à biomassa, fatores geográficos, fatores relacionados à especificidade de cada espécie, acúmulo e qualidade na produção das proteínas recombinantes (SOUZA, 2014).

Dessa forma, a escolha pelo uso da *Nicotiana benthamiana* se dá por essa ser uma espécie vegetal pertencente à família Solanaceae sendo uma das plantas mais utilizadas em estudos de virologia em vegetal, principalmente por ser suscetível à infecção de diversas espécies de vírus e outros agentes patogênicos (como bactérias, oomicetos, fungos, etc.) (GOODIN *et al.*, 2008). Essa suscetividade está relacionada a uma mutação no RNA dependente de RNA polimerase (RDRP1) que reduz a sua eficiência de silenciamento gênico, tornando-a uma espécie modelo em pesquisas de relações entre hospedeiro-patógeno no contexto de imunidade inata e defesa (GOODIN *et al.*, 2008; SOUZA, 2014).

O fumo *N. benthamiana* tem ganhado popularidade na biologia vegetal principalmente sobre localização e proteínas ou sistemas baseados em plantas para a expressão e purificação de proteínas (GOODIN *et al.*, 2008). A *N. benthamiana* é bastante utilizada na transformação transiente por possuir uma elevada eficiência de

transferência de T-DNA (~100%) em células do mesófilo. Elas possuem folhas de fácil infiltração que podem produzir altas quantidades de proteínas em resposta a agroinfiltração (BONNET, 2010).

Essas características tornam a espécie uma das mais apropriadas nos processos de transformação e expressão transiente em sistema vegetal e um forte candidato para produção comercial devido ao grande acúmulo de biomassa por hectare (SOUZA, 2014).

Porém, apesar do sistema vegetal ser considerado uma plataforma promissora para a produção de proteínas de interesse a purificação e a extração das proteínas dos tecidos vegetais tem sido relatada como os principais obstáculos na utilização de plantas como biorreatores (KLAFKE, 2010). Outra desvantagem encontrada é a instabilidade do produto recombinante produzido em folhas, podendo levar a formação de corpúsculos ou corpos de inclusão e devido esse ser um ambiente altamente concentrado de água, o tecido deve ser congelado ou liofilizado para o transporte (BONNET, 2010; MADEIRA, 2008).

Novos estudos estão sendo realizados para aprimorar e desenvolver soluções que minimizem essas desvantagens buscando o aperfeiçoamento e a viabilidade desse sistema vegetal para a produção de proteínas recombinante (SOUZA, 2014).

2.10 PROTEÍNAS RECOMBINANTES DA LEISHMANIA

O uso de técnicas laboratoriais modernas e mais recentemente o aperfeiçoamento de técnicas moleculares, como rastreamento de biblioteca de expressão de genes tem permitido a identificação de diversos antígenos recombinantes proteicos e/ou glicídicos como o citocromo C oxidase, rKLO8, rLbHyM , rHSP83, rA2, hsp70, GP63, LACK, LeiF, A2, k39, k26 entre outros. Esses antígenos são estudados com o propósito de se buscar proteínas de *Leishmania* capazes de estimular a resposta humoral nos hospedeiros infectados ou que possam apresentar respostas contra proteínas do parasita, permitindo assim, que sejam utilizados na prevenção e no diagnóstico da leishmaniose canina e humana (DIAS *et al.*, 2018; ROZENDO *et al.*, 2014).

Na busca por antígenos promissores, que consigam ser reconhecidos por soros de indivíduos infectados, e que permitam distinguir pacientes tratados de não tratados, o antígeno rk39 de *L. infantum* tem se destacado em diversos estudos. Os resultados promissores por ele apresentado permitiu que esse antígeno saísse do ambiente acadêmico e passasse a ser altamente utilizado na área clínica sendo considerado o mais promissor para uso no diagnóstico da LV (MAGALHAES *et al.*, 2017; TRAVI *et al.*, 2018).

O antígeno K39 é uma proteína conservada que está presente em sete espécies de *Leishmania* (VENTURIN *et al.*, 2015). Essa proteína possui peso molecular de 37 kDa e está localizada no DNA do cinetoplasto de *Leishmania*, sendo parte de uma proteína de 230 kDa da família Kinesina. O antígeno rK39 é uma proteína recombinante clonada do antígeno K39 da região quinase de *L. chagasi* (*L. Infantum*) do complexo donovani-específico (LEMOS *et al.*, 2003; LIMA, 2009). Apresenta uma sequência de 39 aminoácidos repetitivos conferindo a esta proteína epítomos de alta densidade e identidade específica com as espécies viscerotrópicas de *Leishmania* principalmente das espécies *L. Donovanii* e *L. Infantum* sendo expressa predominantemente em formas amastigotas (BURNS *et al.*, 1993; VENTURIN *et al.*, 2015).

Para se obter uma proteína recombinante as principais etapas são: isolar o gene de interesse, escolher o sistema de expressão (bactéria, planta), clonar e expressar a proteína (MIYAMOTO, 2013).

2.11 DIAGNÓSTICO

A LV pode ser zoonótica ou antroponótica, em países onde a LV é caracterizada como sendo zoonótica, como é o caso do Brasil, os cães domésticos apresentam papel fundamental na transmissão e manutenção da epidemiologia.

As principais medidas preconizadas pelo Ministério da Saúde (MS) para controle da LV são: 1) diagnóstico precoce e tratamento adequado dos casos humanos; 2) utilização de medidas para controle e combate ao inseto vetor; 3) eliminação de cães infectados através da eutanásia (reservatório da doença); 4) atividades em educação em saúde (BRASIL, 2006).

O tratamento de cães não é uma medida recomendada pelo Ministério da Saúde, uma vez que, mesmo tratados os animais continuam sendo reservatórios do parasito em seus organismos, contribuindo para sua transmissão aos insetos vetores. Além disso, o uso rotineiro dessas drogas no tratamento pode contribuir para o surgimento de protozoários resistentes. A resistência do parasita as drogas (que são poucas) torna o tratamento em humano mais difícil aumentando o número de óbitos (GONTIJO; MELO, 2004).

Dessa forma, uma das principais medidas para controle da doença ainda é a eutanásia dos cães positivos. Para se ter a eliminação de reservatórios infectados é necessário o diagnóstico eficiente do animal, a fim de evitar a eutanásia desnecessária de cães e a permanência de animais infectados. A detecção precoce de cães infectados é fundamental para o controle e expansão da doença, já que o cão doméstico é o principal reservatório da *Leishmania* (FARIA; ANDRADE, 2012; MONTEIRO, 2014; NÓBREGA, 2014).

No entanto, o diagnóstico precoce é o principal desafio na LVC. Atualmente, as medidas preconizadas pelo sistema de saúde são de difícil execução e de alto custo, o que dificulta a manutenção dessas medidas de forma sistemática e por longos períodos. Tudo isso contribui para que a eliminação de animais soropositivos ocorra tardiamente ou de modo ineficaz, além disso, a maioria dos cães infectados apresenta-se assintomáticos, mascarando a doença e dificultando o diagnóstico (BAGUES, 2016; ROCHA, 2012).

Atualmente, diferentes técnicas podem ser aplicadas no diagnóstico da LVC, porém nenhuma das técnicas apresenta 100% de sensibilidade e especificidade (MONTEIRO, 2014). A ausência de um antígeno altamente específico e de fácil execução é o maior desafio e a principal meta a ser alcançada para se ter diagnóstico preciso da LVC. A sua ausência tem subestimado o número de cães infectados o que contribui para a manutenção da doença (FARIA; ANDRADE, 2012).

A complexidade e diversidade biológica da própria infecção também contribuem para a dificuldade de um diagnóstico eficaz (MONTEIRO, 2014). Assim, o desenvolvimento de métodos de diagnósticos precisos, barato, de fácil realização, interpretação e que forneçam resultados rápidos são necessários, para controlar a

transmissão e a disseminação da doença. O diagnóstico da LVC pode ser realizado através de métodos clínicos, parasitológicos, sorológicos e moleculares, cada um apresentando suas vantagens e desvantagens.

2.11.1 Diagnóstico clínico

O diagnóstico clínico da LVC é bastante complexo e difícil devido à inespecificidade dos sintomas, que podem ser confundidas com outras doenças e da ausência de sinais clínicos na maioria dos animais. Em torno de 60% a 80% dos cães que vivem em áreas endêmicas podem ter contato com o parasito e não desenvolver sinais clínicos da doença, por um longo período (MONTEIRO, 2014; NOGUEIRA et al., 2016). Além disso, os sinais clínicos podem ser semelhantes a outras patologias caninas, como por exemplo, erliquiose e babesiose. Desta maneira, para se chegar a um diagnóstico definitivo e seguro da LVC faz-se necessário a associação entre os parâmetros clínicos, epidemiológicos, parasitológicos e sorológicos (FARIA; ANDRADE, 2012).

2.11.2 Diagnóstico parasitológico

O teste parasitológico faz uso da demonstração do parasita no esfregaço ou em lâminas advindas de material biológico do baço, fígado, medula óssea ou linfonodos. Esse método é considerado padrão ouro, pois a técnica permite a visualização do parasita, em sua forma amastigota, na análise do material biológico. Porém apesar desse método fornecer a certeza da infecção quando o parasita é identificado e possuir uma especificidade de 100% a sua sensibilidade é bastante variável. Essa variação ocorre porque a distribuição do parasita não é homogênea no tecido, assim, dependendo do grau de infecção do animal o parasita pode não ser visualizado na amostra, mesmo o animal estando infectado, levando a resultados falso-negativos. Além disso, trata-se de uma técnica bastante invasiva que requer profissional capacitado e ambiente apropriado para a coleta e sua aplicação não é adequada para uso em larga escala (GONTIJO; MELO, 2004; MONTEIRO, 2014; NÓBREGA, 2014).

Os aspirados de medula e linfonodos são os mais usados para esse tipo de teste, porém a sensibilidade mais alta (98%) é alcançada quando se utiliza aspirado do baço, entretanto os riscos advindos desse procedimento são altos. O aumento do tempo de observação e do número de campos observados reflete uma maior sensibilidade para o teste parasitológico. As limitações na interpretação dos resultados ressaltam a necessidade de mais pesquisas na área de diagnóstico da LV, com o objetivo de aprimorar as abordagens metodológicas utilizadas em estudos de validação de métodos diagnósticos (MONTEIRO, 2014).

2.11.3 Diagnóstico molecular

Para o diagnóstico molecular são utilizadas técnicas que permitem detectar e identificar a presença do parasita sem a necessidade do isolamento através de uma cultura ou através da utilização de métodos invasivos como: a biópsia de medula óssea, punção de baço, aspirado de linfonodo, biópsia de fígado ou mesmo um grande volume de sangue para obtenção de material para análise (NÓBREGA, 2014).

A técnica mais usada nesse tipo de diagnóstico é a reação em cadeia da polimerase (PCR), essa técnica baseia-se na amplificação de oligonucleotídeos que formam uma sequência conhecida do parasito, podendo detectar uma única molécula de DNA numa amostra ou um fragmento contendo o alvo desejado (MONTEIRO, 2014). Assim, essa técnica se apresenta como um teste de detecção rápida, sensível e específica na constatação do parasito da *Leishmania*, podendo ser usada no diagnóstico, monitoramento do tratamento e em estudos epidemiológicos (NÓBREGA, 2014).

A técnica baseia-se na amplificação de uma sequência específica de DNA do parasita permitindo que essa sequência se ligue a região do DNA de interesse, amplificando-a em inúmeras cópias (VIEIRA, 2011; JUSI *et al.*, 2015). Para a amplificação de DNA, faz-se uso de sequências de oligonucleotídeos advindos dos domínios conservados de minicírculos, presentes em milhares de cópias, que corresponde a 30% do DNA celular, sendo então um bom alvo para ser utilizado no diagnóstico molecular do parasita da *Leishmania* (MONTEIRO, 2014).

A PCR possui sensibilidade e especificidade variáveis de acordo com método de extração de DNA utilizado (amostra), pela escolha dos oligonucleotídeos iniciadores empregados, das amostras clínicas utilizadas, bem como do tempo da infecção (NUNES *et al.*, 2007). O sangue e a medula óssea são as amostras mais utilizadas para o diagnóstico da LVC por PCR. Porém, utilizações de amostras provenientes de biopsia de pele podem ser potencialmente úteis, independentemente do estado clínico do animal. Amostras de pele são um importante reservatório do parasita tanto em animais assintomáticos quanto em sintomáticos, pois é nela que a infecção inicia com a picada do flebotômíneo e o parasita permanece no tecido cutâneo permitindo que novos mosquitos se infectem. Em estudo feito, a PCR mostrou ser um indicador melhor com a mostra de pele (51%) do que da medula óssea (17,8%) ou conjuntiva (32%). Entretanto os métodos moleculares apresentam elevado custo e pouca aplicabilidade em campo para uso em rotina (XAVIER *et al.*, 2006).

2.11.4 Diagnóstico sorológico

Devido a elevada produção de anticorpos decorrente da estimulação policlonal de linfócitos B e ativação da resposta imune humoral com produção de anticorpos IgG anti-leishmania, característica da doença, os testes sorológicos têm sido os mais utilizados como ferramenta no auxílio do diagnóstico da LVC (BARBOSA, 2005; MARCONDES *et al.*, 2011; GONTIJO; MELO, 2004). Esses testes baseiam-se na detecção desses anticorpos circulantes, presentes no soro dos cães infectados, para se ter uma confirmação da doença (ROCHA, 2012).

Nos animais doentes a resposta humoral é geralmente intensa com altos níveis de imunoglobulina, que ativam a produção de anticorpos IgG anti-Leishmania. Os níveis desses anticorpos desenvolvem-se a partir do terceiro mês da infecção e permanecem em níveis elevados por até dois anos (MARCONDES *et al.*, 2011). Em virtude disso, os testes sorológicos passaram a ser o principal foco no diagnóstico de LVC ocorrendo assim, o desenvolvimento de diversos métodos. O uso desse tipo de diagnóstico apresenta como principais vantagens: serem menos invasivo; podem ser produzidos em grande escala; apresentam custo viável; são rápidos e de simples aplicação (FARIA; ANDRADE, 2012).

Atualmente, existe uma variedade de testes que podem ser aplicados para o diagnóstico sorológico da LVC, que são: a fixação do complemento, teste imunocromatográfico, teste de aglutinação direta (DAT), imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA) com diferentes modificações e *Western Blotting* (NÓBREGA, 2014).

No Brasil, o Ministério da Saúde preconiza o uso do teste imunocromatográfico - TR DPP® para inquéritos epidemiológicos e controle da LVC, por ser de fácil execução, rápido, com baixo custo e por apresentar boa sensibilidade e especificidade, tendo seu uso como método de triagem (JÚNIOR, 2014). Porém, para a confirmação da doença é necessário a aplicação de um segundo teste. Quando a amostra de soro se apresenta positiva no DPP a amostra é encaminhada para aplicação do teste de ELISA ou RIFI, que são as técnicas confirmatórias recomendadas pelo ministério da saúde (BRASIL, 2016).

Os cães que apresentam reatividade positiva para esses testes devem ser eutanasiados, segundo o Ministério da Saúde recomenda-se ainda a realização de novos testes, em até 30 dias, para os animais que apresentam baixa reação, visando confirmar o diagnóstico (BRASIL, 2016).

A RIFI foi empregada a partir da década de 1960. A técnica utiliza como antígeno formas promastigotas íntegras do parasita. Sua sensibilidade varia de 83% a 100% e sua especificidade próximo a 80% para amostras de soro. Entretanto, sua aplicação necessita de profissional com alta habilidade e experiência, equipamentos especializados e de alto custo, além de ser muito laborioso o que dificulta a sua aplicação na triagem de um grande número de amostras (FARIA; ANDRADE, 2012).

A RIFI tem sido bastante utilizada no diagnóstico de diversas doenças parasitológicas, porém tem se observado a presença de reações cruzadas em testes envolvendo LV, Leishmaniose tegumentar (LT), doença de Chagas, demodicose e Ehrlichiose. Outra forma de reação cruzada pode ser causada por anticorpos vacinais ou com outras parasitoses. A presença de reações cruzadas resulta em muitos falso-positivos, o que torna a sensibilidade e especificidade da RIFI menor que nos testes de ELISA. Isso explicaria a elevada prevalência de cães soropositivos quando se utilizam os testes de RIFI comparados ao ELISA (HIRSCHMANN *et al.*, 2015). Dessa forma

desde 2012, a RIFI vem sendo substituída pelo ELISA, a qual tem sido aplicado como principal teste confirmatório pela rede pública no Brasil (BRASIL, 2016).

O ensaio imunoenzimático (ELISA) baseia-se na reação de anticorpos presentes no soro do cão com o antígeno de *Leishmania*, sensibilizado em microplacas. A identificação ocorre após a aplicação de um conjugado marcado com enzima peroxidase, de maneira que esta enzima age sobre um reagente fazendo a reação final mudar de cor, a intensidade da reação é medida pela absorvância em um espectrofotômetro (BRASIL, 2014). A sensibilidade do ELISA pode variar de 71% a 100% e a especificidade de 85% a 100% dependendo do tipo de antígeno empregado (ROCHA, 2012).

O teste de ELISA pode ser aplicado para um grande número de amostras em um curto espaço de tempo, além de poder ser aplicado a diversos antígenos, sejam eles brutos, sintéticos ou recombinantes. O uso de antígenos brutos limita a especificidade do teste quando comparados com antígenos recombinantes (MAIA; CAMPINO, 2008). O animal é considerado reagente no teste de ELISA quando o valor da absorvância da amostra for igual ou superior ao ponto de corte (*cut-off*) (BRASIL, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Produzir e avaliar a sensibilidade e especificidade da proteína rk39 de *Leishmania chagasi*, expressa em sistema eucarioto e procarioto para utilização no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expressar a proteína rK39 de *L. chagasi* em sistema procarioto;
- Purificar a proteína rK39 expressa;
- Avaliar a sensibilidade e especificidade da proteína utilizando o teste de ELISA indireto frente a soros de cães do município de Fortaleza-CE para o diagnóstico da LVC;
- Comparar a reatividade sorológica, a sensibilidade e especificidade obtidas pelo ensaio imunoenzimático da rk39 produzida em sistema eucarioto e procarioto;
- Determinar o melhor desempenho da rk39 nos diferentes sistemas de expressão para o diagnóstico da LVC como potencial confecção de um kit de diagnóstico

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

4.1.1 Escolha e construção do inserto

Para o desenvolvimento deste estudo, primeiramente, foi realizada a busca e a análise das proteínas de *Leishmania chagasi* presente na literatura, para isso foi feita uma seleção *in silico* de sequências de nucleotídeos encontradas em bancos de dados públicos. A sequência escolhida capaz de codificar a expressão da proteína rK39 foi obtida no Genbank com número de acesso DQ831678.1. A sequência contém 837 pares de bases (pb) de nucleotídeos e está disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov. Para uma análise total da sequência, a mesma também foi submetida ao BLAST - Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Posteriormente, foi elaborada a construção da sequência recombinante, onde junto a sequência escolhida da k39, foi adicionado um sítio de restrição para a enzima *Bam*HI seguida de uma sequência capaz de codificar o aminoácido metionina na extremidade 5' e um sítio de clivagem para a enzima de restrição *Eco*RI na extremidade 3' (Figura 6).

Figura 6 – Representação gráfica da sequência recombinante k39

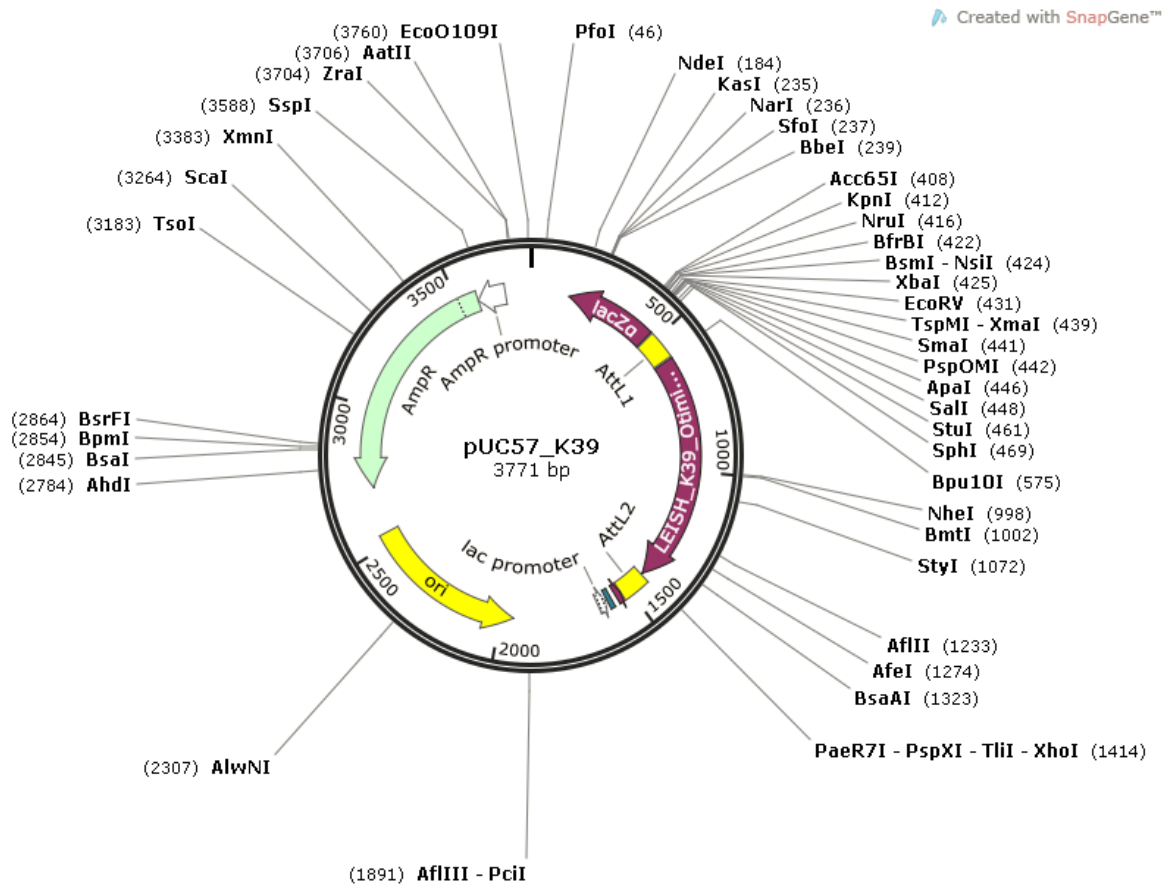


Legenda: BamHI e EcoRI: sítios de restrição de enzimas; Met: sequência do aminoácido de iniciação metionina; K39: sequência genica da proteína k39.

Fonte: Elaborado pelo autor

Após a elaboração da sequência recombinante, a mesma foi sintetizada e adquirida comercialmente (BioBasic Inc., Ontario, Canadá), inserida em vetor de clonagem (pUC), representado na Figura 7.

Figura 7 - Mapa do plasmídeo pUC-k39 contendo a sequência recombinante



Legenda: Plasmídeo pUC57_k39. AmpR: gene de resistência a ampicilina; AmpR promoter: promotor do gene AmpR; lacZα: fragmento do gene da sequência da β-galactosidase, Lac promoter: promotor da sequência lacZα; ori: origem de replicação em bactérias. AttL1, AttL2: sítio de clonagem múltipla; em negrito por fora do plasmídeo: sítios de enzimas de restrição; LEISH_K39_otimi: Sequência da k39 otimizada.

Fonte: Snapgene, 2018

4.1.2 Clonagem em sistema procaríoto

O plasmídeo de clonagem obtido comercialmente (pUC-k39) foi usado na transformação das bactérias competentes *E. coli*, cepa de clonagem DH5α tratadas com cloreto de cálcio. O plasmídeo pUC possui um gene de resistência a ampicilina que confere as bactérias transformadas resistência a esse antibiótico.

A transformação das cepas de *E. coli* ocorreu por meio de choque térmico. Para isso foi adicionado 100 ng do plasmídeo de interesse em um microtubo contendo células competentes de clonagem (50µl), previamente descongelada em gelo por aproximadamente 10 minutos. Os microtubos contendo os plasmídeos de interesse e as células competentes foram incubados por 10 minutos em gelo e por 30 segundos em

banho maria a 42 °C. Após o choque térmico a bactéria foi mantida em gelo por mais 10 minutos e incubada em 200 µL de meio Luria Bertani (LB) (Invitrogen) á 37 °C, 240 rpm por 1 hora.

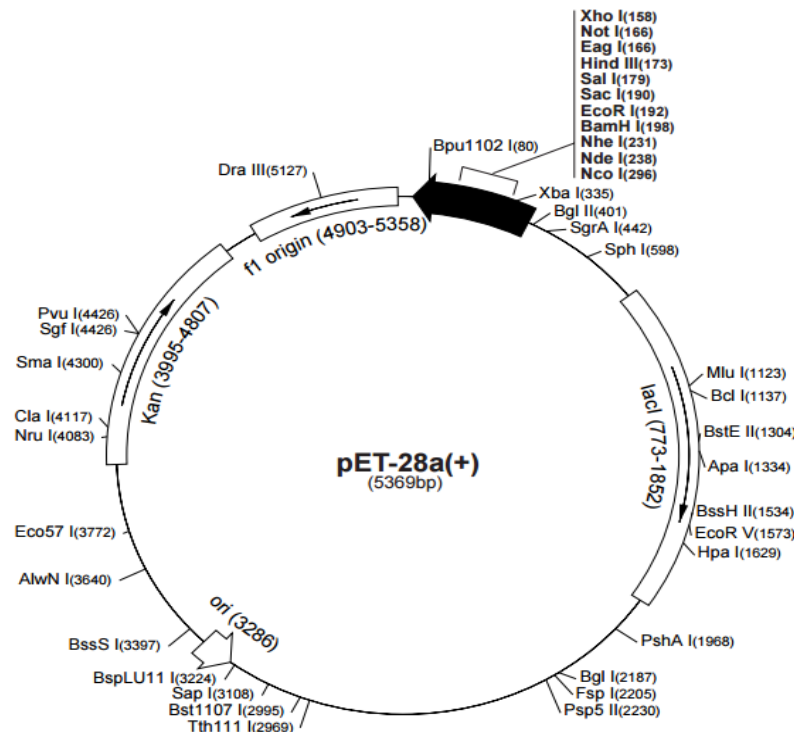
Em seguida, a cultura bacteriana resultante foi plaqueada em Ágar-LB/Ampicilina 0,01% e incubada a 37 °C overnight. Foram selecionadas aleatoriamente 8 colônias, crescidas na placa, para confirmação da presença do plasmídeo recombinante.

Cada colônia foi inoculada em tubos contendo 3 ml de LB/Ampicilina 0,005% e incubadas a 37 °C, 250 rpm, overnight. As culturas foram centrifugadas a 16000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* submetidos a purificação do DNA plasmidial - Kit Wizard Plus Sv Minipreps DNA Purification System (Promega Corporation, Madison, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação das amostras foi feita por nanoespectrofotometria em Nanodrop (Thermo Scientific™) no comprimento de onda de 260nm.

4.1.3 Ligação dos genes ao vetor de expressão (pET-28a)

Para a confirmação do inserto na bactéria e a sua ligação no vetor de expressão foi realizado a digestão enzimática do plasmídeo. O plasmídeo resultante denominado pUC-k39 (2 µg) foi digerido com as enzimas de restrições *EcoRI* e *BamHI*, (2 µL/enzima) em 36 µL do tampão H por 1 hora a 37 °C em banho-maria. Para a inativação da enzima a temperatura foi aumentada para 65 °C por 20 minutos. O produto da digestão foi aplicado em gel de agarose 1% (EPS 3501 XL Power Supply, GE Healthcare) e o inserto foi purificado do gel com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Madison, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação foi realizada por nanoespectrofotometria no Nanodrop (Thermo Scientific™) a 260 nm. Após a purificação, o inserto foi ligado ao vetor de expressão pET-28a (Novagen, Darmstadt, Germany), mostrado na Figura 8, previamente linearizado com as mesmas enzimas.

Figura 8 - Representação do mapa circular do vetor de expressão pET-28a



Legenda: Vetor de expressão pET-28a(+). Kan: gene de resistência a Canamicina; f1 origin: origem de replicação de bacteriófago, a seta indica a direção da síntese de cadeia; lacI: fragmento do gene da sequência da β -galactosidase junto com o promotor da sequência lacI; ori: origem de replicação em bactérias; região com a seta em negrito: contém a região da calda de 6 histinina, o sítio de clonagem múltiplas, tag da proteína principal do capsídeo, operador lac e promotor T7; indicação por fora do plasmídeo: sítios de enzimas de restrição.

Fonte: Novagem, 2018.

Resumidamente, a ligação no vetor de expressão pET-28a foi feita na proporção de 3 moléculas do inserto para 1 molécula do vetor utilizando a enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen, Texas, USA) como catalizador da reação de ligação em 1 U/ μ L. Em seguida o produto dessa ligação passou pelas mesmas etapas de transformação em *E. coli* (cepas DH5 α) e purificação conforme descritas anteriormente. A quantificação do plasmídeo foi realizada por nanoespectrofotometria em Nanodrop (Thermo Scientific™).

4.1.4 Expressão da proteína rk39

As células *E. coli* BL21(DE3) competentes foram transformadas com o plasmídeo de expressão pET-28aK39 por choque térmico seguindo o protocolo

anteriormente descrito. O plasmídeo pET28a possui o gene de resistência ao antibiótico canamicina, dessa forma, as bactérias transformadas se tornam resistentes a esse antibiótico.

As colônias transformadas foram crescidas em meio sólido contendo 0,005% de antibiótico canamicina (Sigma-Aldrich). Foi escolhida uma colônia, de forma aleatória, e inoculada em 5 mL de meio LB/Canamicina 0,005%, à 37 °C sob agitação de 250 rpm, overnight para a formação do pré-inóculo. Da cultura crescida foram realizadas repiques para um novo caldo LB/canamicina, na diluição de 1:25 (v/v) e incubados à 37 °C/ 250 rpm por aproximadamente 2 horas em incubadora *shaker* (Ethik technology), até atingir uma densidade óptica (OD_{600nm}) entre 0,6 e 0,8. Essa OD marca o final da fase logarítmica, fase normalmente utilizada para indução em sistemas que utilizam a T7 RNA polimerase. A leitura foi realizada em espectrofotometro (Ultrospec 2100 pro Amersham Biosciences) (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Após o crescimento a cultura foi induzida. A presença do indutor ativa a expressão da proteína recombinante. Para avaliar a melhor proporção e obter maiores concentrações na expressão da proteína de interesse, foram testadas 3 diferentes concentrações do indutor (0,1 mM; 0,5 mM e 1 mM) Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) (SIGMA-ALDRICH). A indução ocorreu por 3 horas, 37 °C, 250 rpm. Posteriormente as culturas foram centrifugadas a 8000 rpm, 15 minutos, 4°C (MPW 350 R High Speed Brushless Centrifuge) (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

O sobrenadante gerado foi descartado e o *pellet* ressuspendido em tampão de lise contendo 200 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 8; 200 µg lisozima; 2 mM fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF) na proporção 1:10 (v/v) de volume de cultura induzida. Foi adicionado na solução 0,1% de triton X-100 e incubada em gelo durante 15 minutos. Em seguida, o material foi sonicado em amplitude de 45 em 12 ciclos de 15 segundos com repouso de 15 segundos entre cada sonicação. Após a sonicação o extrato bacteriano foi centrifugado (4 °C/ 8000 rpm/ 15 minutos) (MPW 350 R). As duas frações resultantes (*pellet* e sobrenadante) foram analisadas por *Western Blotting* para a confirmação da expressão da proteína de interesse.

Primeiramente, as amostras foram preparadas adicionando tampão de amostra e fervidas por 2 minutos. Posteriormente, as amostras foram aplicadas em gel

de poliacrilamida SDS-PAGE 15% e as proteínas submetidas a separação por eletroforese utilizando corrente de 140 V, em um sistema de mini-gel por 80 minutos. Foram feitos 2 geis um para ser corado com *Coomassie Brilliant Blue* e o outro foi submetido a transferência para uma membrana de nitrocelulose de 0,2 µm de poro (GE Healthcare Life Sciences) e utilizado no *Western Blotting*. A transferência se deu em sistema *Semi-dry* utilizando tampão de transferência (glicina 39 mM; SDS 0,0375 % (m/v); metanol 20 % (v/v) e Tris 48 mM pH 8), e amperagem 300 mA por 1 hora.

Após a transferência a membrana foi bloqueada overnight com tampão fosfato de sódio (PBS) acrescida de 5% de leite desnatado e posteriormente incubada em anticorpo monoclonal anti-His₆ (GE Healthcare Life Sciences), na proporção de 1:6000 por 1 hora, diluído em solução de bloqueio. Após a incubação no anticorpo monoclonal a membrana foi lavada em três repetições de 10 minutos com PBS-Tween 20 (0,05%) e depois incubada em anticorpo secundário, anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (SIGMA-ALDRICH), na proporção de 1:5000 por 1 hora, diluído em solução de bloqueio. Por fim, realizou-se novamente as lavagens com PBS-Tween 20 (0,05%) em três repetições de 10 minutos (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Para a revelação da membrana foi utilizado como cromógeno a solução de diaminabenzidina (DAB / SIGMA-ALDRICH) 0,0003 g/mL e 100 µL de peróxido de hidrogênio (30 volumes) diluídos em tampão PBS (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979), mantendo sob abrigo de luz por 15 minutos. A reação de revelação foi parada com lavagem da membrana em água destilada.

4.1.5 Purificação da proteína recombinante

A etapa de purificação da proteína recombinante realizou-se em coluna de cromatografia de afinidade ao íon Níquel Ni-NTA (GE Healthcare, USA). Para essa etapa a coluna de resina foi previamente preparada com solução de 300 mM de níquel (VETEC) e lavada em 3 volumes de coluna com tampão de equilíbrio (20 mM tris pH 8,0; 500 mM NaCl; 10% glicerol; 20mM imidazol). Após o preparo da coluna, foi então adicionado a solução lisada da proteína recombinante a uma velocidade de 2 ml/minuto.

Após a adição do lisado a coluna foi lavada em 5 volumes de coluna com tampão de lavagem (20 mM tris pH 8,0; 500 mM NaCl; 10% glicerol; 20 mM imidazol). A eluição da proteína foi feita utilizando tampão de eluição (20 mM Tris-HCl, pH 8; 500 mM NaCl; 10% glicerol; 500 mM imidazol) (RODRIGUES *et al.*, 2005). A amostra recuperada foi coletada em 10 frações de 1 ml cada.

Para a análise e confirmação da presença da proteína as frações obtidas foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE e *Western Blotting*. As frações positivas no *Western Blotting* foram quantificadas, separadamente, utilizando o método de Bradford (1976), e leitura em Nanodrop (Thermo Scientific™) no comprimento de onda de 260nm.

4.2 IMUNOENSAIO - TÉCNICA DE ELISA

4.2.1 População de estudo

A sensibilidade e a especificidade da proteína rK39 foi avaliada utilizando 158 soros de cães, provenientes do Centro de Controle de Zoonose (CCZ) do município de Fortaleza no estado do Ceará (CE). Para os testes de ELISA indireto foram testadas 118 amostras de soro canino diagnosticados com leishmaniose visceral (amostras positivas) confirmadas por dois testes sorológicos, o ensaio imunocromático rápido (DPP® *Dual Path Platform* Biomanguinhos/Fiocruz, Brasil) e o imunoenzimático (ELISA® kit EIE-LVC Bio-Manguinhos/Fiocruz, Brasil). As amostras negativas (n=40) foram divididas em dois grupos, de acordo com os resultados dos testes do CCZ. Um grupo constituído de 20 soros negativos confirmados pelo teste imunocromático rápido e um segundo grupo formado por 20 soros considerados negativos pelo CCZ, porém positivados no teste imunocromático rápido e negativados no teste de ELISA-EIE®. Dessa forma tivemos a formação de 3 grupos.

- 1) Grupo 1: formado por 118 soros de cães positivos para DPP e EIE (DPP+/EIE+).
- 2) Grupo 2: formado por 20 soros de cães negativos para DPP (DPP-).
- 3) Grupo 3: formado por 20 soros de cães positivos para DPP e negativos para EIE (DPP+/EIE-).

O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais – UECE com número de protocolo Nº 7255099/2017 (ANEXO 1). A detecção de anticorpos específicos nas amostras de soro contra o antígeno recombinantes advindo de *Leishmania chagasi* foi avaliada pela técnica do ELISA indireto.

4.2.2 Antígenos

O antígeno solúvel utilizado foi à proteína rK39 obtida da expressão em duas plataformas diferentes, Procarioto e Eucarioto. A proteína rK39 expressa em procarioto foi obtida seguindo o protocolo apresentado anteriormente. A proteína proveniente de eucarioto foi expressa em plataforma vegetal utilizando a planta *Nicotiana benthamiana* e gentilmente cedida, para uso nesse estudo, pelo laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular (LBBM) da Universidade Estadual do Ceará – UECE, coordenado pela professora Doutora Maria Izabel Florindo Guedes.

4.2.3 Padronização do ensaio imunoenzimático (ELISA)

Foram realizados dois ensaios para padronização dos testes de ELISA indireto. O primeiro ensaio foi para avaliar se a presença do imidazol e do triton X-100, utilizados no processo de purificação poderiam interferir na leitura dos resultados. Para isso, foi feito um ensaio utilizando a proteína pura, em alta concentração e a diluição seriada de ambos os compostos.

O segundo ensaio de padronização do teste de ELISA foi para determinar a concentração da proteína e a melhor diluição do anticorpo primário. Para avaliar a melhor concentração da proteína, manteve-se fixa a concentração do anticorpo primário e diluiu-se a proteína em log 2 iniciando a análise com uma concentração de 8µg da proteína. Posteriormente, com a análise da melhor concentração da proteína já fixada realizou-se uma titulação seriada do anticorpo primário (1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1.280).

4.3 TESTE DAS AMOSTRAS POR ELISA

A sensibilidade e a especificidade das proteínas produzidas nos diferentes sistemas foi avaliada por ELISA indireto. As placas foram sensibilizadas com 100

μL /poço das proteínas recombinantes, solúveis dissolvidas em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M (pH 9,6) para uma concentração final de 1 $\mu\text{g/mL}$, e incubadas *overnight* a 4 °C. Os poços revestidos com a proteína foram lavados 3 vezes com solução de lavagem (tampão fosfato de sódio contendo 0,05% de Tween-20), posteriormente, foi feito o bloqueio adicionando 200 μL de gelatina (Sigma Aldrich, USA) na concentração de 1% diluída em PBS e incubadas a 37 °C durante 1 hora. Após o bloqueio uma nova lavagem foi feita e em cada poço foi adicionado 100 μL das amostras de soro de cães, na diluição 1:160 em PBS-Tween 20 (0,05%). As placas foram novamente incubadas à 37 °C por 1 hora e posteriormente lavadas 3 vezes.

Foi adicionado em cada poço 100 μL do anticorpo secundário *anti-DOG* IgG conjugado a peroxidase (SIGMA), na diluição de 1:10.000 em PBS-Tween 20 (0,05%). As placas foram incubadas à 37 °C por 1 hora e posteriormente lavadas com solução de lavagem em três repetições. A reação da proteína recombinante com os anticorpos foi revelada adicionando 100 μL do cromógeno 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (Life Technology), mantendo sob abrigo de luz por 15 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 50 μL de solução de 3 M de ácido sulfúrico (H_2SO_4). Ao final as placas foram lidas na absorbância a 450 nm em leitora automatizada (Synergy 2, Biotrak). O ensaio de todas as amostras de soros foi realizado em duplicata (ROTHWELL; HAMBLIN; KAISER, 2001; FLORINDO *et al.*, 2002).

4.3.1 Determinação do limiar de reatividade (cut off)

O cálculo do *cut-off* foi determinado pela média dos valores de absorbância encontrado nas amostras negativas acrescida de 3 vezes o desvio padrão dos mesmos (99,8% de confiança). Sendo considerado positivo os soros que apresentam absorbância superior ou igual ao *cut-off* (ANURACPREEDA; CHAWENGKIRTTIKUL; SOBHON, 2016).

4.3.2 Cálculo da sensibilidade e especificidade do teste de imunodiagnóstico

A sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), razão de verossimilhança positiva (RVP) e razão de verossimilhança negativa (RVN), foram calculados utilizando os dados da tabela 2.

Tabela 2: Representação da análise dos resultados obtidos em teste por ELISA indireto

	Presença da infecção		TOTAL
	Presente	Ausente	
Positivo	Verdadeiro positivo (A)	Falso positivo (B)	(A+B)
Negativo	Falso negativo (C)	Verdadeiro negativo (D)	(C+D)
TOTAL	(A+C)	(B+D)	(A+B+C+D)

Fonte: Adaptado COGGON; ROSE; BARKER, 1993

As categorias para se obter os resultados de um teste diagnóstico foram organizadas da seguinte forma: verdadeiro positivo = presença de infecção e teste positivo; falso positivo = ausência de infecção e teste positivo; falso negativo = presença de infecção e teste negativo; verdadeiro negativo = ausência de infecção e teste negativo.

A sensibilidade (S) é determinada pela probabilidade de um teste dar o resultado positivo na presença da doença, ou seja, avalia a capacidade do teste de qualificar como doente os animais com a doença, ou verdadeiramente doentes. A sensibilidade é calculada utilizando apenas animais doentes (A), sobre o total de animais positivos incluindo falsos negativos (C) (HATANAKA; BENSEÑOR, 2005).

$$S = A / (A + C)$$

A especificidade (E) é determinada pela probabilidade de um teste ter resultado negativo na ausência da doença, ou seja, a capacidade do teste de considerar negativos animais saudáveis, ou verdadeiramente negativos. A especificidade é calculada utilizando apenas animais saudáveis para a doença (D), sobre o número de cães não doentes incluindo os falsos positivos (B) (HATANAKA; BENSEÑOR, 2005).

$$E = D / (B + D)$$

O valor preditivo positivo (VPP) avalia a probabilidade de um paciente com teste positivo está realmente com a doença. Para isso, o valor preditivo positivo calcula

a proporção de animais verdadeiros positivos (A) com relação a todos os indivíduos com teste positivo (A+B).

$$\mathbf{VPP = A / (A + B)}$$

O valor preditivo negativo (VPN) avalia a probabilidade de um paciente com teste negativo realmente não possuir a doença. Para isso, o valor preditivo negativo calcula a proporção de animais verdadeiros negativos (D) com relação a todos os indivíduos com teste negativo (C+D).

$$\mathbf{VPN = D / (C + D)}$$

A razão de verossimilhança calcula a razão entre a probabilidade de um resultado ser o mesmo em indivíduos doentes e saudáveis. A razão de verossimilhança positiva (RVP) mostra quantas vezes é mais provável achar um resultado positivo em pessoas doentes.

$$\mathbf{RVP = S / (1 - E)}$$

A razão de verossimilhança negativo (RVN) mostra quantas vezes é mais provável achar um resultado negativo em pessoas doentes.

$$\mathbf{RVN = (1 - S) / E}$$

A acurácia (AC) determina a proporção de todos os resultados verdadeiro, ou seja, “verdadeiros- positivos” e os “verdadeiros-negativos” em relação a todos os resultados. Ou seja, a acurácia de um teste define quantas vezes um determinado teste é capaz de acertar o resultado (HATANAKA; BENSEÑOR, 2005).

$$\mathbf{AC = (D + A) / (A + B + C + D)}$$

A avaliação do ELISA é feito pela análise dos controles positivos e negativos. O coeficiente de variação (CV) permite calcular a qualidade dos controles e monitorar a variação intraplaca e interplaca. O coeficiente de variação foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\mathbf{CV = \frac{DESvio PADR\tilde{A}O}{M\acute{E}DIA}}$$

Assim, os resultados obtidos, devem estar dentro do limite aceitável de variação, de absorvância, entre 10% e 20% no máximo, para possuir boa qualidade dos resultados (COGGON; ROSE; BARKER, 1993). Em todos os testes foi observado um limite de significância de 5%.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO ELISA

Para a análise estatística os dados gerados com o ELISA foram tabulados no Microsoft Excel® versão 2010 (Microsoft Co., Redmond, WA, EUA) e analisados utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Inc, EUA), SPSS *statistics* versão 21. A precisão dos testes levou em consideração a análise dos parâmetros nos valores da curva ROC (Características Operacionais do Receptor) e da área sob a curva (AUC). Estes dados foram utilizados para estabelecer limite de positividade da linha de corte (*cut-off*) usado para estabelecer a sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), a área sob a curva (AUC) e acurácia (AC). Para todos os testes foi utilizado um nível de significância de 5%. Os valores do cálculo da área sob a curva ROC varia de 0-100% a interpretação desses dados foi feita de acordo com a tabela 3.

Tabela 3 – Interpretação do teste de acordo com a área sob a curva ROC

Área sob a curva ROC (%)	Interpretação do teste
90 – 100	Excelente
80 – 90	Bom
70 – 80	Regular
60 – 70	Pobre
50 - 60	Ruim

Fonte: Adaptado de Safari *et al.*, 2016.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

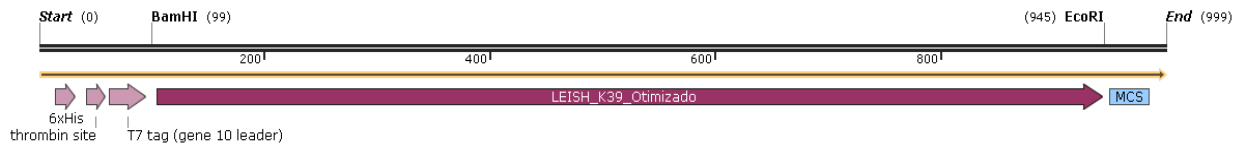
A proteína rk39 foi escolhida por ser amplamente avaliada e reconhecida como uma proteína promissora para uso no diagnóstico de LVC apresentando alta sensibilidade e especificidade (PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015; SALLES *et al.*, 2017). A partir da análise feita de sequências de kinesina de *L. chagasi* presente em banco dados genômicos foi possível montar um esquema do plasmídeo que seria codificado e expresso em sistema procarioto.

5.1.1 Confirmação da construção do inserto K39

O gene escolhido apresentou domínios conservados e presença de 39 aminoácidos repetidos. As proteínas contendo repetições em sequências de nucleotídeos, com uma ou mais cópias, formam um epítipo antigênico que é um importante alvo de reconhecimento das respostas mediadas por células B (GOTO *et al.*, 2006). Essa resposta gerada pode ocorrer independente da estimulação de linfócitos T (TORO *et al.*, 2017). Dessa forma, várias doenças parasitárias, como a leishmaniose, apresentam produção de anticorpos que são capazes de reconhecer esses domínios (MAGALHÃES *et al.*, 2017).

O sequenciamento para a confirmação da sequência foi feito pela empresa Helixxa Serviços Genômicos S.A que confirmou a presença da proteína (Figura 9) mostrando repetições de domínios conservados referentes a K39. Assim, a sequência final confirmada pela empresa é constituída por 279 aminoácidos que correspondem à sequência escolhida de 837 nucleotídeos. O produto da codificação foi utilizado para o reconhecimento de soros de cães infectados com Leishmaniose Visceral Canina.

Figura 9 – Confirmação da sequência rK39 da *L. chagasi* localizada entre os sítios de restrição *EcoRI* e *BamHI* pelo sequenciamento



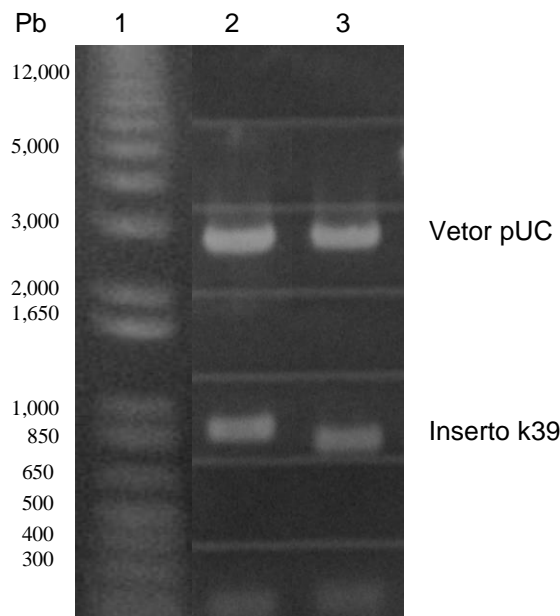
Legenda: Sequência da LEISHM_K39_otimizada. 6xHis: calda de afinidade com 6 histidinas; T7 tag: calda de proteína do capsídio T7; MCS: sítio de clonagem múltipla; BamHI e EcoRI: sítios de restrição.

Fonte: Snapgene, 2018

5.1.2 Clonagem no vetor de expressão pET-28a

Após a transformação do plasmídeo comercial pUC-K39 em cepas de clonagem *E. coli* DH5 α , o gene foi confirmado por separação eletroforética em gel de agarose 1% (Figura 10), este produto foi obtido após a etapa de digestão utilizando as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*, que possibilitam a liberação do inserto do vetor de clonagem (pUC).

Figura 10: Eletroforese em gel de agarose do plasmídeo pUC-k39 digerido com as enzimas de restrição



Legenda: Gel de agarose 1%, visualizada sob luz U.V. (1) Marcador de tamanho molecular de 1Kb DNA Ladder; (2-3) Digestão dupla do plasmídeo de clonagem pUC/K39 recombinante digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*. Em cada amostra foi observado a presença de dois fragmentos esperados um de ~ 3000 pb e outro de ~ 850 pb.

Fonte: Elaborado pelo autor.

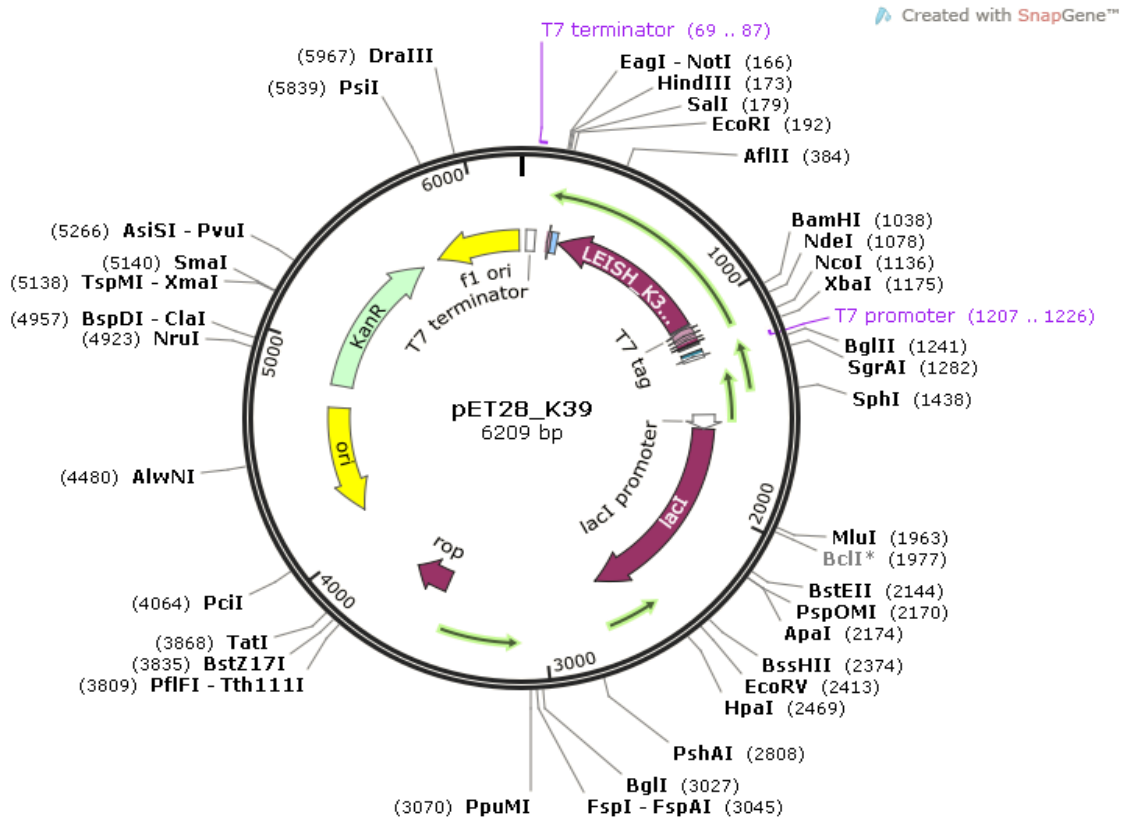
A análise do gel apresentou a presença de duas bandas em alturas diferentes, poços 2 e 3, a banda mais alta apresentou marcação próxima a altura de 3000 pb quando comparados com o padrão (marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder), que remete ao vetor pUC e a banda mais baixa próximo a 850 pb do padrão correspondente a sequência de genes de interesse da proteína k39 confirmando que as colônias crescidas da bactéria haviam sido transformadas. Em sequência, a banda de tamanho esperado, referente ao gene de interesse, foi excisada e purificada pela *mini-prep* e posteriormente ligada no vetor de expressão (pET-28a).

As enzimas de restrição são encontradas naturalmente em organismos procarióticos, sua principal função é clivar moléculas de DNA de antígenos invasores em sítios específicos. Esses sítios específicos, geralmente sequências de DNA de 4 a 8 pb, são reconhecidos pelas enzimas e ambas as fitas são clivadas em um corte palindrômico (CALVETE; CASEIRO; SOUZA, 2015). Assim, as enzimas clivam o inserto e o vetor de expressão, gerando pontas complementares (HOSEINI; SAUER, 2015). As pontas complementares permitem a ligação do gene de interesse no sítio de clonagem múltipla do vetor pET-28a, mantendo inalterados a sua fase de leitura.

Após a ligação o plasmídeo gerado (pET-28a-k39) (Figura 11) foi transformado em cepas de *E. coli* DH5 α , para a obtenção de cópias do plasmídeo recombinante e após purificação e confirmação, este foi transformado em cepas de expressão BL21(DE3) para a expressão heteróloga da proteína. Essa linhagem de cepa (BL21(DE3)) é a mais utilizada para expressão de proteínas recombinantes de alto rendimento (AHMAD *et al.*, 2017; HAN *et al.*, 2018; ROBICHON *et al.*, 2011).

O plasmídeo recombinante de expressão é uma pequena molécula de DNA de dupla fita contendo o vetor de expressão e o gene de interesse. O vetor de expressão contém, como um dos seus elementos necessários, pelo menos um gene que confere resistência a antibiótico, proporcionando o crescimento apenas das bactérias transformadas (FAEZI *et al.*, 2018).

Figura 11 – Mapa do plasmídeo de expressão recombinante (pET-28a-k39)

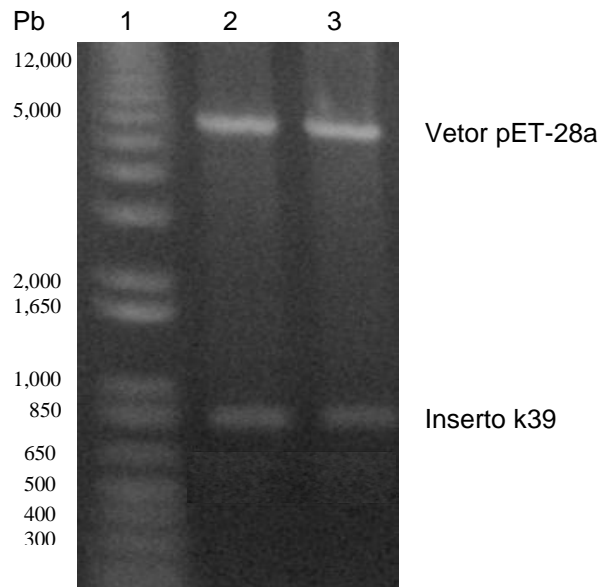


Legenda: Plasmídeo de expressão pET-28a_k39. KanR: gene de resistência a Canamicina; f1 ori: origem de replicação de bacteriófago, a seta indica a direção da síntese de cadeia; T7 terminator: terminador de transcrição para RNA polimerase do bacteriófago T7; em azul: sitio de clonagem múltipla; LEISH_K39: sequência da proteína k39; T7 tag: calda de uma proteína principal do capsídeo T7; lacI: fragmento do gene da sequência da β-galactosidase; lacI promoter: promotor da sequência lacI; rop: proteína rop; ori: origem de replicação em bactérias; indicação por fora do plasmídeo: sítios de enzimas de restrição.

Fonte: Snapgene, 2018

Assim a presença do plasmídeo pET-28a-k39 em bactérias *E. coli* transformadas confere a elas resistência ao antibiótico canamicina. Assim, um indicativo de que houve a incorporação do plasmídeo na bactéria é a presença de colônias resistentes a esse antibiótico. As colônias resistentes cultivadas foram confirmadas mediante purificação com extração do DNA plasmídial e posteriormente esse plasmídeo foi digerido com as enzimas de restrição. A análise do produto de digestão avaliado através da eletroforese em gel de agarose 1% apresentou duas bandas: uma com 840 pb referente ao gene de interesse; e uma segunda banda com 5210 pb correspondente ao vetor de expressão pET28a (Figura 12).

Figura 12- Confirmação do plasmídeo nas colônias DH5α após transformação e digestão do plasmídeos de expressão



Legenda: Gel de agarose 1% visualizada sob luz U.V. (1) Marcador de tamanho molecular de 1Kb DNA Ladder; (2-3) colônias diferentes de *E. coli* submetidas a digestão dupla com enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI. Após o processo de digestão o plasmídeo linearizou-se gerando duas bandas esperadas, em cada amostra aplicada, uma banda com o tamanho de ~ 5000 pb (pET-28a) e outra de ~ 850 pb (K39). pb = pares de base.

Fonte: Elaborado pelo autor.

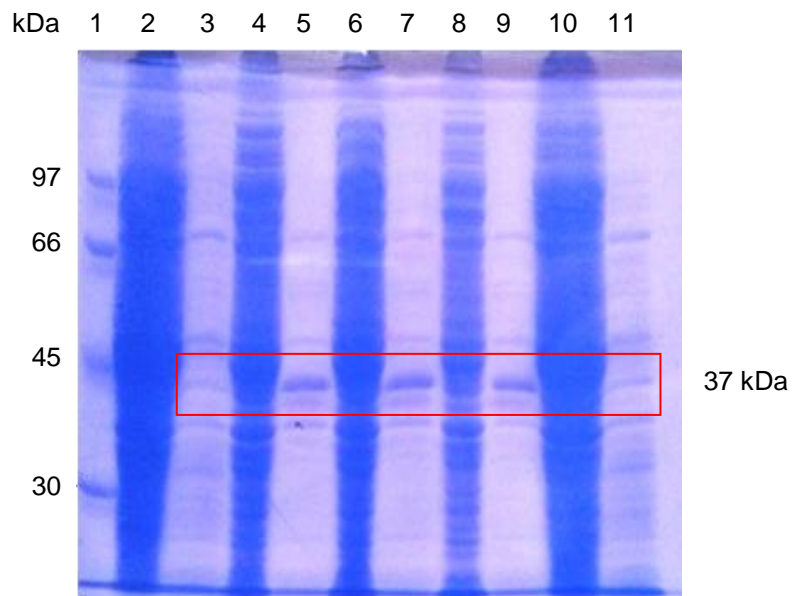
5.1.3 Expressão e Purificação da rK39 em Sistema Procarito

O plasmídeo de expressão pET-28a contém: promotor T7 onde a proteína T7 RNA polimerase, ao ser traduzida, se liga e inicia o processo de transcrição do gene de interesse para, posteriormente, ser expressa de forma indireta; região ativadora do *operon lac* (conjunto de genes que é transcrito em um RNAm e codifica proteínas que digerem o dissacarídeo lactose), essa região induz a expressão do *operon lac* permitindo a expressão da proteína de interesse na presença do indutor (lactose ou isopropiltiogalactosídeo - IPTG); gene do repressor *lacI*, que reprime a expressão da proteína na ausência do indutor; sítio de múltipla clonagem, onde é flaqueado e inserido a sequência; além da origem de replicação; sítio de ligação ao ribossomo (RBS), etiqueta de afinidade, códon ATG de início de tradução, sinal de terminação de transcrição *T7 terminal* e gene de resistência a canamicina e outras sequências (AHMAD *et al.*, 2017; MIYAMOTO, 2013). Sendo este um vetor bastante usado para expressão de proteínas recombinantes.

A indução da expressão da proteína no presente trabalho ocorreu através da utilização do IPTG como indutor. A adição de IPTG durante a fase *lag* apresenta maiores efeitos negativos nas taxas de crescimento celular devido este ser um agente tóxico a células, dessa forma, o momento ideal para se ativar a indução da proteína é no início da fase exponencial, pois é nessa fase que se obtém maiores quantidades de proteínas recombinantes. (ROZENDO *et al.*, 2014).

Para a expressão da proteína foram realizados o crescimento de 4 culturas bacterianas, contendo o plasmídeo de expressão (pET-28a-K39), na primeira cultura foi feito o crescimento sem a adição do IPTG; na segunda, terceira e quarta cultura foi adicionado o indutor em cada cultura em concentrações diferentes (0,1 mM; 0,5 mM; 1 mM respectivamente) e o controle negativo foi feito utilizando a bactéria selvagem sem o plasmídeo e crescida sem indutor. Foram analisados *pellet* e sobrenadante dos três grupos de indução, além dos controles, ambos apresentados em eletroforese de gel SDS-PAGE 15% (Figura 13).

Figura 13 – Expressão da proteína rk39 em concentrações diferentes de IPTG



Legenda: Gel SDS-PAGE 15% corado com comassie blue. (1) Marcador de peso molecular; (2 - 3) BL21-pET-28a-k39 *pellet* e sobrenadante (sbnt) da bactéria sem adição de IPTG e com plasmídeo; (4 - 5) BL21-pET-28a-k39 *pellet* e sbnt induzida com 0,1 mM de IPTG; (6 - 7) BL21-pET-28a-k39 *pellet* e sbnt induzida com 0,5 mM de IPTG, (8 - 9) BL21-pET-28a-k39 *pellet* e sbnt induzida com de 1 mM de IPTG, (10 - 11) BL21 *pellet* e sbnt bactéria selvagem sem plasmídeo pET-28a-k39 e sem adição de IPTG. Retângulo vermelho mostra as bandas referentes a altura da proteína rK39.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Desta forma a expressão da proteína sob as três concentrações diferentes de IPTG (0,1 mM; 0,5 mM; 1 mM), apresentou pouca variação quando leva-se em consideração a quantidade de produto expresso observado pelo gel SDS-PAGE 15% na altura da 37kDa, destacadas pelo retângulo vermelho nos poços 5, 7 e 9. Pode-se também observar ao analisar o gel, no poço 3, que a bactéria com o plasmídeo (pET-28a-K39) crescida sem a etapa de indução (adição do IPTG), não expressou ou expressou quantidade baixa da proteína, de forma que, quase não se tem a presença da banda referente a proteína nesse poço.

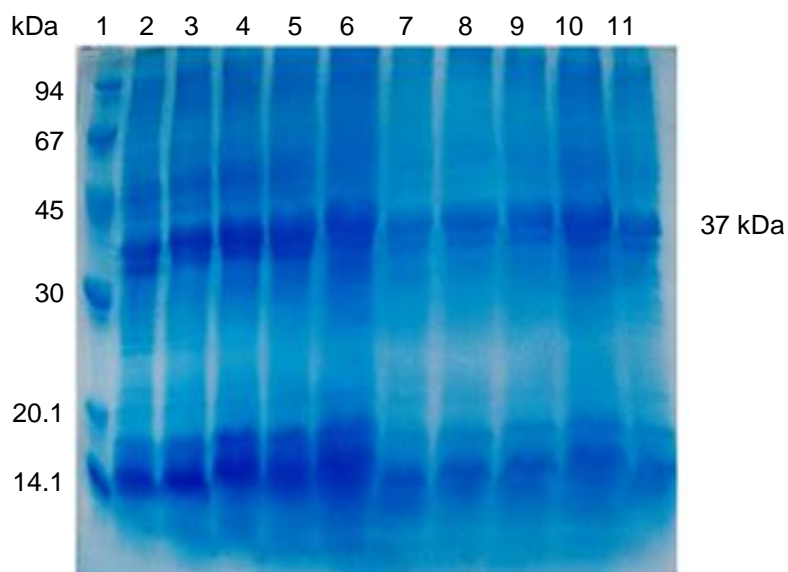
Dessa forma, pode ser verificado que a adição do indutor, nessa etapa, é fundamental para que a proteína possa ser expressa ou mesmo para que se possa testar os índices de produção. A banda obtida, no sobrenadante, com a indução por IPTG presente no gel SDS-PAGE 15% na altura próxima 37 kDa quando comparado ao padrão pode corresponder a proteína rk39, a qual espera-se que tenha 36,9 kDa.

Apesar da pouca variação para o teste das três concentrações de IPTG, a concentração de 0,5 mM foi selecionada para as etapas subsequentes de expressão e mostrou-se eficiente para a obtenção da proteína ao longo do tempo.

Ainda nesta etapa de otimização de expressão 10 colônias transformadas com o plasmídeo de expressão foram selecionadas e posteriormente induzidas a 0,5 mM, após indução foi selecionada a colônia que apresentou maior quantidade de proteína expressa. Como apresentado no gel de SDS-PAGE 15% da Figura 14, no poço 6 estava presente a colônia que apresentou melhor desempenho esta foi alíquotada e armazenada em glicerol 40% a -20 °C.

Após a indução a suspensão bacteriana (*pellet*) resuspendida em solução de lise foi sonicada em protocolo anteriormente descrito e ao ser analisado este produto de lise constatou-se que a banda correspondente ao peso molecular da rk39 (37kDa) apresentou-se predominantemente no sobrenadante o que sinaliza que a proteína é solúvel (Figura 15).

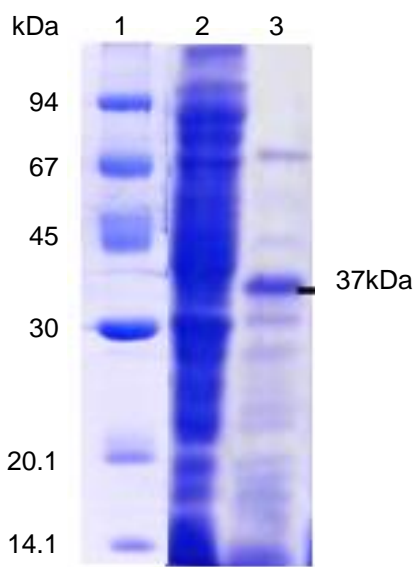
Figura 14 - Expressão de diferentes colônias de BL21(DE3) transformadas com o plasmídeos recombinantes pET-28a-k39



Legenda: Gel SDS-PAGE 15% corado com comassie blue. (1) Marcador de peso molecular; (2 - 11) BL21-pET-28a sobrenadante (sbnt) de diferentes colônias de bactéria induzidas com IPTG na concentração de 0,5 M.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15 – Teste de solubilidade da proteína rK39 expressa em cultura bacteriana de *E. coli* BL21(DE3)



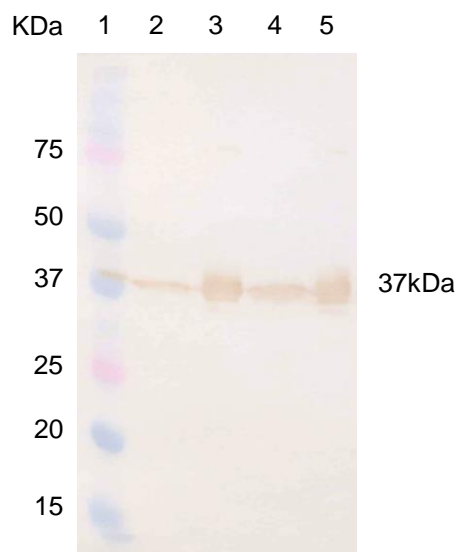
Legenda: Gel SDS-PAGE 15% corado com comassie blue. (1) Marcador de peso molecular; (2) fração insolúvel da cultura bacteriana e (3) fração solúvel, indicando a banda que seria correspondente à proteína rK39, 37kDa.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O vetor de expressão pET-28a codifica uma calda de fusão *N-terminal His-Tag* junto com a proteína k39, dessa forma, a proteína rk39 após expressa contém no sítio de restrição na terminação 5' uma cauda de purificação de 19 aminoácidos contendo 6 histidinas, que facilita a obtenção durante a etapa de purificação e na terminação 3' contém um *codon* de terminação, seguido pelo sítio de restrição.

A presença dessa calda de histidina permitiu confirmar a proteína rk39 por meio da técnica de *Western Blotting* utilizando o anticorpo anti-histidina, que reconhece e se liga a calda de histidina presente na proteína. Assim, na revelação da membrana de nitrocelulose, observou-se a presença de proteína tanto na fração solúvel (sobrenadante) como na fração insolúvel (*pellet*), mas a concentração da proteína mostrou-se maior no sobrenadante do que no *pellet*. As bandas marcadas pelo anticorpo correspondem a k39, pois possuem massa molecular de 37 kDa, quando comparado com o marcador de peso molecular (Figura 16).

Figura 16 - Confirmação da presença da rk39 após a lise da cultura bacteriana por *Western Blotting*



Legenda: *Western Blotting* da lise da cultura bacteriana (1) marcador de peso molecular colorido; (2 e 4) *pellet* da cultura lisada de BL2-pET-28a; (3 e 5) sobrenadante da cultura lisada de BL21-pET-28a. A membrana foi incubada com o anticorpo anti-His e IgG anti-mouse e revelada usando o reagente DAB.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.1.4 Purificação da proteína recombinante

A presença da cauda de histidina no processo de purificação da proteína facilita sua retenção e purificação, melhorando a acumulação dos níveis de proteína recombinante, sendo normalmente usada na purificação de grande quantidade de extratos (HAN *et al.*, 2018; ROBICHON, 2011; WINGFIELD, 2015).

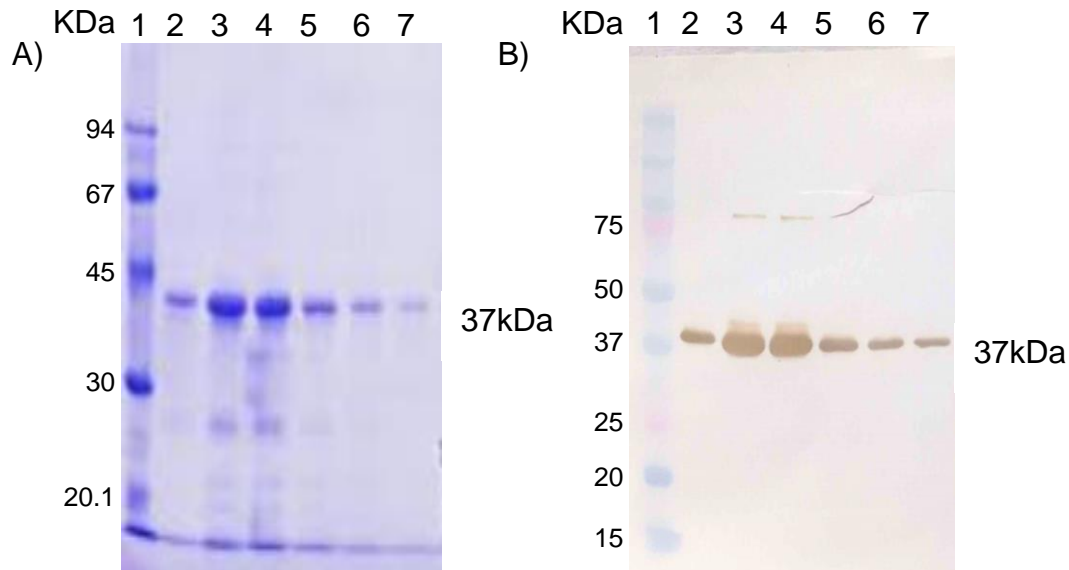
A técnica utilizada para a purificação baseia-se na afinidade que íons metálicos imobilizados, possuem por grupos presentes na superfície de moléculas. A afinidade gerada é uma afinidade reversível, formada entre um íon metálico quelatado como o níquel e moléculas como imidazol, tiol e indol. Assim, aminoácidos que possuem moléculas de elevada afinidade ao metal, como a histidina, ficam retidos na coluna, isso permite a purificação de proteínas recombinantes através da cauda de histidina.

A eluição das proteínas foi feita utilizando alta concentração de imidazol, que possui elevada afinidade a metais. O imidazol compete com a histidina pelos sítios de ligações liberando-a. Todas as frações eluídas durante o processo cromatográfico foram analisadas por SDS-PAGE 15%. A Figura 17 mostra a migração das proteínas, presente nos eluídos advindos da coluna de Ni.

O produto purificado foi confirmado pela imunoreatividade contra o anticorpo *anti-His* por meio da técnica de *Western Blotting* (Figura 17). A proteína rk39 foi detectada no peso molecular esperado de aproximadamente 37 kDa, confirmando a presença da proteína. Em torno de 75 kDa marcaram duas bandas que podem ser correspondente a dímeros da k39.

Obteve-se, nesse trabalho, a confirmação e purificação da proteína rk39 em sistema procaríoto. A produção de proteína rk39 expressa em eucarioto não foi descrita por estar vinculado a uma patente, dessa forma, o material foi cedido gentilmente pelo laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular da UECE para ser utilizado no presente estudo. A produção da k39 em eucarioto foi realizada em *Nicotiana benthamiana* por técnica de infiltração.

Figura 17 - Confirmação da proteína rK39 produzida em *E. coli* após a purificação por cromatografia de afinidade ao níquel



Legenda: (A) Gel SDS-PAGE 15% corado com comassie blue e (B) *Western Blotting* em membrana de nitrocelulose dos eluídos da proteína rK39 purificada em coluna de cromatográfica de níquel. (1) marcador de peso molecular (2 – 7) eluídos de 1 a 6 advindos da coluna de purificação.

Fonte: Elaborado pelo autor.

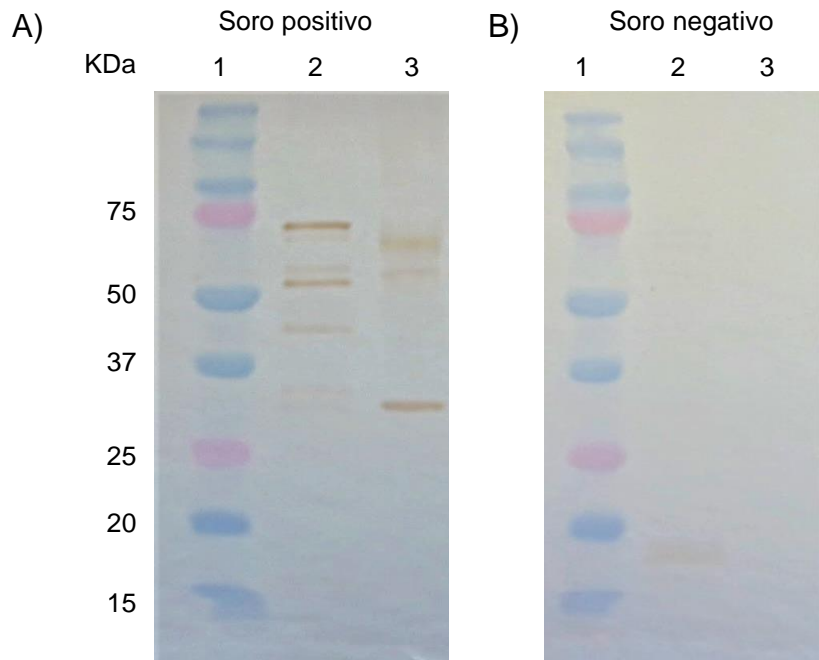
A produção de proteínas em plantas pode apresentar uma maior eficiência do que na *E. coli* principalmente por esse sistema apresentar uma menor possibilidade de reação inespecífica contra impurezas advindos do processo de expressão. Sabe-se que o soro do animal pode conter anticorpos que podem reagir com outros antígenos a qual o animal esteve exposto anteriormente. A produção de proteínas em sistema procarioto pode carrear impurezas da *E. coli* junto com a proteína de interesse, gerando reações inespecíficas com o soro do animal, que podem levar a resultados falso-positivos (MALAJOVICH, 2016).

Para avaliar a presença de possíveis reações inespecíficas à eventuais impurezas que possam estar presentes junto com os antígenos foi realizado um *Western Blotting* com os extratos totais da bactéria e da planta sem a expressão da proteína recombinante, contra os soros dos controles negativo e positivo, a fim de, avaliar a possibilidade de reação com os mesmos. O soro do controle positivo utilizado no *Western Blotting* apresentou reatividade com os dois extratos, marcando bandas inespecíficas, em diferentes alturas. Pode-se observar com o *Western Blotting* que

mesmo ocorrendo reação com os soros a quantidade de bandas inespecíficas que reagiu foi maior com o extrato da bactéria do que com o extrato da planta (Figura 18).

O resultado gerado mostra que o soro do cão possui anticorpos que podem reagir a impurezas, caso a proteína não esteja 100% pura, podendo levar a resultados falsos positivos, mas a possibilidade dessas reações acontecerem é maior utilizando a plataforma procariótica do que a eucariótica. Ao testar o soro do controle negativo observa-se a presença de uma banda baixa reagindo com o extrato da *E. coli*. Não houve reação do controle negativo com o extrato da planta.

Figura 18 – Western Blotting dos extratos totais de Bactéria e Planta incubados com os soros do controle positivo e negativo



Legenda: Western Blotting em membranas de nitrocelulose dos extratos totais contendo: (1) marcador de peso molecular; (2) 10 ug de extrato total da cultura de *E. coli*; (3) 10 ug de extrato total da folha de *N. benthamiana* macerada mecanicamente. A membrana "A" foi incubada no anticorpo primário com soro do animal diagnosticado com LVC (Soro do controle positivo) na diluição 1:160 e a membrana "B" incubada com soro do animal negativo para LVC (Soro do controle negativo) na diluição 1:160. O anticorpo secundário utilizado foi o IgG anti-DOG conjugado a peroxidase.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Esse teste foi feito com o extrato total (cultura de *E. coli* induzida e folha apenas macerada). Para a expressão e obtenção da proteína final em ambas as plataformas a proteína passa por etapas de purificação que diminuem a quantidade de

impurezas presentes. Não houve presença nos *Western Blotting* dos extratos totais a presença de proteínas na mesma faixa de interesse da k39 de 37 kDa.

O resultado do *Western Blotting* mostrou que para se usar a proteína recombinante produzida nos dois sistemas de expressão faz-se necessário a aplicação de protocolos de purificação eficientes, principalmente ao usar a plataforma procariótica, para se ter um produto mais puro para utilizar em kits de diagnósticos. Quanto mais pura for a amostra menos reações inespecíficas ela terá, tornando o antígeno mais específico e sensível.

5.2 SORODIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL POR ELISA

5.2.1 Padronização da técnica de ELISA

A proteína rk39 expressa em *E. coli* têm apresentado resultados satisfatórios em testes de ELISA para detecção de anticorpos de LV em ensaios preliminares. Relatos encontrados em diferentes trabalhos mostram que o antígeno recombinante apresenta sensibilidade entre 71-100% e especificidade entre 81–100% (LEMOS, 2003; CLEMENTE *et al.*, 2014; GALVÃO, 2016; FREIRE, 2017). Além disso, o uso de antígenos recombinantes aumenta a especificidade de testes de diagnósticos se comparado ao uso de antígenos brutos (MAIA; CAMPINO, 2008).

A padronização do Esaiio Imuno Enzimático (ELISA) com as proteínas mostrou que a presença do Imidazol, utilizado na purificação da k39/procarioto não interferiu nos resultados do ELISA. Porém o mesmo teste utilizando a proteína purificada em planta com triton X-100 (k39/eucarioto) mostrou que em alta concentração esse detergente não-iônico interfere na fixação do antígeno rk39 na placa de ELISA. De forma que, as amostras com alta concentração de triton X-100 apresentaram resultados com baixo ou valores nulos durante a leitura da absorbância. Foi observado que a diluição de 1:10 não interferia na leitura, dessa forma, antes da utilização da amostra provinda do sistema eucarioto, foi necessário diluir a amostra em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M, para que a leitura ocorresse sem interferência.

Foram realizados ensaios para determinar a melhor concentração da proteína e a melhor diluição do anticorpo primário e secundário a ser utilizado. As

leituras mostraram resultados promissores e aproximados entre as concentrações de 8 µg/mL; 4 µg/mL; 2 µg/ml e 1 µg/ml em ambas as proteínas utilizadas. Em vista dos resultados obtidos no ensaio de titulação das proteínas, a concentração de 1 µg/mL foi escolhida para a continuidade dos testes.

A partir da padronização da concentração da proteína realizou-se diluições de 1:10 a 1:1280, de forma seriada, dos soros que representam o anticorpo primário. Nesse ensaio, pode se observar que as diluições 1:40; 1:80 e 1:160 se mostraram mais eficientes quando testadas para a proteína produzido em eucarioto. Porém para a rk39 produzida em procarioto a maior variação de absorbância entre o soro negativo e positivo ocorreu na diluição de 1:160. Diante disso, a diluição 1:160 foi considerada padrão para ser usada para ambas as amostras.

5.2.2 Ensaio das proteínas recombinantes no ELISA para LVC

O teste de ELISA indireto foi realizado com 158 amostras de soros de cães. Dentre elas vinte amostras eram de animais não infectados segundo os testes imunocromático rápido ou DPP® (grupo DPP-), kit utilizado para triagem no diagnóstico de LVC, autorizado pelo ministério da saúde (BRASIL, 2011a; 2011b). Vinte amostras deram positivas no teste DPP®, porém as mesmas se mostraram negativas no teste de ELISA-EIE® (grupo DPP+/EIE-), utilizado como teste confirmatório realizado pelo CCZ, sendo considerados animais soronegativos. As outras amostras foram soros de cães diagnosticados com LVC confirmados com base nos dois testes sorológicos, o DPP® e o ELISA-EIE®. De acordo com a nota técnica Nº 01/2011 CGDTCGLAB/DEVIT/SUS/MS um cão é diagnosticado sorologicamente para LVC quando as duas técnicas (DPP® e ELISA-EIE®) apresentam resultados positivos.

Foi escolhido como controle negativo, para o cálculo do *cut-off*, uma amostra cujo valor de absorbância apresentou-se abaixo da média dos soros negativos, essa escolha foi feita a fim de se ter como controle negativo uma amostra com a maior confiabilidade possível, evitando um falso-positivo. Ao utilizar esse negativo a absorbância gerada para a linha de corte (*cut-off*) foi baixa, positivando amostras diagnosticada anteriormente como negativas. Porém, vale ressaltar que essas amostras

negativas foram submetidas apenas ao teste DPP[®] que possui sensibilidade de 47% em animais assintomáticos (HIRSCHMANN *et al.*, 2015).

O procedimento recomendado pelo programa de vigilância e controle da leishmaniose visceral/ministério da saúde no Brasil é que as amostras de soros sejam submetidas primeiramente ao teste rápido (DPP[®]), para a triagem dos casos de LVC, e as amostra que apresentarem positividade no teste rápido sejam submetidos ao teste de ELISA-EIE[®]. Dessa forma animais negativados pelo DPP[®] não são submetidos ao teste de ELISA-EIE[®] de acordo com o procedimento padrão utilizado pelo CCZ (FUNED, 2015).

O teste imunocromático rápido (DPP[®]) é um teste de fácil leitura e execução, porém apesar de ser preconizado pelo ministério da saúde possui baixa sensibilidade (78%-88%), principalmente em animais assintomáticos (47%), e baixa especificidade (70%-75%) (HIRSCHMANN *et al.*, 2015; PEIXOTO, OLIVEIRA, ROMERO, 2015). Segundo a Bio-Manguinhos (2008), a sensibilidade apresentada pelo ELISA-EIE é de 94,5% e especificidade de 91,8% para amostras de soro (Bio-manguinho, 2008).

Como controle positivo foi escolhido dentre todos os soros de animais positivos, uma amostra que apresentou absorbância maior que a média dos soros positivos. A amostra escolhida para o controle negativo e positivo foi padronizado para ser usado em todas as placas, isso permite a comparação interplacas eliminando o efeito do dia. Assim, além do controle negativo todas as placas tiveram controle positivo e branco (reagente de diluição da proteína).

Diversos estudos publicados demonstram a eficiência da proteína rK39 em testes de diagnósticos para LV com sensibilidade variando entre 93% a 100%, e especificidade entre 84% a 100% (BISUGO *et al.*, 2007; FONSECA, 2013a). Maia e colaboradores em seu estudo (2012), avaliou diversos ensaios sorológicos, utilizando a proteína rk39, concluindo que a mesma é uma excelente opção para uso no sorodiagnóstico da LV principalmente quando é utilizando técnicas de imunocromatografia ou de ELISA. A proteína rK39 também foi utilizada com sucesso para diagnosticar LV em humanos na África e na Índia e apresentou resultados bastante satisfatórios em humanos e cães na América do Sul (VENTURIN *et al.*, 2015).

O resultado obtido no ELISA (rk39/Bactéria) apresentou uma positividade de 97,5% das amostras diagnosticadas pelo CCZ com LVC. Nesse mesmo teste 10 (50%) amostras de animais negativados do grupo DPP- se mostraram negativos no nosso ELISA (rk39/Bactéria) e 6 (30%) amostras negativas do grupo DPP+/EIE- foram negativadas para a rk39 produzida em sistema procarioto, gerando assim, uma especificidade total de 40% sobre as amostras de animais diagnosticados como negativo para LVC (Tabela 4).

Tabela 4: Desempenho do ELISA/Bactéria em amostras de soro de cães negativos para LVC

	Teste ELISA/Bactéria		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
Grupo DPP- (n=20)	10	10	50%
Grupo DPP+/EIE- (n=20)	14	6	30%
TOTAL (n=40)	24	16	40%

Fonte: Elaborado pelo autor

O resultado obtido no ELISA (rk39/Planta) gerou uma positividade de 99,2% entre as amostras de animais positivas. Do grupo DPP- de animais negativos 7 (35%) amostras deram negativos no nosso ELISA e do grupo DPP+/EIE- 5 (25%) amostras de animais foram negativados no ELISA (rk39/Planta). Assim o nosso teste com a proteína expressa em planta apresentou uma especificidade de 30% (Tabela 5).

Tabela 5: Desempenho do ELISA/Planta em amostras de soro de cães negativos para LVC

	Teste ELISA/Planta		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
Grupo DPP- (n=20)	13	7	35%
Grupo DPP+/EIE- (n=20)	15	5	25%
TOTAL (n=40)	28	12	30%

Fonte: Elaborado pelo autor

Os resultados obtidos com os dois antígenos foram próximos. A especificidade e a sensibilidade apresentado pela rK39 da bactéria foi de 40% e 97,5%, enquanto que a rK39 da planta apresentou 30% e 99,2%, respectivamente. Dos 20 soros negativos do grupo DPP-, 17 soros apresentaram resultados iguais nos dois testes (7 foram negativos e 10 positivos). De forma que apenas 3 amostras desse grupo apresentaram resultados divergentes, essas amostras marcaram positivas na rk39/Planta e negativos na rk39/Bactéria.

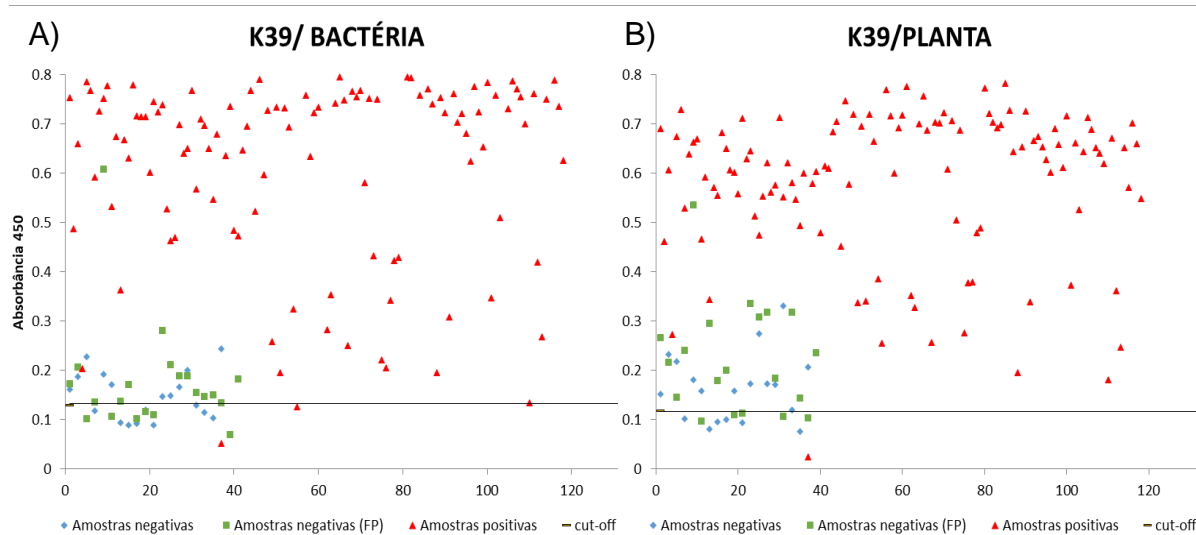
No grupo DPP+/EIE- 17 soros apresentaram resultados iguais em ambos os testes (13 positivos e 4 negativos) e 3 amostras foram divergentes, 2 foram positivas na planta e negativas no antígeno da bactéria e a outra teve resultado positivo na rk39/Bactéria e negativo na rk39/Planta.

A baixa especificidade encontrada com esse teste pode ter sido devido a absorvância do *cut-off*. Por outro lado, os testes utilizados para diagnosticar esses animais, apesar de serem testes preconizados pelo ministério da saúde ambos não apresentam 100% de especificidade e sensibilidade. Dessa forma esses animais soronegativos no DPP podem está infectados.

A principal medida de controle aplicada contra a LVC ainda é a eutanásia de animais soropositivos, pois esses animais tem alta carga parasitaria na pele sendo fontes de infecções para os vetores. Levando em consideração que Fortaleza é uma cidade endêmica com alta predominância de LVC em animais sintomáticos e assintomáticos essa medida de controle deveria trazer uma diminuição da prevalência da doença em humanos e animais, porém essa medida não tem gerado os resultados esperado (RODRIGUES *et al.*, 2017). Esse fato corrobora para a possibilidade de que os resultados apresentados com os testes de diagnósticos, atualmente disponibilizados, possam esta levando a resultados falsos negativos, contribuindo assim para a manutenção de animais infectados (RODRIGUES *et al.*, 2017).

O resultado obtido com a análise do *cut-off*, utilizado como parâmetro para distingui animais positivos dos negativos, foi aplicado também para avaliar a especificidade e sensibilidade do teste, além da análise da curva ROC. Os resultados obtidos por ELISA estão demonstrados na Figura 19.

Figura 19- Avaliação das proteínas rk39 de procarioto e eucarioto frente a soros de animais positivos e negativos para LVC por ELISA indireto



Legenda: Resultado obtidos com o ELISA indireto das duas proteínas com leitura a 450 nm. Os Gráficos mostram as absorbâncias geradas pelos soros de animais positivos (DPP+/EIE+), negativos (DPP-) e negativos-FP (DPP+/EIE-) testadas com a proteína rk39/procarioto (Gráfico A) e com a proteína rk39/eucarioto (Gráfico B). O *cut-off* de cada teste está representado nos gráficos pela linha horizontal preta.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Foram obtidos os seguintes resultados com a análise estatística do antígeno rk39/bactéria: valor preditivo positivo 82,73%, valor preditivo negativo 84,21%, razão de verossimilhança positivo 1.62, razão de verossimilhança negativo 0.064 e acurácia de 82,91%.

A análise estatística do antígeno rk39/planta gerou como resultado: valor preditivo positivo 80,69%, valor preditivo negativo 92,31%, razão de verossimilhança positivo 1.42, razão de verossimilhança negativo 0.03 e acurácia de 81.65%.

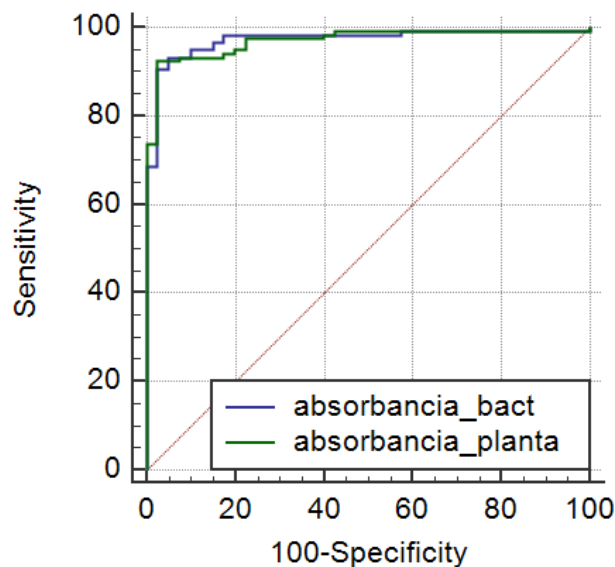
Os valores obtidos com o ELISA foram aplicados a curva ROC, o qual consiste na representação gráfica da sensibilidade (verdadeiro positivo) no eixo vertical e da especificidade (taxa de falso positivo) no eixo horizontal. Cada ponto no gráfico representa os valores dos referidos índices sendo consideradas significativas as diferenças de valores de $p < 0,05$ (Tabela 6 e Figura 20).

Tabela 6 - Área sob a curva ROC (AUC)

Antígeno	Área (AUC)	Curva de erro	95% intervalo de confiabilidade	Nível de significância
rK39/Bactéria	0,973	0,0128	0,934 to 0,992	<0,0001
rK39/Planta	0,970	0,0125	0,930 to 0,991	<0,0001

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 20- Curva ROC das proteínas rK39/Procarioto e rK39/Eucarioto



Fonte: Elaborada pelo autor

O uso do ELISA em testes de diagnósticos tem como vantagens a facilidade e versatilidade permitindo testar um grande número de animais em um curto período de tempo e podendo ser utilizado com diversos tipos de antígenos. A rk39 apresentou alta sensibilidade. Ao comparar os resultados gerados das proteínas, pode ser observado que a proteína expressa em eucarioto apresentou resultados melhores de sensibilidade do que a rk39 expressa em procarioto.

Apesar de a especificidade da rk39/eucarioto ter se apresentado mais baixa do que da rk39/procarioto a significância do teste não deve ser ignorada. Ao comparar os resultados dos valores de absorvância, representados em gráficos, nos dois testes

pode se observar que no teste da rk39/eucarioto a diferença de absorvância encontrada entre soros negativos e positivos foi maior do que contra a rk39/procarioto. Além disso, os resultados encontrados nesse teste de ELISA foram comparados aos resultados advindos dos testes atualmente realizados pelo CCZ, que utilizam o DPP® e o ELISA-EIE® para diagnóstico de animais com leishmaniose, porém sabe-se que nenhum dos dois testes apresenta 100% de especificidade e sensibilidade.

Logo os resultados obtidos com o presente trabalho indicam que a rk39 expressa em eucarioto pode ser utilizada como um antígeno substituto do antígeno rk39 expresso em plataforma procariótica, podendo ser utilizado em kits de diagnóstico de LVC. Obtivemos resultados de sensibilidade e especificidade semelhantes entre as duas plataformas de expressão. O antígeno (rk39/planta) teve resultados excelentes de sensibilidade (99,2%) apesar de a especificidade ter sido baixa (30%), no presente estudo. Porém faz-se necessário um estudo mais detalhado das amostras negativas, afim de, realmente confirmar se as mesmas são realmente negativas ou se trata de amostras falso-negativas.

Esse estudo realizou testes iniciais de sensibilidade de especificidade por ELISA indireto, porém faz-se necessário a ampliação dos testes do ELISA, com um "N" maior de soros positivos e negativos, para confirmar a sensibilidade e especificidade. Futuramente pretende-se também testar a proteína recombinante contra soros de animais confirmados com outras patogenias, com o intuito de avaliar a possibilidade de reação cruzadas com outras infecções.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo, ambas as proteínas recombinantes k39 expressas em diferentes plataformas mostraram-se promissoras para a utilização no imunodiagnóstico para leishmaniose visceral caninca. Entretanto, a rk39 proveniente da plataforma vegetal apresentou-se mais sensível, com 99% de sensibilidade. Além disso, essa plataforma oferece menor custo de produção e biointerferência quanto comparado com a produzida em sistema procarioto, tornando-a uma candidata para uso no diagnóstico da doença e em estudos epidemiológicos, podendo substituir proteínas provenientes da plataforma procariótica. Entretanto, ainda faz-se necessário mais estudos utilizando amostras indubitavelmente positivas e negativas para a padronização da técnica utilizando-se rk39 oriunda de sistema vegetal.

REFERÊNCIAS

AHMAD, I. et al. Overcoming challenges for amplified expression of recombinant proteins using *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, [S.l.], v. 144, p.12-18, nov. 2017.

AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **Plos Neglected Tropical Diseases**, France, v. 10, n. 3, p.1-40, mar. 2016.

AMARO, Marilane de Oliveira Fani. **Construção de um sistema de expressão da proteína não estrutural (NS1) do vírus dengue-2 em *Nicotiana tabacum* “Havana” e análise da expressão do transgene**. 2009. 59 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.

ANNÉ, Jozef; ECONOMOU, Anastassios; BERNAERTS, Kristel. Protein Secretion in Gram-Positive Bacteria: From Multiple Pathways to Biotechnology. Protein and Sugar Export and Assembly in Gram-positive Bacteria. **Current topics in microbiology and immunology**, [S.l.], v. 404, p. 267-308, nov. 2016.

ANURACPREEDA, Panat; CHAWENKIRTTIKUL, Runglawan; SOBHON, Prasert. Immunodiagnosis of *Fasciola gigantica* infection using monoclonal antibody-based sandwich ELISA and immunochromatographic assay for detection of circulating cathepsin L1 protease. **PloS one**, [S.l.], v. 11, n. 1, p. e0145650, 2016.

ARAÚJO, A. F. et al. Leishmanioses no município de chapada dos Guimarães: Leishmaniasis in the municipality of chapada Guimarães. **Coorte - Revista Científica do Hospital Santa Rosa**, n. 5, p.44-49, 2015.

ARBBER, Werner. Restriction endonucleases. **Angewandte Chemie International Edition**, [S.l.], v. 17, n. 2, p. 73-79, fev. 1978.

ASSIS, T. S. M. de et al. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana: Validation of the Rapid Immunochromatographic Test IT-LEISH® for the Diagnosis of Human Visceral Leishmaniasis. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 17, n. 2, p.107-116, abr./jun. 2008.

BAGUES, Naiara Carvalho Teixeira. **Contribuição para o desenvolvimento de uma vacina contra leishmaniose visceral canina**. 2016. 98 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

BAKIRCI, S. et al. Molecular and seroprevalence of canine visceral leishmaniasis in West Anatolia, Turkey. **Turkish Journal Of Veterinary And Animal Sciences**, [S.l.], v. 40, p.637-644, mar. 2016.

- BALANCO, José Mário de Freitas. **Mimetismo apoptótico em Leishmania sp: papel na interação parasito/hospedeiro**. 2004. 119 f. Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- BARBOSA, Isabelle Ribeiro. Leishmaniose visceral humana no município de Natal-RN: Análise clínico-epidemiológica e espacial/ Human visceral leishmaniasis in Natal-RN: clinicaledpidemiological and spatial analysis. **Revista Ciência Plural**, Natal, v. 2, n. 1, p.89-101, 2016.
- BARBOSA, Pedranne Kelle de Araújo. **Análise in silico da HSP83 de Leishmania chagasi: implicações para antigenicidade e evolução**. 2005. 98 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.
- BARI, Arfan Ul. Chronology of cutaneous leishmaniasis: An overview of the history of the disease. **Journal Of Pakistan Association Of Dermatologists**, Muzaffarabad, v. 16, n. 1, p. 24-27, jan. 2006.
- BARTA, A. et al. The expression of a nopaline synthase - human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. **Plant Molecular Biology**, [S.l.], v. 6, n. 5, p. 347–357, set. 1986.
- BASANO, Sergio de Almeida; CAMARGO, Luís Marcelo Aranha. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev. bras. epidemiol**, São Paulo , v. 7, n. 3, p. 328-337, set. 2004 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-790X2004000300010&lng=pt&nrm=iso>. acesso em: 28 maio. 2017.
- BATES, Paul Andrew. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal For Parasitology**, [S.l.], v. 37, n. 10, p.1097-1106, ago. 2007.
- BEIHAGHI, M. et al. Transient Expression of CCL21 as recombinant protein in tomato, **Biotechnology Reports**, [S.l.], v. 17, p. 10-15, mar. 2018.
- BIO-MANGUINHOS. **Manual de instrução de uso: EIE – Leishmaniose visceral canina** Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro. 2008. 17p.
- BISUGO, M. C. et al. Avaliação do diagnóstico da visceral canina com a utilização de teste rápido com antígeno recombinante K39 em regiões endêmicas do estado de São Paulo.: Assessment of canine visceral leishmaniasis diagnosis by means of a rapid test using recombinant antigen K39 in endemic regions of São Paulo state, Brazil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 2, p.185-193, 2007.
- BLATTNER, F. R. et al. The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. **Science**, [S.l.], v. 277, n. 5331, p. 1453-1462, 1997.

BONNET, Raquel Medeiros Vasques. **Efeito de candidatos a supressores de silenciamento gênico viral em expressão de proteína recombinante em plantas.** 2010. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) - Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2010.

BONOMO, J. H. et al. Caracterização da morfologia de *E. coli* e da produção de proteína recombinante sob diferentes níveis de indução. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 20., 2014, São Paulo. **Anais ...** São Paulo: Editora, 2015. p.678-685.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [S.l.], v. 72, p. 248–254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação Geral da Doenças Transmissíveis. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Nota Técnica N° 48/2011, de 19 de setembro de 2011.** Esclarecimentos sobre o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina utilizado na rede pública de saúde, 2011a.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância e saúde.** Brasília: Ed. 1, 2016. 775 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral.** Brasília: Ed. 6, n. 3, 2006. 120 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral.** Brasília: Ed. 1, n. 5, 2014. 122 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria do Estado da Saúde. **Nota técnica conjunta no 01/2001 – CGDT/DEVIT/SUS/MS.** Esclarecimento sobre a substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). Brasília: Ministério da Saúde, 2011b.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância de A a Z. Leishmaniose visceral.** Brasília-DF, 2017b. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=11022&Itemid=668>. Acesso em: 27 Setembro, 2017b.

BURNS, J. M. et al. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proc. Natl. Acad. Sci.** New York, v. 90, n. 2, p. 775-779, jan. 1993.

CALVETE, Crislaine Lambiase; CASEIRO, Marcos Montani; SOUZA, Cleide Barbieri de. Biotecnologia: transformação bacteriana por método de choque térmico: biotechnology:

bacterial transformation method for thermal shock. **Revista Unilus Ensino e Pesquisa**, São Paulo, v. 12, n. 26, p.41-53, jan./mar. 2015. Disponível em: <<http://revista.lusiada.br/portal/index.php/ruep>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

CAMPBELL, K. H. S. et al. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. **Nature**, [S.l.], v. 380, n. 6569, p. 64, 1996.

CARIDAD, María Jesús Corral. **Antileishmanial activity of Allicin: mechanism of action, "in vivo" efficacy and value in combined therapy with Amphotericin B**. 2015. 336 f. Tese (Doutorado em Veterinaria) - Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 2015.

CATTAND, P. et al. Tropical diseases lacking adequate control measures: dengue, leishmaniasis, and African trypanosomiasis. **Disease control priorities in developing countries**, New York, v. 23, n. 2, 2006.

CAVALCANTE, Ítalo José Mesquita; VALE, Marcus Raimundo. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral (calazar) no Ceará no período de 2007 a 2011. **Revista brasileira de epidemiologia**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 911-924, dez. 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-790X2014000400911&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 29 out. 2017.

CEARÁ. Governo do Estado do Ceará. Secretaria da saúde. **Boletim epidemiológico: Leishmaniose visceral**, Ceará, nov. 2017, 9 p. Disponível em: <<http://www.saude.ce.gov.br/index.php/boletins?download=3415%3Aboletim-epidemiologico-leishmaniose-visceral-17-de-novembro-de-2017>>. acesso em: 15 dez. 2017a.

_____. Secretaria da saúde do estado do Ceará. **Boletim epidemiológico: Leishmaniose visceral**, Ceará, out. 2011.

_____. Secretaria da saúde do estado do Ceará. **Informe Epidemiológico Leishmaniose**. Fortaleza: [s.n], 2014.

Centers for Disease Control and Prevention (CDCP). Public Health Image Library (DPDx). **Net**, 2018. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html#>> Acesso em: 01 Jan. 2018a.

Centers for Disease Control and Prevention (CDCP). Public Health Image Library (PHIL). **Net**, 2018b. Disponível em: <<https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=10277>>. Acesso em: 01 Jan. 2018.

CHANCE, Britton; SIES, Helmut; BOVERIS, Alberto. Hydroperoxide Metabolism in Mammalian Organs. **Physiological Reviews**, U.S.A., v. 59, n. 3, p.527-605, jul. 1979.

- CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A. et al. Sensitive and Specific Serodiagnosis of *Leishmania infantum* Infection in Dogs by Using Peptides Selected from Hypothetical Proteins Identified by an Immunoproteomic Approach Miguel. **Clinical And Vaccine Immunology**. Washington, v. 20, n. 6, p. 835-841, jun. 2013.
- CHOWDHURY, R. et al. How Far Are We from Visceral Leishmaniasis Elimination in Bangladesh? An Assessment of Epidemiological Surveillance Data. **Plos Neglected Tropical Diseases**, New York, v. 8, n. 8, p.1-13, ago. 2014.
- CLEMENTE, W. T. et al. High Prevalence of Asymptomatic *Leishmania* spp. Infection Among Liver Transplant Recipients and Donors From an Endemic Area of Brazil. **American Journal Transplant**, [S.l.], v.14, n. 1, p.96-101, jan. 2014.
- COELHO, E. A. F. et al. Evaluation of two recombinant *Leishmania* proteins identified by an immunoproteomic approach as tools for the serodiagnosis of canine visceral and human tegumentary leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, [S.l.], v. 215, p.63-71, jan. 2016.
- COGGON, T.; ROSE, G.; BARKER, D. J. Measurement, error and bias. In: COGGON, T.; ROSE, G.; BARKER, D.J. (Ed.). **Epidemiology for the uninitiated**. London: BMJ Publishing Group, v. 3, p.20-25, 1993.
- COHEN, S. N. et al. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, U.S.A., v. 70, n. 11, p. 3240-3244, nov. 1973.
- COSTA, Laura Pires da Mata. **Avaliação de diferentes meios de cultivo na expressão do antígeno 503 de leishmania *L. chagasi* em *Escherichia coli***. 2016. 47 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) - Curso de Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.
- DABIRI, Koroush; MOTAZEDIAN, Mohammad Hossein; MIKAEILI, Fattaneh. The investigation of the infected hunted mice in Karandish and Kaveh terminals of Shiraz to Leishmaniasis with PCR method in 2015. **International Journal Of Medical Research & Health Sciences**, U.K, v. 5, n. 11, p.726-735, 2016.
- DALE, Philip J. R & D regulation and field trialling of transgenic crops. **Trends in Biotechnology**, [S.l.], v. 13, n. 9, p. 398-403, 1995.
- DANTAS-TORRES, Filipe. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, [S.l.], v. 149, n. 3-4, p.139-146, nov. 2007.
- DATTA, Salil C.; GUPTA, Shreedhara; RAYCHAUDHURY, Bikramjit. Repair of Impaired Host Peroxisomal Properties Cropped Up Due to Visceral Leishmaniasis May Lead to Overcome Peroxisome Related Genetic Disorder Which May Develop Later After

Treatment. **Advances In The Study Of Genetic Disorders**, [S.l.], p.333-356, nov. 2011.

DE ABREU, R. A. et al. Avaliação da composição do meio de cultivo na produção da proteína recombinante paolp de *Physalis angulata* em *Escherichia coli* recombinante. **Revista Saúde & Ciência Online**, [S.l.], v. 3, n. 3, p. 18-25, 2014.

DIAS, D. S. et al. Serological diagnosis and prognostic of tegumentary and visceral leishmaniasis using a conserved *Leishmania* hypothetical protein. **Parasitology international**, [S.l.], v. 67, n. 3, p. 344-350, 2018.

DONOVAN, C. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. **British Medical Journal**, [S.l.], v. 1, n. 2213, p. 1252-1254, jul./ago. 1903.

DUARTE, Joelma Leite da Silva. **Aspectos Epidemiológicos da Leishmaniose Visceral no Município de Rondonópolis, Mato Grosso, 2003-2008**. 2010. 116 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, 2010.

FAEZI, S. et al. Molecular characterization and Functional Analysis of the PilQ380-706: a Novel Secretin Domain in *Pseudomonas aeruginosa*. **Avicenna journal of medical biotechnology**, [S.l.], v. 10, n. 1, p. 34, 2018.

FARIA, Angélica Rosa. **Produção e avaliação de duas proteínas quiméricas - PQ10 e PQ20- quanto à imunogenicidade e uso em imunodiagnóstico para leishmaniose visceral canina**. 2014. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte, 2014.

FARIA, Angélica Rosa; ANDRADE, Héli da Monteiro de. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Rev Pan-Amaz Saude**, Ananindeua, v. 3, n. 2, p. 47-57, jun. 2012. Disponível em <http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232012000200007&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 31 jan. 2017.

FERNANDES, Kelly de Souza. **Estudo das interações da miltefosina com membranas de L. (Leishmania) amazonensis e macrófagos peritoneais**. 2016. 146 f. Tese (Doutorado em Física) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

FERRO, Emer Suavinho. Biotecnologia translacional: hemopressina e outros peptídeos intracelulares. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 24, n. 70, p.109-121, 2010.

FLORINDO, M. I. et al. Immune response induced in mice by oral immunization with cowpea severe mosaic virus. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v.35, n. 7, p.827-835, jul. 2002.

FONSECA, Aliani Moura. **Diagnóstico da leishmaniose visceral utilizando proteínas de Leishmania infantum com função desconhecida**. 2013. 74 f. Dissertação

(Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013b.

FONSECA, Giuliana Schmidt França. **Avaliação do desempenho de diferentes métodos no diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral humana.** 2013. 65 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2013.

FREIRE, Mariana Lourenço. **Avaliação de desempenho e custos diretos de kits comercialmente disponíveis no Brasil e do protótipo DAT-LPC para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana.** 2017. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências - Concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto René Rachou, Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde, Belo Horizonte, 2017.

GALVÃO, Amanda Carla Acipreste. **Diagnóstico de situação epidemiológica da leishmaniose visceral canina em de Rio Verde-GO.** 2016. 105 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias e Veterinárias) - Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2016.

GARCÍA, V. S. et al. Development of a simple and economical diagnostic test for canine leishmaniasis. **Experimental parasitology**, [S.l.], v. 182, p. 9-15, 2017.

GELVIN, Stanton B. Agricultural biotechnology: Gene exchange by design. **Nature**, [S.l.], v. 433, n. 7026, p. 583- 584, fev. 2005.

GENARO O, et al. Leishmaniose Visceral Americana. In.: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana.** São Paulo: Atheneu, Ed. 10 . p.56-72, 2000.

GIBSON, D. G. et al. Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome. **Science**, [S.l.], v. 329, n. 5987, p.52-56, jul. 2010.

GOLDBERG, Alfred L.; WITTES, Robert E. Genetic code: aspects of organization. **Science**, [S.l.], v. 153, n. 3734, p. 420-424, jul. 1966.

GONTIJO, Bernardo; CARVALHO, Maria de Lourdes Ribeiro de. Leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba , v. 36, n. 1, p. 71-80, jan. 2003 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822003000100011&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 31 jul. 2017a.

GONTIJO, Célia Maria Ferreira; MELO, Maria Norma. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev. bras. epidemiol.**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 338-349, sept. 2004 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-790X2004000300011&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 31 out. 2017b.

GOODIN, M. M. et al. Nicotiana benthamiana: Its History and Future as a Model for Plant-Pathogen Interactions. **Molecular plant-microbe interactions: MPMI**, [S.l.], v. 21, n. 8, p. 1015-1026, ago. 2008.

GOTO, Y. et al. Cloning, characterization, and serodiagnostic evaluation of Leishmania infantum tandem repeat proteins. **Infect. Immun.**, [S.l.], v. 74, n. 7, p. 3939- 3945, 2006.

GUIMARAES, A. G. F. et al . Spatial analysis of visceral leishmaniasis in the municipality of Rondonópolis, in the Brazilian State of Mato Grosso, from 2003 to 2012: human, canine and vector distribution in areas of disease transmission. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba , v. 48, n. 3, p. 291-300, Jun. 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822015000300291&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 02 maio 2018.

HAN, Y. et al. High-level expression of soluble recombinant proteins in Escherichia coli using an HE-maltotriose-binding protein fusion tag. **Protein expression and purification**, [S.l.], v. 142, p. 25-31, 2018.

HATANAKA, V.M.A.; BENSEÑOR, Isabela .M. Avaliação de testes diagnósticos. In: _____. **Epidemiologia – Abordagem prática**. São Paulo: Sarvier, Ed: 1, 2005. p.221-244

HIRSCHMANN, L. C. et al. Leishmaniose visceral canina: comparação de métodos sorológicos em cães de área indene do Rio Grande do Sul no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, [S.l.], v. 44, n. 1, p. 33-44, 2015.

HOSEINI, Sayed Shahabuddin; SAUER, Martin G. Molecular cloning using polymerase chain reaction, an educational guide for cellular engineering. **Journal of biological engineering**, [S.l.], v. 9, n. 1, p. 2, 2015.

HUANG, Chung J.; LIN, Henry; YANG, Xiaoming. Industrial production of recombinant therapeutics in Escherichia coli and its recent advancements. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, [S.l.], v. 39, n. 3, p. 383-399, mar. 2012.

ISABEL, Thais Ferreira. **Leishmaniose Visceral canina: Clonagem e expressão das proteínas Lc24 e Lc36 de L. chagasi com potencial aplicação no diagnóstico e desenvolvimento de vacina**. 2010. 108 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Programa de Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

JÚNIOR, Eudson Maia de. **Validação do teste imunocromatográfico rápido dual path platform para o diagnóstico da leishmaníase visceral canina**. 2011. 77 f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2011.

JÚNIOR, Marcos Vinicius de Santana Leandro. **Análise comparativa do teste imunocromatográfico DPP- Biomanguinhos com ELISA e RIFI no diagnóstico da leishmaniose visceral canina.** 2014. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Fisiopatologia Experimental, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

JUSI, M. M. G. et al. Expression of a recombinant protein, A2 family, from *Leishmania infantum* (Jaboticabal strain) and its evaluation in Canine Visceral Leishmaniasis serological test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [S.l.], v. 24, n. 3, p. 309-316, 2015.

KERN, Marcelo Fernando. **Expressão de uma quitinase de *Metarhizium anisopliae* em *Nicotiana tabacum* : obtenção de plantas transgênicas resistentes a doenças fúngicas.** 2003. 83 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Porto Alegre, 2003.

KLAFKE, Gabriel Baracy. **Integração e expressão do gene *ltb-r1* em plantas de tabaco:** Integration and expression of *ltb-r1* in tobacco plants. 2010. 63 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/123456789/1282>>. Acesso em: 25 mar. 2017.

KONTOS, V. J.; KOUTINAS, A. F. Old world canine leishmaniasis, **The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian, USA**, v. 15, p. 949- 959, 1993.

LAINSON Ralph, SHAW Jeffrey J. A brief history of the genus *Leishmania* (protozoa: kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. **Jornal of the Brazilian Association for the advancement of Science**, São Paulo, v. 44, n. 2/3, p. 94-106, 1992.

LAINSON Ralph. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W., Killick-Kendrick, R. (Eds.), **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. [S.l.], v.1. London: Academic Press, 1987. p. 1-120.

LEHMAN, I. R. et al. Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid. I. Preparation of Substrates and Partial Purification of an Enzyme from *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, [S.l.], v. 233, n. 1, p. 163-170, 1958.

LEMOS, E. M. et al. Avaliação do teste rápido utilizando o antígeno recombinante K39 no diagnóstico da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S.l.], v. 36, p. 36-38, 2003.

LEWIS, D. J. et al. Proposals for a stable classification of the Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). **Systematic Entomology**, [S.l.], v. 2, n. 4, p.319-332, out. 1977.

- LIMA, B.S.S. et al. Immunoproteomic and bioinformatic approaches to identify secreted *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis*, and *L. infantum* proteins with specific reactivity using canine serum. **Veterinary Parasitology**, [S.l.], v. 223, p.115-119, jun. 2016.
- LIMA, Iraci Duarte de. **Aspectos ambientais e sociais envolvidos na transmissão da *L. chagasi* no município de Parnamirim/RN**. 2009. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Nata, 2009.
- LIMA, Simão Daniel Ferreira. **Produção de proteínas recombinantes através de um novo sistema de fusão em *Escherichia coli***. 2013. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica) - Universidade do Minho, Braga, 2013.
- LIRA, Priscilla de. **Aplicação da tecnologia do DNA recombinante na saúde: riscos e benefícios**. 2016. 22 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Centro Universitário de Brasília - Uniceub, Faculdade de Ciências da Educação e Saúde – Faces, Brasília, 2016.
- LOPES, E. G. et al. Performance of conventional PCRs based on primers directed to nuclear and mitochondrial genes for the detection and identification of *Leishmania* spp. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 58, 2016 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652016005000231&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 4 abr. 2017.
- MADEIRA, Luisa de Moraes. **Expressão de Cyanovirin-N, um microbicida anti-HIV, em plantas**. 2008. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.
- MAGALHÃES, F. B. et al. Evaluation of a new set of recombinant antigens for the serological diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. **PloS one**, [S.l.], v. 12, n. 9, p. 1-18, set. 2017.
- MAIA, Carla.; CAMPINO, Lénea Maria Da Graça. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Vet Parasitol**, [S.l.], v. 158, n. 4, p. 274–287, dez. 2008.
- MAIA, Carla; DEPAQUIT, Jérôme. Can *Sergentomyia* (Diptera, Psychodidae) play a role in the transmission of mammal-infecting *Leishmania*? **Parasite**, [S.l.], v. 23, n. 55, p.1-8, dez. 2016.
- MAIA, Z. et al. Comparative study of rK39 *Leishmania* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S.l.], v. 6, n. 1, p. e1484, 2012.
- MALAJOVICH, Maria Antonia. **Biotecnologia: ensino e divulgação**. 2. ed. Rio de Janeiro: [s.n], 2016.

MANCIANTI, F. et al. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.l.], v. 82, n. 4, p.566-567, jul. 1988.

MARCONDES, M. et al. Validation of a Leishmania infantum ELISA rapid test for serological diagnosis of Leishmania chagasi in dogs. **Veterinary Parasitology**, [S.l.], v. 175, p. 15-19, 2011.

MARTIAL, J. A. et al. Human growth hormone: complementary DNA cloning and expression in bacteria. **Science**, [S.l.], v. 205, n. 4406, p. 602-607, ago. 1979.

MARTINS, Maria Glêndara Aparecida de Souza; DE LIMA, Dilma. Leishmaniose: do diagnóstico ao tratamento. **Enciclopédia biosfera**, Goiânia, v. 9, n. 16, p. 2556-2569, set. 2013.

MARTINS, Marina Vieira. **Avaliação da atividade leishmanicida de compostos hidrazídicos**. 2011. 134 f. Tese (Doutorado em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

MARTINS, V. T. et al. A recombinant chimeric protein composed of human and mice-specific CD4+and CD8+T-cell epitopes protects against visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, [S.l.], v. 39, n. 1, out. 2016.

MARTINS, V. T. et al. Antigenicity, Immunogenicity and Protective Efficacy of Three Proteins Expressed in the Promastigote and Amastigote Stages of Leishmania infantum against Visceral Leishmaniasis. **Plos One**, [S.l.], v. 10, n. 9, p.1-25, set. 2015.

MEDEIROS, I. M.; NASCIMENTO, E. L. T.; HINRISCHSEN, S. L. Leishmanioses (visceral e tegumentar). In: Hinrichsen S. L. **Doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2005. p. 398-409.

MENDES, T. M. et al. Epitope mapping of recombinant Leishmania donovani virulence factor A2 (recLdVFA2) and canine leishmaniasis diagnosis using a derived synthetic bi-epitope. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [S.l.], v. 11, n. 5, p. e0005562, maio 2017.

MERLIN, M. et al. Comparative Evaluation of Recombinant Protein Production in Different Biofactories: The Green Perspective. **BioMed Research International**, [S.l.], v. 2014, p. 14, mar. 2014.

MIYAMOTO, Catarina Akiko. Produção de proteínas recombinantes em Escherichia coli. **Revista Conexão Eletrônica**. São Paulo, v. 8, p. 220-233, 2013.

MONTEIRO, Aurilene Gomes. **Diagnóstico molecular e identificação das espécies de Leishmania na leishmaniose visceral canina no Distrito Federal, Brasil**. 2014. 33

f., Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

MORTAZAVIDEHKORDI, N. et al. Evaluation of a novel lentiviral vaccine expressing KMP11-HASPB fusion protein against *Leishmania infantum* in BALB/c mice. **Parasite Immunology**, [S.l.], v. 38, n. 11, p.670-677, out. 2016.

MUGASA, Claire Mack. **Development of simplified molecular tools for the diagnosis of kinetoplast diseases**. 2010. 130 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universiteit van Amsterdam, Host, 2010.

MULLIS, Kary B. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. **Scientific American**, [S.l.], v. 262, n. 4, p. 56–65, 1990.

MUNGALL, A. J. et al. The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. **Nature**, v. 425, n. 6960, p. 805, 2003.

NASCIMENTO, Marília Barbosa do. **Mapeamento de motivos antigênicos e caracterização de novas proteínas de *Leishmania infantum* com potencial para uso no diagnóstico contra a Leishmaniose Visceral**. 2014. 155 f. Tese (Doutorado em Genética) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 12. ed. São Paulo: Editora Atheneu, c. 7, p. 41-47, 2011.

NGUYEN, Minh Thanh. The effect of temperature on the growth of the bacteria *Escherichia coli* DH5 α . **Saint Martin's University Biology Journal**, [S.l.], v. 1, p. 87-94, 2006.

NÓBREGA, Gilzane Dantas. **Comparação entre métodos recombinantes e PCR em tempo real no diagnóstico da leishmaniose visceral canina**. 2014. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

NOGUEIRA, C. T. et al. **Gene LC36, proteína recombinante RLC36, uso da mesma e método para diagnosticar leishmanioses, preferencialmente, leishmaniose visceral canina.**, 2016. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/144553>>. Acesso em 13 dez. 2017.

NOOR, R. et al. Influence of temperature on *Escherichia coli* growth in different culture media. **J Pure Appl Microbiol**, [S.l.], v. 7, n. 2, p. 899-904, 2013.

NOVAGEM. pET-28a-c(+) Vectors. **Net**. 2018. Disponível em: <<https://www.staff.ncl.ac.uk/p.dean/pET28.pdf>>. Acesso em: 13 dez. 2017.

- NOVO, S. P. C. et al. The process of Leishmania infection-disease and new perspectives of paleoparasitology. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [S.l.], v. 58, p. 1-8, 2016.
- NUNES, C. M. et al. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 5-9, 2007.
- OLIVEIRA, T.N.A. et al. Diagnosis and epidemiology of canine leishmaniasis in southeastern Bahia, Brazil. **Genetics And Molecular Research: GMR**, [S.l.], v. 15, n. 3, p.1-10, set. 2016.
- PAIVA-CAVALCANTI, M. de et al. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. **Cell & Bioscience**, [S.l.], v. 5, n. 1, p.1-10, jun. 2015.
- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. WORLD HEALTH ORGANIZATION (PAHO/WHO). **Información general: Leishmaniasis**, Washington, dec. 2017. Disponível em:
<https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9417&Itemid=40250&lang=en> Acesso em: 15 jan. 2018.
- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. WORLD HEALTH ORGANIZATION (PAHO/WHO). **Leishmaniasis. Epidemiological report of the Americas**. Leishmaniasis report, Washington, fev. 2018. Disponível em:
<http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754>. Acesso em: 05 jun. 2017.
- PECONICK, Ana Paula. **Expressão do peptídeo vacinal SBm7462[®] anticarrapato Rhipicephalus microplus em plantas transgênicas (Arabidopsis thaliana)**. 2010. 95 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.
- PEIXOTO, Henry Maia; OLIVEIRA, Maria Regina Fernandes; ROMERO, Gustavo Adolfo Sierra. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. **Tropical Medicine & International Health**, [S.l.], v. 20, n. 3, p. 334-352, 2015.
- PITZSCHKE, Andrea. Agrobacterium infection and plant defense transformation success hangs by a thread. **Frontiers in Plant Science**. [S.l.], v. 4, p. 519, 2013.
- PUROHIT, H. et al. Diffuse cutaneous leishmaniasis - A rare cutaneous presentation in an HIV-positive patient. **Indian Journal Of Sexually Transmitted Diseases And Aids**, [S.l.], v. 33, n. 1, p.62-64, 2012
- QUEIROZ, Nina Marí Gual Pimenta de. **Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação**

com a RIFI e ELISA-teste. 2008. 127 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2008.

RAMOS, Márcio Viana; MELO, Dirce Fernandes de; SILVA, André Luis Coelho da. **Biotecnologia: a ciência, o bacharelado, a demanda socioeconômica.** Fortaleza: Imprensa Universitária, 2016. p.114.

ROBICHON, C. et al. Engineering Escherichia coli BL21 (DE3) derivative strains to minimize E. coli protein contamination after purification by immobilized metal affinity chromatography. **Applied and environmental microbiology**, [S.l.], v. 77, n. 13, p. 4634-4646, 2011.

ROCHA, Alessandra Guizzo da. **Leishmaniose visceral canina no Rio Grande do sul.** 2012. 47 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Monografia em Medicina Veterinária) - Curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2012.

RODRIGUES, A. C. M. et al. . Epidemiology of visceral leishmaniasis in Fortaleza, Ceará, Brazil. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 10, p. 1119-1124, out. 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2017001001119&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 22 abr. 2018.

RODRIGUES, Eduardo Henrique Gomes. **Validação de abordagens moleculares para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco.** 2000. 72 f. Dissertação (Mestrado em Saúde pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2000.

RODRIGUES, M. H. C. et al. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant Plasmodium vivax apical membrane antigen-1. **International Journal for Parasitology**, [S.l.], v. 35, p. 185–192, 2005.

ROSANO, Germán L.; CECCARELLI, Eduardo A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. **Frontiers in microbiology**, [S.l.], v. 5, p. 172, 2014.

ROTHWELL, L.; HAMBLIN, A.; KAISER, P. Production and characterisation of monoclonal antibodies specific for chicken interleukin-2. **Vet. Immunol. Immunopathol.** [S.l.], v. 83, n. 3-4, 149-160, 2001.

ROZENDO, A. S. et al. Estratégias na produção de antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi*. **Revista Saúde e Ciência**, Campina Grande, v. 3, n. 3, p.174-188, set./ dez. 2014.

SAEED, Ahmed Abdalla Abdelwahid. **Assessment of Latex Agglutination and Lateral Flow Tests for diagnosis of Visceral Leishmaniasis.** 2010. 80 f. Tese (Doutorado em bioquímica) - Curso de Biochemistry, University Of Khartoum, Cartum, 2010.

SAFARI, S. et al. Evidence based emergency medicine; part 5 receiver operating curve and area under the curve. **Emergency**, [S.l.], v. 4, n. 2, p. 111, 2016.

SALLES, B. CS et al. Leishmania infantum mimotopes and a phage–ELISA assay as tools for a sensitive and specific serodiagnosis of human visceral leishmaniasis. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, [S.l.], v. 87, n. 3, p. 219-225, 2017.

SANTOS, Fred Luciano Neves. **Caracterização do potencial diagnóstico de poliantígenos para detecção do Trypanosoma cruzi na fase crônica da doença de Chagas**. 2016. 197 f. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde), Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2016.

SAUDA, F. et al. Leishmania infantum, Dirofilaria spp. and other endoparasite infections in kennel dogs in central Italy. **Parasite**, [S.l.], v. 25, p.2-8, 2018.

SHIRALI, S. et al. Cloning and Expression of Recombinant Plasmid Containing P36/LACK Gene of Leishmania infantum Iranian Strain. **Iranian journal of parasitology**, [S.l.], v. 10, n. 2, p. 164, 2015.

SILVA, Mauro Roberto Biá. **Avaliação da acurácia de testes imunocromatográficos rK39 no diagnóstico da leishmaniose visceral em pacientes coinfectados com HIV**. 2014. 88 f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Publica) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

SINGHA, T. K. et al. Efficient genetic approaches for improvement of plasmid based expression of recombinant protein in Escherichia coli: A review. **Process Biochemistry**, [S.l.], v. 55, p. 17-31, 2017.

SNAPGENE. Vectors. **Net**. 2018. Disponível em < http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/your_time_is_valuable/>. Acesso em 13 de dezembro de 2017.

SOUSA, Núbia Maria Pereira de. **Avaliação in vitro da atividade leishmanicida da 5-Etoxicarbonil-4-(2-hidroxifenil)-6-metil-3, 4-diidropirimidin-2(1H)-tiona sobre formas adaptativas livres de Leishmania (L.) amazonensis e na infecção experimental**. 2014. 89 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular). Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

SOUSA, Tatyere Constâncio de; FRANCISCO, Ariadine Kelly Pereira Rodrigues; SANTOS, Isabele Barbieri dos. Leishmaniose Canina em Brasília, DF: Uma Revisão da Literatura. **Tempus Actas de Saúde Coletiva**, [S.l.], v. 9, n. 3, p.187-202, dez. 2015.

SOUSA, Zilma Ferreira Dourado E. Diagnóstico da leishmaniose visceral humana em áreas rurais, endêmicas e não endêmicas, utilizando um teste imunocromatográfico rK39 (2004-2006). **Revista de patologia**, [S.l.], v. 36, n. 2, p. 183-186, 2007.

SOUZA, Ana Cláudia de. **Expressão transiente de proteínas recombinantes utilizando sistema de planta**. 2014. 151 f. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

SOUZA, Cristiane Marques de. **Isolamento, purificação e caracterização de duas proteínas recombinantes de leishmania chagasi, visando à padronização de um ensaio imunodiagnóstico para leishmaniose canina**. 2009. 101 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, em parceria com o Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

SOUZA, Y. C. P. de et al. Testes diagnósticos para leishmaniose visceral – atualidade e perspectivas: diagnosis tests for visceral leishmaniasis – present and perspectives. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, São Paulo, v. 21, n. 1, p.1-16, jul. 2013.

SUBRAMONI, S. et al. Agrobacterium Tumefaciens Responses to Plant-Derived Signaling Molecules. **Frontiers in Plant Science**, [S.l.], v. 5, p. 322, apr. 2018.

TEMIN, Howard M.; BALTIMORE, David. RNA-directed DNA synthesis and RNA tumor viruses. In: **Advances in virus research**. [S.l.]: Academic Press, v. 17, 1972. p. 129-186.

TIWARI, S. et al. Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. **Biotechnology Advances**, [S.l.], v. 27, p. 449-467, 2009.

TORO, C. A. et al. Down modulation of host immune response by amino acid repeats present in a Trypanosoma cruzi ribosomal antigen. **Frontiers in microbiology**, [S.l.], v. 8, p. 2188, 2017.

TOWBIN, J.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. **Proc. of the Nat. Acad. of Scien.**, USA, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

TRAVI, B. L. et al. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS neglected tropical diseases**, [S.l.], v. 12, n. 1, p. e0006082, 2018.

VASCONCELOS, Luan Tales Costa de Paiva. **Avaliação de estratégias de produção do antígeno 503 recombinante de leishmania i. chagasi expresso em escherichia coli em biorreator de bancada**. 2015. 57f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

VENTURIN, G. L. et al. Recombinant K28 antigen in ELISA in the diagnosis of canine visceral leishmaniosis. **Parasite Immunology**, [S.l.], v. 37, n. 12, p.670-673, dez. 2015.

VIEIRA, Daniel Perez. Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações. **On line**, [S.l.], v. 30, 2011. p.18. Disponível em: <<http://www.imtsp.fm.usp.br/Protocolo/aula1pdf>> Acesso em: 20 fev. 2018.

WANG H. et al. Improving the Expression of Recombinant Proteins in E. coli BL21 (DE3) under Acetate Stress: An Alkaline pH Shift Approach. **PLoS one**, [S.l.], v. 9, n. 11, p. e112777, 2014.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C.. THE STRUCTURE OF DNA. **Cold Spring Harbor Symposia On Quantitative Biology**, [S.l.], v. 18, p.123-131, jan. 1953.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. Clinical forms of the leishmaniasis. **Net**. [S.l.], 2018. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/disease/clinical_forms_leishmaniasis/en/>. Acesso em: 16 mar. 2018c.

_____. Leishmaniasis. Epidemiological situation. **Net**. [S.l.], 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em: 05 jan. 2018a.

_____. Leishmaniasis Key Facts. Fact sheets. **Net**. Geneva. mar. 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 08 mar. 2018b.

WILLIAMS, D. C. et al. Cytoplasmic inclusion bodies in Escherichia coli producing biosynthetic human insulin proteins. **Science**, [S.l.], v. 215, n. 4533, p. 687-689, 1982.

WINGFIELD, Paul T. Overview of the purification of recombinant proteins. **Current protocols in protein science**, [S.l.], v. 80, n. 1, p. 6.1. 1-6.1. 35, 2015.

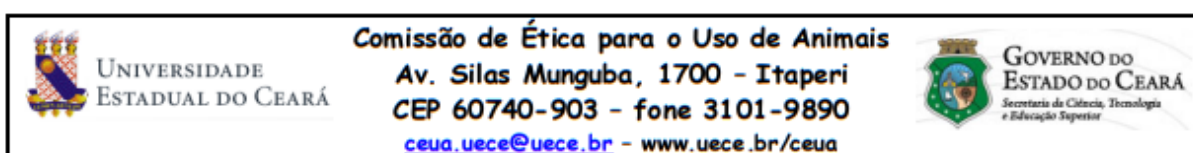
WOLFF, J. A. et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. **Science**, [S.l.], v. 247, n. 4949, p. 1465–1468, mar. 1990.

WOLFGANG, M. J. et al. Rhesus monkey placental transgene expression after lentiviral gene transfer into preimplantation embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S.l.], v. 98, n. 19, p. 10728-10732, 2001.

XAVIER, S. C. et al. Comparison of paraffin – embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of Leishmania infection in dog using histological, immunohistochemical and PCR methods. **BMC Veterinary Research**, [S.l.], v. 2, n. 17, p. 1-7, 2006.

ZACKAY, A. et al. Polymorphism in the HASPB repeat region of East African Leishmania donovani strains. **PLoS Negl Trop Dis**, [S.l.], v. 7, n. 1, p. e2031, 2013.

ANEXO A – FOLHA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

**CERTIFICADO**

Certificamos que o **Projeto de Pesquisa** intitulado "**Estudo comparativo da resposta do antígeno recombinante de *Leishmania chagasi* expresso em dois sistemas de produção (eucarioto e procaríoto) para utilização no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina**" registrado sob o **7255099/2017**, tendo como pesquisador principal **Maria Izabel Florindo Guedes**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA – UECE)**, tendo sido aprovado em 10 de novembro de 2017. Este certificado expira-se em 31 de agosto 2019.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Project entitled "**Estudo comparativo da resposta do antígeno recombinante de *Leishmania chagasi* expresso em dois sistemas de produção (eucarioto e procaríoto) para utilização no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina**" registered with the protocol **7255099/2017** under the supervision of **Maria Izabel Florindo Guedes** is in agreement with Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation of Ceará State University (CEUA – UECE), and was approved on november 10th, 2017. This certificate will expire on august 31st, 2019.

RESUMO

Vigência do projeto	2017-2018
Espécie/linhagem	<i>Canis lupus familiaris</i>
Número de animais	Variado
Peso/idade	600/adultos
Sexo	Machos e femeas
Origem	Centro de Zoonoses -CCZ

Fortaleza, 23 de novembro de 2017.

Marivalda Farias de Aragão

Maria Trivalda Farias de Aragão
 Presidente CEUA-UECE

ANEXO B – ARTIGO

ESTUDO COMPARATIVO DA RESPOSTA DO ANTÍGENO rK39 EXPRESSA EM SISTEMA EUCARIOTO E PROCARIOTO PARA UTILIZAÇÃO NO DIAGNOSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Eduarda Nattaly Ferreira Nobre Santos^a; Lucelina da Silva Araújo^a; Bruno Bezerra da Silva^a; Danielle Ferreira de Oliveira^a; Kelly Marques de Melo Lopes^b; Maria Izabel Florindo Guedes^a; Maurício Fraga van Tilburg^a.

a- Laboratório de Biotecnologia e Biologia molecular, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ce.

b- Centro de Controle de Zoonoses-CCZ, Fortaleza, Ce.

RESUMO

A Leishmaniose representa um grave problema de saúde pública principalmente nos países em desenvolvimento. No Brasil, o cão doméstico é considerado o principal reservatório epidemiológico para o gênero *Leishmania*, sendo um elo na transmissão e manutenção da Leishmaniose Visceral Zoonótica Humana. As principais medidas de controle, atualmente, aplicadas são direcionadas para a detecção e eliminação de cães infectados. Dessa forma, o diagnóstico precoce em caninos é crucial para o controle da doença, possibilitando uma intervenção rápida. Diferentes plataformas de expressão podem ser usadas para a obtenção de proteínas que podem ser utilizadas em kits de imunodiagnóstico. O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho da proteína rk39 expressa em plataformas diferentes, utilizando a *Escherichia coli* como plataforma procariótica e a *Nicotiana Benthamiana* como plataforma eucariótica ou vegetal, e comparar a sensibilidade e especificidade apresentada por ambas as proteínas no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC). Para isso, utilizou-se as proteínas rk39 frente a soros de animais diagnosticados pelo Centro de Controle de Zoonoses – CCZ, com base em dois testes sorológicos, o DPP® e o ELISA-EIE®, recomendados pelo ministério da saúde para diagnóstico de LVC no Brasil. A metodologia utilizada para avaliação das proteínas foi feita através do teste imunoenzimático indireto (ELISA). Dentre os principais resultados pode ser verificada uma sensibilidade de 99% e

especificidade de 30% da rk39 expressa em sistema eucarioto frente a uma sensibilidade de 92% e especificidade de 40%, apresentada pela rk39 produzida na plataforma procariótica. O desempenho, utilizando a rK39/eucarioto para a confirmação da infecção em casos clínicos apresentou alta positividade, com alta sensibilidade para detectar cães confirmados. Dessa forma, os resultados apresentados nesse estudo associado ao baixo custo e a menor biointerferência da plataforma vegetal tornam a rK39/eucarioto uma promissora proteína para uso em diagnóstico da LVC, em programas de controle e estudos epidemiológicos.

1- INTRODUÇÃO

As leishmaniasis são um conjunto de doenças infecto-parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (AKHOUNDI *et al.*, 2017). A forma mais grave e letal das leishmaniasis é a leishmaniose visceral (LV) ou calazar. Ela é caracterizada por ser uma doença sistêmica crônica que acomete órgãos como fígado, baço e medula óssea (BASTOS *et al.*, 2017; DOMÍNGUEZ-BERNAL *et al.*, 2015). No mundo, estima-se mais de 90 mil novos casos de LV por ano em humanos. (PAHO, 2018; WHO, 2018).

A leishmaniose é transmitida pelos mosquitos do gênero flebotomíneos, que ocorrem principalmente em países tropicais, subtropicais ou em desenvolvimento (ELSHAFI, MULLAZEHI, RÔNNELID, 2016; MAIA, DEPAQUIT, 2016). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o Brasil está entre os 5 países com maior número de casos registrados da doença, sendo responsável sozinho por 96% dos casos, em humanos, nas Américas (LARA-SILVA *et al.*, 2015; WHO, 2018; NO, 2016). No Brasil, o principal agente etiológico da LV é a *L. chagasi*, sendo o cão doméstico o principal reservatório (ABAD *et al.*, 2017; PINEDO-CANCINO *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2015). A manutenção de animais infectados tem um papel importante na disseminação e propagação da doença, (PINEDO-CANCINO *et al.*, 2016). Dessa forma, a detecção precoce desses animais pode interferir na exposição do reservatório a vetores, o que juntamente com um tratamento eficaz seria essencial para o controle da LV (FARIA *et al.*, 2017; MNIQUIL *et al.*, 2018).

A dificuldade de um diagnóstico precoce dos animais infectados é considerada um dos maiores desafios para se alcançar um controle efetivo da doença (AKHOUNDI *et al.*, 2017), porque 60% dos cães soropositivos são assintomáticos (FARIA *et al.*, 2017). No Brasil, a soroprevalência em cães domésticos pode chegar a 80%, em áreas endêmicas (FARIA *et al.*, 2012; NOGUEIRA *et al.*, 2016), pois a ausência de um kit de diagnóstico seguro e eficaz com a máxima sensibilidade e especificidade impossibilita o diagnóstico correto e precoce. Dessa forma, animais infectados são mantidos em áreas endêmicas através de resultados falsos negativos e animais saudáveis são eutanasiados com resultados falsos positivos, demonstrando a fragilidade dos testes atuais (FRAGA *et al.*, 2016).

Existem várias técnicas que podem ser utilizadas no diagnóstico da LV (SIRIPATTANAPIPONG *et al.*, 2017). O teste parasitológico ainda é considerado o padrão ouro, porém a técnica apresenta uma sensibilidade variada a qual é dependente da origem da amostra (COTA *et al.*, 2012; DIAS *et al.*, 2018). Além disso, é um método invasivo, de alto custo e difícil obtenção, o qual requer local apropriado e profissionais capacitados (GARCÍA *et al.*, 2017). Assim, devido à característica da doença, de possuir uma alta produção de anticorpos, as técnicas sorológicas são bastante utilizadas (DE SOUSA; FRANCISCO; SANTOS, 2015; MONTSERRAT-SANGRÀ *et al.*, 2016). Dessa forma, o presente trabalho buscou testar a rk39 produzida em diferentes plataformas de expressão, através do Ensaio imunoenzimático e avaliar a capacidade de diagnosticar a LVC.

2 METODOLÓGIA

2.1 Antígeno rK39 em sistema eucarioto

A proteína proveniente do sistema eucarioto foi gentilmente cedida, para uso nesse estudo, pelo laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular (LBBM) da Universidade Estadual do Ceará – UECE

2.1 Antígeno rK39 em sistema procarioto

2.2.1 Transformação da bactéria

A sequência de nucleotídeos do antígeno K39 foi obtida do banco de dados públicos (Genbank) sob número de acesso DQ831678.1. Em seguida, a sequência foi sintetizada comercialmente (BioBasic Inc., Ontario, Canadá) e inserida no vetor de clonagem pUC57. O plasmídeo resultante denominado pUC-k39 (2 µg) foi digerido com as enzimas de restrições *EcoRI* e *BamHI*, (2 µL/enzima) em 36 µL do tampão H por 1 hora a 37°C em banho-maria. Para a inativação da enzima a temperatura foi aumentada para 65 °C por 20 minutos. A purificação do inserto foi feita com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Madison, USA), de acordo com as recomendações do fabricante e a quantificação foi realizada por nanoespectrofotometria no Nanodrop (Thermo Scientific™) a 260nm.

A ligação do inserto no vetor de expressão pET-28a (Novagen, Darmstadt, Germany) foi feita na proporção de 3 moléculas do inserto pra 1 molécula do vetor utilizando a enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen, Texas, USA). Em seguida, o produto dessa ligação foi usado na transformação, por choque térmico, de bactéria *E. coli*, (cepa BL21). As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio Ágar-Luria Bertani (LB)/Canamicina 0,005% e incubada a 37°C *overnight*. A transformação foi confirmada por PCR de colônia.

2.2.2 Expressão e purificação da rK39

A colônia crescida em meio ágar foi inoculada em 5 mL de meio LB com 0,005% de Canamicina (Sigma-Aldrich) á 37°C sob agitação de 250 rpm *overnight* para a formação do pré-inóculo. Partindo do pré-inóculo a cultura foi repicada na diluição de 1:25 para um novo caldo LB com 0,005% de canamicina e incubada à 37 °C à 250 rpm em incubadora *shaker* (Ethiktechnology) até atingir uma densidade óptica (DO_{600nm}) entre 0,6 e 0,8 (OLIVEIRA, 2016). Em seguida, foi induzida a expressão da proteína, para isso, primeiramente, foi testado 3 concentrações do indutor (0,1 M; 0.5 M e 1 M) de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (SIGMA-ALDRICH) por 3 h à 37 °C, 250 rpm, afim de, avaliar a melhor concentração a ser usada.

Para obtenção da rK39, a cultura foi centrifugação a 8000 rpm por 15 min. à 4°C (MPW 350 R High Speed Brushless Centrifuge) e o *pellet* foi ressuspendido na

proporção de 1:10 em tampão de lise contendo lisozima (200 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 8; 200 µg Lisozima; 2 mM fluoreto de fenilmetanosulfonil - PMSF; 0,1% de Triton x-100) e incubada em gelo durante 15 minutos. Posteriormente, foi realizado a sonicação com 12 ciclos de 15" numa amplitude de 45. O extrato bacteriano foi novamente centrifugado e o *pellet* descartado. A purificação da proteína foi realizada em coluna Níquel Ni-NTA (GE Healthcare, USA) conforme instrução do fabricante, ligada a um sistema de cromatografia AKTA Start (GE Healthcare).

2.2.3 SDS-PAGE e Western blotting

A proteína purificada foi quantificada pelo método de Bradford (1976). Em seguida, as amostras foram adicionadas ao tampão de amostra, fervidas por 2 minutos e as proteínas foram separadas por eletroforese em gel de 12% de SDS poliacrilamida utilizando corrente de 140 V, com amperagem constante em um sistema de mini-gel por 80 minutos. Um dos géis foi corado com Coomassie Brilliant Blue e o outro submetido a transferência em Western Blotting. Para isso, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare Life Sciences). A transferência se deu através do uso de um sistema *Semi-dry* utilizando tampão de transferência (glicina 39 mM; SDS 0,0375 % (m/v); metanol 20 % (v/v) e Tris 48 mM pH 8), com voltagem de 150 V e amperagem 300 mA por 1h.

Após a transferência a membrana foi bloqueada com PBS-leite desnatado (5%) *overnight* e incubada com anticorpo monoclonal anti-His₆ (GE Healthcare Life Sciences), na proporção de 1:6000 por 1 hora. Depois da incubação do anticorpo primário a membrana foi lavada em três repetições de 10 minutos cada com PBS-Tween 20 (0,05%). Posteriormente, a membrana foi incubada em anticorpo secundário, anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (SIGMA-ALDRICH), na proporção de 1:10000 por 1 hora, diluído em PBS-leite desnatado (5%). Realizou-se novamente a lavagem com PBS-Tween 20 (0,05%) em três repetições de 10 minutos cada (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Na revelação da membrana foi utilizado como cromógeno a solução de diaminabenzidina (DAB / SIGMA-ALDRICH) 0,0003 g/mL e 100 µL de peróxido de hidrogênio (30 volumes) diluídos em tampão PBS (TOWBIN *et al.*, 1979), mantendo sob abrigo de luz por 15 minutos.

2.3 ELISA indireto

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa para uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA / UECE) sob protocolo de número 7255099/2017. As amostras de soros utilizadas para avaliar a sensibilidade e especificidade dos antígenos foram obtidas de 158 animais adultos sem raça definida, com gênero e idade desconhecidos. Os soros foram cedidos pelo Centro de Controle de Zoonose (CCZ) do município de Fortaleza no estado do Ceará (CE).

Para os testes de ELISA indireto foram testadas 118 amostras de soro canino diagnosticados com leishmaniose visceral (amostras positivas) confirmadas por dois testes sorológicos, o ensaio imunocromático rápido (DPP® *Dual Path Platform* Biomanguinhos/Fiocruz, Brasil) e o imunoenzimático (ELISA® kit EIE-LVC Bio-Manguinhos/Fiocruz, Brasil). As amostras negativas foram divididas em dois grupos, de acordo com os resultados dos testes do CCZ. Um grupo constituído de 20 soros negativos confirmado pelo teste imunocromático rápido e um segundo grupo formado por 20 soros considerados negativos pelo CCZ, porém positivados no teste imunocromático rápido e negativados no teste de ELISA-EIE®.

Foi escolhido como controle negativo, para o cálculo do *cut-off*, uma amostra cujo valor de absorbância apresentou mais baixo que a média dos soros negativos, essa escolha foi feita a fim de se ter um controle com a maior confiabilidade possível, evitando um falso-positivo. Como controle positivo foi escolhido entre os soros positivos, uma amostra que apresentou absorbância maior que a média dos soros positivos. A amostra escolhida para o controle negativo e positivo foi padronizado para ser usado em todas as placas, permitindo a comparação interplacas e eliminando o efeito do dia. Assim, além do controle negativo todas as placas tiveram controle positivo e branco. Primeiramente, foi feita uma curva de titulação para determinar a melhor concentração da proteína a ser testada, esta foi diluída em log 2 iniciando com 8µg mantendo fixa a concentração do anticorpo. Posteriormente, a concentração da proteína foi fixada e foi realizada uma diluição seriada do anticorpo primário (1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1.280). Após a determinação da titulação, a placa de ELISA (Nunc 96 MicroWell™) foi sensibilizadas com 1,0 µg/mL de proteína diluídas em tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M, pH 9,6, por 16-18 h a 4 °C. A proteína rk39 produzida

nos dois sistemas de expressão (procarionte e eucarionte) foram submetidas aos mesmos processos para padronização de antígeno e anticorpo, em seguida testadas sob as mesmas condições frente aos soros dos animais.

As placas foram lavadas 3 vezes com solução de lavagem (solução salina tamponada com fosfato PBS contendo 0,05% de Tween-20). Em seguida, foi feito o bloqueio com 200 μ L solução de gelatina a 1% (Sigma Aldrich, USA) e incubadas a 37°C/1 h. Após o bloqueio foi realizada uma lavagem e as amostras de soro foram adicionadas (100 μ L de soro, na diluição 1:160). As placas foram incubadas à 37 °C/1 hora e posteriormente lavadas 3 vezes em solução de lavagem.

O *anti-DOG* IgG conjugado a peroxidase (SIGMA) foi utilizado na diluição recomendada pelo fabricante e em seguida incubado à 37°C/1 hora. As placas foram novamente lavadas 3 vezes com solução de lavagem. A reação foi revelada adicionando 100 μ L de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (Life Technology) por 15 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 50 μ L de solução de 3 N de ácido sulfúrico (H₂SO₄). A leitura da placa foi realizada em leitor de ELISA (Synergy 2, Biotrak), com absorvância 450nm. Todos os ensaios foram realizados em duplicata (FLORINDO *et al.*, 2002; ROTHWELL; HAMBLIN; KAISER, 2001).

O cálculo do *cut-off* para a análise dos testes de ELISA foi determinado pela média dos valores de absorvância encontrado no controle negativo acrescido de 3 vezes o desvio padrão (99,8% de confiança). Os soros considerados positivos foram aqueles que apresentaram absorvância superior ou igual ao *cut-off* (ANURACPREEDA, CHAWENKIRTTIKUL, SOBHON, 2016). A sensibilidade e a especificidade foram determinadas em concordância com a tabela apresentada por COGGON *et al.*, 1993.

2.4 Análise estatística

Os dados gerados com o ELISA foram tabulados no Microsoft Excel® versão 2010 (Microsoft Co., Redmond, WA, EUA) e analisados utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Inc, EUA), SPSS *statistics* versão 21. A precisão dos testes levou em consideração a análise dos parâmetros obtidos a partir do limite de positividade da linha de corte (*cut-off*) usado para estabelecer a sensibilidade (S), especificidade (E),

valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), a área sob a curva (AUC) e acurácia (AC). Para todos os testes foi utilizado um nível de significância de 5%.

3 RESULTADOS

3.1 K39 recombinantes

O sequenciamento feito pela empresa BioBasic confirmou a presença da proteína mostrando repetições de domínios conservados referentes a K39. Das 3 concentrações de IPTG (0,1 M; 0,5 M; 1 M), testadas para a indução das colônias transformadas, a concentração de 0,5 M mostrou-se mais eficiente para ser usado na etapa de expressão.

As alíquotas resultantes da purificação foram submetidas ao Western Blotting a fim de detectar a presença da proteína utilizando um anticorpo anti-histidina. A presença de uma segunda banda próximo a altura de 75 kDa na membrana de nitrocelulose, se deu em virtude da formação de dímeros na amostra (Figura 1).

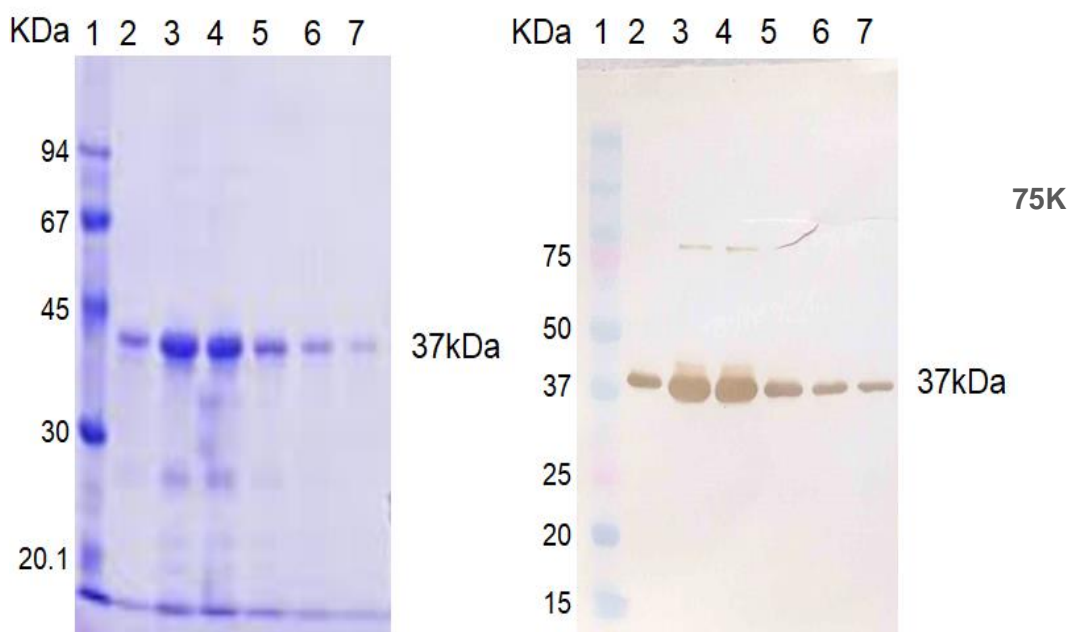


Figura 1:(A) Gel SDS-PAGE 15% corado com comassie blue e (B) *Western Blotting* em membrana de nitrocelulose dos eluídos da proteína rk39 purificada em coluna de cromatográfica de níquel. (1) marcador de peso molecular (2 – 7) eluídos de 1 a 6 advindos da coluna de purificação.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2 Teste de ELISA

O ELISA indireto utilizando a proteína rK39 produzida e sistema procarioto apresentou uma positividade de 97,5% das amostras diagnosticadas pelo CCZ com LVC para o ensaio imunoenzimático. Nesse mesmo teste 50% dos soros de animais negativados do grupo DPP⁻ se mostraram negativos para o ELISA com rK39/Bactéria e 30% dos soros negativos do grupo DPP⁺/ELISA-EIE⁻ foram negativadas em nosso ELISA, com especificidade total de 40% sobre as amostras de animais diagnosticados como negativo para LVC (tabela1). A análise estatística desse teste apresentou Valor Preditivo Positivo 82,73%, Valor Preditivo Negativo 84,21%, Razão de Verossimilhança Positivo 1.62, Razão de Verossimilhança Negativo 0.064 e Acurácia de 82,91%.

	Teste ELISA/Bactéria		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
Grupo DPP⁻ (n=20)	10	10	50%
Grupo DPP⁺/EIE⁻ (n=20)	14	6	30%
TOTAL	24	16	40%

Tabela 1: Desempenho do ELISA/Bactéria em amostras de soro de cães negativos para LVC

O teste de ELISA utilizando a rK39 produzida em sistema eucarioto (rK39/Planta), apresentou melhor resultado, positivando 99,2% das amostras de animais sabidamente positivos pelos testes utilizados pelo CCZ (Tabela 2). Do grupo DPP⁻ de animais negativos 35% deram negativos para a rK39/Planta e do grupo DPP⁺/EIE⁻ apenas 25% dos animais foram negativados para este teste (rK39/Planta). Assim o resultado com a proteína expressa em planta apresentou uma especificidade de 30% do total de animais negativos. Com a análise estatística gerou Valor Preditivo

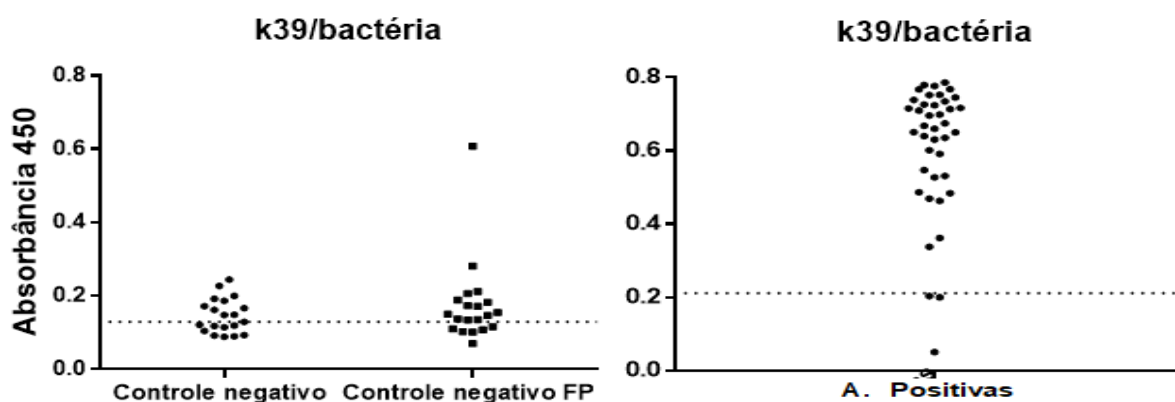
Positivo 80,69%, Valor Preditivo Negativo 92,31%, Razão de Verossimilhança Positivo 1.42, Razão de Verossimilhança Negativo 0.03 e Acurácia de 81.65%.

	Teste ELISA/Bactéria		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
Grupo DPP⁻ (n=20)	13	7	35%
Grupo DPP⁺/EIE⁻ (n=20)	15	5	25%
TOTAL	28	12	30%

Tabela 2: Desempenho do ELISA/Planta em amostras de soro de cães soronegativos para LVC

Dos 20 soros negativos do grupo DPP⁻, 17 soros apresentaram resultados iguais nos dois testes (7 foram negativos e 10 positivos). De forma que apenas 3 amostras desse grupo apresentaram resultados divergentes. Essas amostras marcaram positivas na rk39/Planta e negativos na rk39/Bactéria.

No grupo DPP⁺/EIE⁻ dos negativos 17 soros apresentaram resultados iguais em ambos os testes (13 positivos e 4 negativos) e 3 amostras foram divergentes, 2 foram positivas na planta e negativas no antígeno da bactéria e a outra teve resultado positivo na rk39/Bactéria e negativo na rk39/Planta (Figura 2).



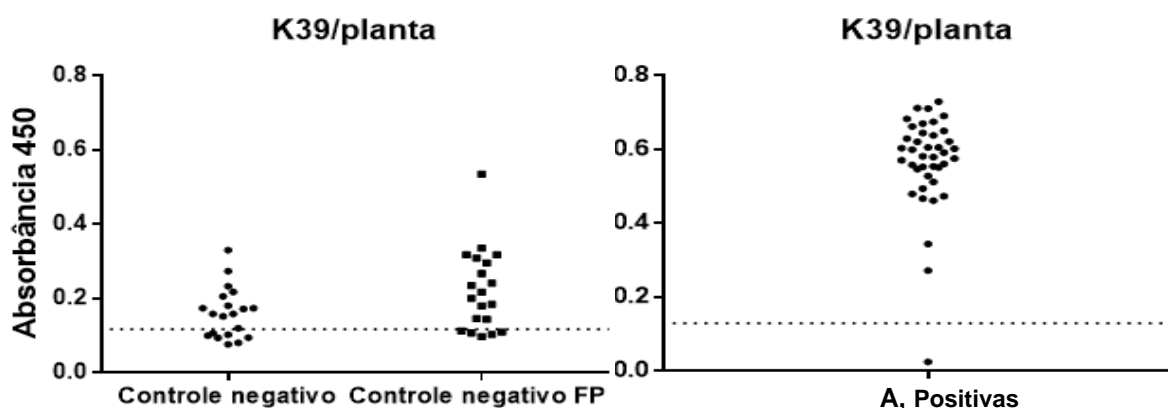


Figura 2- Resultado obtidos com o ELISA indireto das duas proteínas com leitura a 450 nm. Os Gráficos mostram as absorbâncias geradas pelos soros de animais positivos (DPP+/EIE+), negativos (DPP-) e negativos-FP (DPP+/EIE-) testadas com a proteína rk39/procarióto (Gráfico A) e com a proteína rk39/eucarióto (Gráfico B). O *cut-off* de cada teste está representado nos gráficos pela linha horizontal pontilhada.

No presente estudo o antígeno k39/planta teve resultados excelentes de sensibilidade (99,2%) apesar de a especificidade ter sido mais baixa (30%).

4 DISCUSSÃO

A proteína k39 foi escolhida por apresentar uma alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico de LV (PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015) devido a sequências de 39 aminoácidos repetidos (SIRIPATTANAPIPONG *et al.*, 2017) que formam epítomos antigênicos (GOTO *et al.*, 2006). Sendo assim, essa proteína é amplamente utilizada no diagnóstico de LVC (SALLES, *et al.*, 2017). O antígeno rK39 foi utilizado com sucesso para diagnosticar LV em seres humanos na África e na Índia e apresentou resultados bastante satisfatórios em humanos e caninos na América do Sul (VENTURIN *et al.*, 2015). Apresentando uma sensibilidade entre 71-100% e especificidade entre 81–100% (CLEMENTE *et al.*, 2014; FREIRE, 2017; LEMOS, 2003).

A principal forma de produção da proteína recombinante é através da expressão em plataforma procariótica, porém o avanço na biotecnologia tem proporcionado o desenvolvimento de métodos mais simples e eficazes. A plataforma vegetal é considerada um forte candidato para substituição dessa plataforma (BEIHAGHI *et al.*, 2018). Esse sistema é capaz de expressar uma ampla gama de proteínas ativas com um custo de produção menor, quando aplicada em ampla escala

(TIWARI *et al.*, 2009). Além disso, atualmente tem disponível uma variedade de sistemas de expressão gênica e de localização de proteínas para uso em plantas, permitindo o acúmulo estável nesse sistema (LARA-SILVA *et al.*, 2015; NO, 2016).

Assim buscou-se comparar a capacidade de diagnosticar a LV utilizando a k39 expressa nas duas plataformas. A expressão heteróloga da proteína recombinante na bactéria ocorreu como esperado e a proteína manteve uma alta capacidade de detecção de anticorpos. Foi utilizada a linhagem de célula BL21(DE3) que é a mais utilizada para expressão de proteínas recombinantes de alto rendimento (AHMAD *et al.*, 2017; HAN *et al.*, 2018; ROBICHON *et al.*, 2011).

O vetor de expressão pET-28a foi construído para codificar uma cauda de histidina na porção *N-terminal*, entre os sítios de clivagem *Bam*HI e *Eco*RI. Essa cauda foi expressa junto com a região codificadora originando uma proteína quimérica. A presença da cauda de histidina é importante para o processo de purificação da proteína, pois facilita sua retenção e melhora a concentração dos níveis de proteína recombinante, podendo ser usado na purificação de grande quantidade (HAN *et al.*, 2018; ROBICHON *et al.*, 2011; WINGFIELD, 2015). No Western Blotting a proteína recombinante também pode ser detectada através de anticorpos específicos *anti-HisTag* que reconhecem e se ligam na cauda de histidina codificada junto com a proteína. A k39 obtida em plataforma eucaritótica foi expressa em sistema vegetal.

No nosso estudo a k39 apresentou baixa especificidade ao comparar com os resultados do CCZ. Porém, essa diferença encontrada pode estar associado ao próprio uso do DPP[®] que possui baixa sensibilidade (78%-88%), principalmente em animais assintomáticos (47%), e especificidade entre 70%-75% (HIRSCHMANN *et al.*, 2015; PEIXOTO *et al.* 2015). Assim a baixa sensibilidade em assintomáticos pode negatizar animais infectados.

Das amostras utilizadas no presente trabalho diagnosticadas como negativas 50% foram submetidas apenas ao teste imunocromático rápido de duplo percurso e as outras 50% foram positivadas nesse mesmo teste. Dessa forma, esses animais negativados pelo CCZ, mas que foram positivados em nosso teste podem está realmente infectados.

O procedimento recomendado pelo programa de vigilância e controle da leishmaniose visceral/ministério da saúde no Brasil é que as amostras de soros sejam submetidas ao teste rápido DPP[®], para a triagem dos casos de LVC, e as amostra que apresentarem positividade no teste rápido sejam submetidos ao teste de ELISA-EIE[®] para confirmação dos casos (BRASIL, 2011a; FUNED, 2015). De acordo com a nota técnica Nº 01/2011 CGDTCGLAB/DEVIT/SUS/MS um cão é diagnosticado sorologicamente para LVC quando as duas técnicas apresentam resultados positivos (BRASIL, 2011b). Dessa forma animais negativados pelo DPP não são submetidos ao teste de ELISA-EIE[®] de acordo com o procedimento padrão utilizado pelo CCZ.

No ensaio realizado por De Carvalho e colaboradores (2018) das 58 amostras confirmadas por ele no PCR, através da amplificação do DNA de *Leishmania*, apenas 39 amostras foram positivas no DPP[®] e ELISA-EIE[®], gerando uma concordância de apenas 67,2% das amostras. Nesse mesmo ensaio, das 78 amostras negativas no DPP[®] e no ELISA-EIE[®] 18 foram confirmadas por PCR. A PCR em tempo real foi capaz de detectar o DNA de *Leishmania* em 21 soros de cães que não reagiram no DPP[®] seguido por ELISA-EIE[®], sendo que 20 dessas amostras (95,2%) eram do grupo de animais assintomáticos, mostrando a dificuldade de se identificar animais desse grupo. Assim amostras infectadas podem não serem diagnosticadas pelo DPP[®].

A sensibilidade do DPP[®] e do ELISA-EIE[®] encontrada nos testes feitos por Pacheco e colaboradores (2015), ao considerar os resultados por teste de PCR como padrão ouro, também foram baixos, gerando sensibilidade de 36% e 38% respectivamente. Segundo Castro-Júnior *et al.* (2014) a técnica de PCR é considerada uma técnica com alta sensibilidade e especificidade para uso em diagnósticos clínicos, porém possui um custo elevado, sendo mais restrito pois requer equipamentos e pessoal especializado (CASTELLANOS-GONZALEZ *et al.*, 2018).

Abad e colaboradores (2017) relata a ocorrência de falso negativo em testes realizados com DPP[®], principalmente quando se tem níveis baixos de anticorpos, dessa forma ele sugere em seu trabalho que a positividade do diagnóstico por teste de DPP[®] está mais relacionada com o potencial de transmissão do parasita ao vetor. Assim animais com baixos níveis de anticorpos não são identificados gerando um grande número de infecções subclínicas com diagnóstico falso negativo. No estudo feito por

Faria *et al.* (2015) foi encontrado também uma sensibilidade abaixo de 72,9% e 64,5% para os kits DPP® e ELISA-EIE®, respectivamente.

Outro fator que corrobora para a possibilidade de que os resultados apresentados com os testes de diagnósticos, atualmente disponibilizados, possam estar levando a resultados falsos negativos, contribuindo assim para a manutenção de animais infectados (FARIA; ANDRADE, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2017), está associado aos dados epidemiológicos que mostram que a incidência da doença não tem reduzido, mesmo com a aplicação das medidas de controle atuais (MAGALHÃES-JUNIOR *et al.*, 2016). A prevalência da doença em caninos, nos últimos anos, manteve-se estável em torno de 18%, porém o número de casos em humanos aumentou 41%, mostrando a ineficiência das medidas de controle aplicadas (LARA-SILVA *et al.*, 2015).

Levando em consideração os resultados obtidos foi observado que a proteína expressa em eucarioto teve resultados de sensibilidade superior ao sistema procarioto. Logo a plataforma vegetal poderia ser uma alternativa utilizada como substituto da expressão em sistema procarioto.

5 CONCLUSÃO

Em nosso estudo, ambas as proteínas recombinantes expressas em diferentes plataformas se mostraram promissoras para a utilização no imunodiagnóstico da leishmaniose. Entretanto, a rk39 proveniente da plataforma vegetal oferece baixo custo de produção e menor biointerferência quando comparado com a produzida em sistema procarioto. Mais estudos com amostras indubitavelmente positivas e negativas necessitam serem feitos para a padronização da técnica utilizando-se rk39 oriunda de sistema vegetal.

REFERÊNCIAS

- ABAD, Lily P. Martínez et al. Diagnostic accuracy of rKLO8 versus rK26 ELISAs for screening of canine visceral leishmaniasis. **Acta tropica**, v. 166, p. 133-138, 2017.
- AHMAD, Irshad. et al. Overcoming challenges for amplified expression of recombinant proteins using Escherichia coli. **Protein Expression and Purification**, [S.l.], v. 144, p.12-18, nov. 2017.
- AKHOUNDI, Mohammad et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **Plos Neglected Tropical Diseases**, France, v. 10, n. 3, p.1-40, mar. 2016.
- AKHOUNDI, Mohammad et al. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. *Molecular aspects of medicine*, v. 57, p. 1-29, 2017.
- ANURACPREEDA, Panat; CHAWENGKIRTTIKUL, Runglawan; SOBHON, Prasert. Immunodiagnosis of Fasciola gigantica infection using monoclonal antibody-based sandwich ELISA and immunochromatographic assay for detection of circulating cathepsin L1 protease. **PloS one**, v. 11, n. 1, p. e0145650, 2016.
- BASTOS, M. S. et al. The expression of NTPDase1 and-2 of Leishmania infantum chagasi in bacterial and mammalian cells: Comparative expression, refolding and nucleotidase characterization. **Protein expression and purification**, v. 131, p. 60-69, 2017.
- BEIHAGHI, Maria et al. Transient Expression of CCL21as recombinant protein in tomato, **Biotechnology Reports**, v. 17, p. 10-15, mar. 2018.
- BIO-MANGUINHOS. Manual de instrução de uso: EIE – Leishmaniose visceral canina Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro. p.17, 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72, 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação Geral da Doenças Transmissíveis. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Nota Técnica N° 48/2011, de 19 de setembro de 2011**. Esclarecimentos sobre o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina utilizado na rede pública de saúde. 2011a

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Nota Técnica Conjunta nº 1, de 2011**. Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). Brasília: Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis/Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública; 2011b.

CASTELLANOS-GONZALEZ, A. et al. Molecular diagnosis of protozoan parasites by Recombinase Polymerase Amplification. **Acta tropica**, v. 182, p. 4-11, 2018.

CASTRO-JÚNIOR, J.G., Freire, M.L., Campos, S.P.S., Scopel, K.K.G., Porrozzi, R., Da Silva, E.D., Colombo, F.a., Silveira, R.D.C.V.D., Marques, M.J., Coimbra, E.S., 2014. Evidence of Leishmania (Leishmania) infantum infection in dogs from Juiz de Fora, Minas Gerais state, Brazil, based on immunochromatographic dual-path platform (DPP®) and PCR assays. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo 56, 225-229.

CLEMENTE, W. T. et al. High Prevalence of Asymptomatic Leishmania spp. Infection Among Liver Transplant Recipients and Donors From an Endemic Area of Brazil. **American Journal Transplant**, [S.l.], v.14, n. 1, p.96-101, jan. 2014.

COTA, G. F., DE SOUSA, M. R., DEMARQUI, F. N., Rabello, A. (2012). The diagnostic accuracy of serologic and molecular methods for detecting visceral leishmaniasis in HIV infected patients: Meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001665>

- DE CARVALHO, Flávio Luiz Nunes et al. Canine visceral leishmaniasis diagnosis: a comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs. **Epidemiology & Infection**, v. 146, n. 5, p. 571-576, 2018.
- DE SOUSA, Tatyere Constâncio; FRANCISCO, Ariadine Kelly Pereira Rodrigues; DOS SANTOS, Isabele Barbieri. Leishmaniose Canina em Brasília, DF: Uma Revisão da Literatura. **Tempus Actas de Saúde Coletiva**, v. 9, n. 3, p. 187-202, 2015.
- DIAS, Daniel S. et al. Serological diagnosis and prognostic of tegumentary and visceral leishmaniasis using a conserved Leishmania hypothetical protein. **Parasitology international**, v. 67, n. 3, p. 344-350, 2018.
- DOMÍNGUEZ-BERNAL, Gustavo et al. HisAK70: progress towards a vaccine against different forms of leishmaniosis. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 629, 2015.
- FARIA, Angélica Rosa et al. Canine visceral leishmaniasis follow-up: a new anti-IgG serological test more sensitive than ITS-1 conventional PCR. **Veterinary parasitology**, v. 248, p. 62-67, 2017.
- FARIA, Angélica Rosa; ANDRADE, Héliida Monteiro de. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Rev Pan-Amaz Saude**, Ananindeua, v. 3, n. 2, p. 47-57, jun. 2012. Disponível em <http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232012000200007&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 31 JAN. 2017. <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232012000200007>
- FARIA, Angélica Rosa et al. Novel recombinant multiepitope proteins for the diagnosis of asymptomatic Leishmania infantum-infected dogs. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 1, p. e3429, 2015.
- FLORINDO, Maria Izabel et al. Immune response induced in mice by oral immunization with cowpea severe mosaic virus. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v.35, n. 7, p.827–835, jul. 2002.

FRAGA, Deborah Bittencourt Mothé et al. The rapid test based on *Leishmania infantum* chimeric rK28 protein improves the diagnosis of canine visceral leishmaniasis by reducing the detection of false-positive dogs. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004333, 2016.

FREIRE, Mariana Lourenço. **Avaliação de desempenho e custos diretos de kits comercialmente disponíveis no Brasil e do protótipo DAT-LPC para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. 2017.** 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências - Concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto René Rachou, Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde, Belo Horizonte, 2017.

FUNED. Instruções para a realização do teste rápido imunocromatográfico Alere para diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina. Belo Horizonte, 2015.

GARCÍA, Valeria S. et al. Development of a simple and economical diagnostic test for canine leishmaniasis. **Experimental parasitology**, v. 182, p. 9-15, 2017.

GOTO, Y. et al. Cloning, characterization, and serodiagnostic evaluation of *Leishmania infantum* tandem repeat proteins. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 7, p. 3939- 3945, 2006.

HAN, Yingqian et al. High-level expression of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* using an HE-maltotriose-binding protein fusion tag. **Protein expression and purification**, [S.l.], v. 142, p. 25-31, 2018.

HIRSCHMANN, Lourdes C. et al. Leishmaniose visceral canina: comparação de métodos sorológicos em cães de área endêmica do Rio Grande do Sul no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, [S.l.], v. 44, n. 1, p. 33-44, 2015.

LARA-SILVA, Fabiana de Oliveira et al. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. **Acta tropica**, v. 148, p. 128-136, 2015.

LEMOS, Elenice Moreira et al. Avaliação do teste rápido utilizando o antígeno recombinante K39 no diagnóstico da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S.l.], v. 36, p. 36-38, 2003.

MAGALHÃES-JUNIOR, Jairo Torres et al. Xenodiagnosis on dogs with visceral leishmaniasis: canine and sand fly aspects related to the parasite transmission. **Veterinary parasitology**, v. 223, p. 120-126, 2016.

MAIA, Carla; DEPAQUIT, Jérôme. Can *Sergentomyia* (Diptera, Psychodidae) play a role in the transmission of mammal-infecting *Leishmania*? **Parasite**, v. 23, 2016.

MNIOUIL, Meryem et al. Comparative evaluation of immunochromatographic dipstick test (ICT) rk39, soluble antigen ELISA and IFAT for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis in Morocco. **Acta tropica**, v. 182, p. 185-189, 2018.

MONTERRAT-SANGRÀ, Sara et al. TLR-2 and TLR-4 transcriptions in unstimulated blood from dogs with leishmaniosis due to *Leishmania infantum* at the time of diagnosis and during follow-up treatment. **Veterinary parasitology**, v. 228, p. 172-179, 2016.

NO, Joo Hwan. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. **Acta tropica**, v. 155, p. 113-123, 2016.

NOGUEIRA, Camila Tita et al. Gene LC36, proteína recombinante RLC36, uso da mesma e método para diagnosticar leishmanioses, preferencialmente, leishmaniose visceral canina., 2016. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/144553>>.

OLIVEIRA, E.R.A. et al. Peripheral effects induced in BALB/c mice infected with DENV by the intracerebral route. **Virology** 489, 95–107, 2016.

PACHECO, Luciano Vasconcellos et al. Comparação dos testes preconizados pelo ministério da saúde para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 12, n. 3, p. 58-58, 2015.

PAIVA-CAVALCANTI, Milena de et al. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. **Cell & Bioscience**, [S.l.], v. 5, n. 1, p.1-10, jun. 2015.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). Leishmaniasis epidemiological report in Americas. 2016. <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/34856>

PEIXOTO, Henry Maia; OLIVEIRA, Maria Regina Fernandes; ROMERO, Gustavo Adolfo Sierra. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. **Tropical Medicine & International Health**, [S.l.], v. 20, n. 3, p. 334-352, 2015.

PINEDO-CANCINO, Viviana et al. Evaluation of Leishmania (Leishmania) infantum excreted-secreted antigens for detection of canine leishmaniasis. **Acta tropica**, v. 161, p. 41-43, 2016.

ROBICHON, Carine et al. Engineering Escherichia coli BL21 (DE3) derivative strains to minimize E. coli protein contamination after purification by immobilized metal affinity chromatography. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 13, p. 4634-4646, 2011.

RODRIGUES, Ana Caroline M. et al . Epidemiology of visceral leishmaniasis in Fortaleza, Ceará, **Brazil. Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 10, p. 1119-1124, oct. 2017. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2017001001119&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 22 apr. 2018.

ROTHWELL, L.; HAMBLIN, A.; KAISER, P. Production and characterisation of monoclonal antibodies specific for chicken interleukin-2. **Vet. Immunol. Immunopathol.** [S.l.], v. 83, n. 3-4, 149-160, 2001.

SALLES, Beatriz CS et al. Leishmania infantum mimotopes and a phage–ELISA assay as tools for a sensitive and specific serodiagnosis of human visceral leishmaniasis. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 87, n. 3, p. 219-225, 2017.

SIRIPATTANAPIPONG, Suradej et al. Comparison of Recombinant Proteins of Kinesin 39, Heat Shock Protein 70, Heat Shock Protein 83, and Glycoprotein 63 for Antibody Detection of *Leishmania martiniquensis* Infection. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 64, n. 6, p. 820-828, 2017.

SOUZA, Yasmin et al. Testes Diagnósticos Para Leishmaniose Visceral–Atualidade E Perspectivas. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 1-16, 2015.

VENTURIN, G. L. et al. Recombinant K28 antigen in ELISA in the diagnosis of canine visceral leishmaniosis. **Parasite immunology**, v. 37, n. 12, p. 670-673, 2015.

WINGFIELD, Paul T. Overview of the purification of recombinant proteins. **Current protocols in protein science**, p. 6.1. 1-6.1. 35, 2015.

World Health Organization. (WHO). Leishmaniasis. Geneva. Disponível em:<<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>, 2018.

