

FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-graduação Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES
CANDIDATOS A COMPONENTE DE UMA VACINA CONTRA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

JÉSSICA MARIANE FERREIRA MENDES

Salvador – Bahia

2016

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-graduação Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES CANDIDATOS
A COMPONENTE DE UMA VACINA CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA**

JÉSSICA MARIANE FERREIRA MENDES

Orientador: Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira

Co-orientadora: Dra. Cristiane Gabborgine Melo de Pinheiro

Dissertação apresentado ao Curso de
Pós-Graduação em Biotecnologia em
Saúde e Medicina Investigativa para
obtenção do grau de Mestre

Salvador – Bahia

2016

DEDICATÓRIA

À Deus,

Aquele que me guia por todos os caminhos e que em tudo possibilitou a realização e conclusão deste trabalho.

Aos meus pais,

Que não mediram esforços para que pudesse seguir os meus sonhos, inclusive este! Abrindo mão do nosso convívio diário e até mesmo de suas realizações pessoais para que eu buscasse o título de Mestre.

À família,

Por se mostrar sempre presente mesmo com a distância. Pela confiança e admiração, que me fizeram ter força para superar cada dia.

Aos amigos,

Por toda paciência e compreensão nos momentos mais difíceis e pela torcida ao longo desta jornada.

"PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES CANDIDATOS A COMPONENTE
DE UMA VACINA CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA"

JÉSSICA MARIANE FERREIRA MENDES

FOLHA DE APROVAÇÃO


COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Leonardo Paiva Farias
Pesquisador
CPqGM- Fiocruz



Dr. Luis Gustavo Carvalho Pacheco
Professor Adjunto
UFBA



Dra. Theolis Costa Barbosa Bessa
Tecnologista em Saúde Pública
CPqGM- Fiocruz

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho:

Ao **CPqGM** pela estrutura oferecida para a execução deste trabalho;

Ao programa de **Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina investigativa**, pela concessão da bolsa e oportunidade de ampliar os conhecimentos teóricos e práticos;

Ao meu querido **Orientador Geraldo Gileno**, pelo apoio, oportunidade, paciência, confiança e principalmente pela generosidade, estimulando sempre o crescimento pessoal e profissional. Sinto-me imensamente grata pelos três anos de convivência.

À **Ricardo Fraga**, pela confiança ao me indicar para trabalhar no grupo e por me acompanhar ao longo destes anos, dando todo o suporte necessário;

Às minhas companheiras diárias: **Naiara Teixeira, Cristiane Pinheiro, Bárbara Oliveira e Catiule dos Santos**, vocês fizeram esta jornada mais leve, foram a minha segunda família e compartilharam comigo os melhores e piores momentos. É gratificante ver a bela e sólida relação de confiança, amizade e companheirismo que construímos;

Aos pequeninos **Matheus Moreno, Maria Carolina e Marcus David**, agradeço pela convivência sempre harmoniosa, pela ajuda sempre que necessária e pela oportunidade de presenciar o crescimento de cada um de vocês;

À **Lívia Sacramento**, a grande mãe desse grupo, com seu abraço acolhedor e as broncas ao longo desses anos auxiliou profundamente para que eu desenvolvesse muitas habilidades, entre elas a paciência ao realizar os experimentos;

À **Micely Hermida** por todo o suporte nas análises dos dados de citometria de fluxo e pela amizade construída;

Aos **amigos do LPBI** pela convivência e aprendizado no decorrer destes três anos;

Aos **funcionários do CPqGM** por serem tão solícitos, em especial às funcionárias da **Biblioteca** por todo apoio e ajuda nas correções;

Aos **meus pais**, pelo amor incondicional e renúncia, para que nunca me faltasse nada. Pela confiança, carinho e amor. Espero um dia ser a filha que vocês merecem.

MENDES, Jéssica Mariane Ferreira. Produção e Avaliação de antígenos recombinantes candidatos a componente de uma vacina contra leishmaniose visceral canina. 126 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

RESUMO

Uma vacina efetiva contra a leishmaniose visceral (LV) canina pode contribuir para o controle da doença no homem. Visando o desenvolvimento de uma vacina contra LV canina, antígenos recombinantes de *L. infantum* foram selecionados em nosso laboratório pelo uso de uma mistura de soros de seres humanos ou cães naturalmente infectados pela *L. infantum*. Alguns destes antígenos foram testados em diversos protocolos de imunização, incluindo uso de diferentes adjuvantes, em camundongos ou cães. A imunização de camundongos ou cães com um dos antígenos recombinantes (rLci2B) usado isoladamente ou em associação com saponina induziu resposta imune Th2 ou Th1/Th2, respectivamente, não protetoras contra a infecção experimental. Com a determinação da sequência deduzida de aminoácidos notou-se que a maioria dos antígenos selecionados apresenta um segmento com sequência de aminoácidos única (domínio não repetitivo) e segmentos com sequência de aminoácidos com motivos repetitivos (domínios repetitivos). Possivelmente a incapacidade dos antígenos recombinantes de induzir uma resposta imune predominantemente Th1, protetora contra a LV, seria por conta da presença de domínios repetitivos, que favorecem a apresentação antigênica por linfócitos B e, conseqüentemente, estimulam uma resposta imune Th2. Para avaliar o direcionamento da resposta imune pelos dois tipos de domínio, novas construções de DNA foram concebidas de modo a codificar apenas domínio(s) não repetitivo(s) ou domínio(s) não repetitivo(s) e domínios repetitivos. **OBJETIVOS:** Produzir quatro proteínas recombinantes com domínios não repetitivos (rLci2-NT-CT, rLci3-NT-CT, rLci10-NT e rLci12-NT-CT) e avaliar a capacidade desses polipeptídios de induzir resposta imune celular *in vitro* em cães assintomáticos inoculados por via dérmica com *L. infantum*. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Foram realizadas: a) a subclonagem de construções de DNA (*Lci3-NT-CT*, *Lci10-NT* e *Lci12-NT-CT*) em um plasmídeo apropriado para expressão em *Escherichia coli*, b) a determinação de condições apropriadas para produção das proteínas recombinantes (rLci2-NT-5R-CT, rLci2-NT-CT, rLci3-NT-2R-CT, rLci3-NT-CT, rLci10-NT-2R e rLci10-NT) c) a purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade e d) avaliação da capacidade dos polipeptídios de induzir estimulação de células mononucleares sangue periférico (PBMC) de cães assintomáticos inoculados por via dérmica com *L. infantum*. **RESULTADOS:** Três (rLci2-NT-CT, rLci2-NT-5R-CT, rLci3-NT-CT, rLci3-NT-2R-CT, rLci10-NT e rLci10-NT-2R) dos quatro pares de polipeptídios recombinantes foram expressos, produzidos e purificados. Três antígenos recombinantes (rLci2-NT-5R-CT, rLci2-NT-CT e rLci3-NT-2R-CT) promoveram a linfoproliferação *in vitro* utilizando PBMC de cães assintomáticos inoculados por via dérmica com *L. infantum*. **CONCLUSÕES:** Três das seis proteínas produzidas induziram a linfoproliferação, sendo a maior linfoproliferação encontrada para PBMC estimulado com a proteína sem domínios repetitivos (rLci2-NT-CT). Avaliações adicionais são necessárias para comprovar a utilidade destas moléculas em formulação de vacina contra leishmaniose visceral canina.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, Cão, Proteínas recombinantes, Vacina.

MENDES, Jéssica Mariane Ferreira. Production and evaluation of candidates recombinant antigen component of a vaccine against canine visceral leishmaniasis. 126 f. il. Dissertation (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

ABSTRACT

An effective vaccine against visceral leishmaniasis (VL) dog can help to control the disease in man. Aiming at development of a vaccine against canine VL, recombinant antigens of *L. infantum* were selected in our laboratory by using a mixture of sera from humans or dogs naturally infected with *L. infantum*. Some of these antigens were tested in different immunization protocols, including use of different adjuvants in mice or dogs. The immunization of mice or dogs with a recombinant antigens (rLci2B) used alone or in combination with saponin induced Th2 response or Th1 / Th2, respectively, did not protective against experimental infection. With the determination of the deduced amino acid sequence it was noted that most of the antigens selected segment has a unique amino acid sequence (non-repetitive domain) and segments of amino acid sequence with repetitive motifs (repetitive domains). Possibly the inability of recombinant antigens to induce an immune response predominantly Th1 protective against LV would be due to the presence of repetitive domains that promote antigen presentation by B cells and thus stimulate an immune response Th2. To assess the direction of the immune response by two types of domain, new DNA constructs were designed to encode only the domain (s) not repetitive (s) or domain (s) not repetitive (s) and repetitive fields. **MATERIALS AND METHODS:** Were performed: a) subcloning DNA constructs (rLci3-NT-CT, rLci10-NT and rLci12-NT-CT) into a suitable plasmid for expression in *Escherichia coli*, b) determining the appropriate conditions for the production of proteins recombinant (rLci2-NT-5R-CT, rLci2-NT-CT, rLci3-NT-2R-CT, rLci3-NT-CT, rLci10-NT-2R and rLci10-NT) c) purification of recombinant proteins by chromatography affinity d) evaluating the ability of polypeptides rLci2-NT-CT, rLci3-NT-CT and rLci10-NT to induce stimulation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy dogs inoculated dermal with *L. infantum*. **RESULTS:** Three (rLci2-NT-CT, rLci2-NT-5R-CT, rLci3-NT-CT, rLci3-NT-2R-CT, rLci10-NT and rLci10-NT-2R) of the four pairs of recombinant polypeptides are expressed, produced and purified. Three recombinant antigens (rLci2-NT-5R-CT, rLci2-NT-CT and rLci3-NT-2R-CT) promoted lymphocyte proliferation in vitro using asymptomatic dogs PBMC inoculated dermal *L. infantum* **CONCLUSIONS:** Three of the six proteins produced induced lymphoproliferation, most lymphoproliferation was found to PBMC stimulated with the protein without repetitive domains (rLci2-NT-CT). Additional evaluations are necessary to confirm the utility of these molecules against canine visceral leishmaniasis vaccine formulation

Keywords: Visceral leishmaniasis, Dog, recombinant proteins, vaccine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1	Imunização de cães visando o desenvolvimento de vacina contra LV	30
Quadro 2	Caracterização dos antígenos recombinantes	31
Figura 1	Esquema das subclonagens	34
Figura 2	Acompanhamento dos cães inoculados pela via dérmica com <i>L. infantum</i>	42
Figura 3	Avaliação de DNA plasmideal por eletroforese em gel de agarose	49
Figura 4	Avaliação de polipeptídios recombinantes purificados por SDS-PAGE	52
Figura 5	Avaliação de polipeptídios purificados por <i>Western blot</i>	54
Figura 6	<i>Avaliação da carga parasitária por PCR em tempo real</i>	55
Figura 7	<i>Detecção de anticorpos IgG anti-Leishmania em cães inoculados por via dérmica com L. infantum</i>	56
Figura 8	Avaliação da produção de citocinas	57
Figura 9	Avaliação da linfoproliferação de PBMC de cães inoculados por via dérmica com <i>L. infantum</i> e cães saudáveis estimulados com SLA e PHA	59
Figura 10	Ensaio de linfoproliferação de PBMC de cães inoculados por via dérmica com <i>L. infantum</i> e cães saudáveis estimulados com antígenos recombinantes	61

Tabela 1.	Otimização da expressão de antígenos recombinantes de <i>Leishmania</i> em cepas de <i>E. coli</i>	51
Tabela 2.	Concentração de proteínas recombinantes após purificação por cromatografia de afinidade	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
ALT	Alanina aminotransferase
APC	Célula apresentadora de antígeno
AST	Aspartato aminotransferase
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BSA	Soro albumina bovina
C	Citosina
CCZ	Centro de controle de zoonoses
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CFSE	Carboxifluoresceína succinimidil éster
CLIOC	Coleção de <i>Leishmania</i> do Instituto Oswaldo Cruz
ConA	Concanavalina A
CpG	Citosina-fosfato-guanosina
CPqGM	Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz
CT	Extremidade carboxila terminal
CEUA	Comitê de Ética para o Uso de Animais
D.O	Densidade ótica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPP	Teste imunocromatográfico com plataforma de dupla migração
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FML	Manose-fucose ligante
G	Guanina

g	Força gravitacional
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etano- sulfônico
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IPTG	Isopropil- β -D-thiogalactosídeo
kDa	Kilo Daltons
LB	Luria Bertani
LV	Leishmaniose visceral
LiESA	Proteínas secretadas e excretadas de <i>L. infantum</i>
MDP	Muramil dipeptídeo
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NBT	Nitro azul de terazólio
NT	Extremidade amino terminal
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PBS	Tampão fosfato tamponado com salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PHA	Fitohemaglutinina
R	Domínio com motivo repetitivo
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
RPMI 1640	Meio 1640 do Instituto Roswell Park Memorial
SBF	Soro fetal bovino
SDS-PAGE	Duodecil sulfato de sódio
SLA	Antígenos solúveis de <i>Leishmania</i>

T	Timina
TBS	Solução salina tamponada com tris
TBS-T	Solução salina tamponada com tris contendo Tween
TGF- β	Fator de crescimento e transformador beta
Th	Célula T auxiliadora
TMB	3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Tris	Hidróximetil aminometano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DALITERATURA	19
2.1	ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	19
2.2	EPIDEMIOLOGIA E ASPECTOS CLÍNICOS.....	20
2.3	MARCADORES IMUNOLÓGICOS DE RESISTÊNCIA CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.....	22
2.4	VACINAS CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.....	24
3	OBJETIVOS	32
3.1	OBJETIVO GERAL.....	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4	METODOLOGIA	33
4.1	SEQUÊNCIAS CODIFICANTES DE PROTEÍNAS DE <i>Leishmania infantum</i>	33
4.2	PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE <i>L. infantum</i>	35
4.2.1	Otimização da expressão de proteínas de <i>L. infantum</i> em <i>E. coli</i>	35
4.2.2	Cultivo bacteriano.....	36
4.2.3	Purificação de proteínas recombinantes de <i>L. infantum</i>	37
4.2.4	<i>Western blot</i>	38
4.3	CÃES RESISTENTES E CONTROLES.....	39
4.3.1	Obtenção de cães resistentes à leishmaniose visceral canina.....	39
4.4	SEPARAÇÃO DE PBMC.....	42
4.5	ENSAIO DE LINFOPROLIFERAÇÃO.....	43

4.5.1	Ensaio de linfoproliferação utilizando timidina.....	43
4.5.2	Ensaio de linfoproliferação com CFSE.....	44
4.6	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE IFN- γ POR ELISA.....	45
4.7	AVALIAÇÃO DE IFN- γ , IL-10, IL-2 e TNF- α UTILIZANDO O KIT MILLIPLEX [®]	46
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
5	RESULTADOS	48
5.1	OBTENÇÃO DE CONSTRUÇÕES PLASMIDEAIS EM <i>pRSETA</i> SEM DOMÍNIOS REPETITIVOS.....	48
5.2	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE <i>L.</i> <i>infantum</i>	50
5.3	PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	52
5.4	AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS PURIFICADAS POR <i>WESTERN BLOT</i>	53
5.5	ACOMPANHAMENTO DOS ANIMAIS INOCULADOS POR VIA DÉRMICA COM <i>L. infantum</i>	54
5.6	AVALIAÇÃO DA LINFOPROLIFERAÇÃO FRENTE AO ESTÍMULO COM ANTÍGENOS SOLÚVEIS DE <i>Leishmania</i> (SLA) E MITÓGENO.....	58
5.7	AVALIAÇÃO DA LINFOPROLIFERAÇÃO FRENTE AOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES.....	60
6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÕES	68
8	REFERÊNCIAS	69
9	ANEXOS	76

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um conjunto de doenças infecciosas e parasitárias que tem como agentes etiológicos protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* (WHO, 2010).

Na dependência da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção e de fatores genéticos e nutricionais do hospedeiro, a infecção causada pelo protozoário pode resultar na apresentação de diferentes formas clínicas, incluindo as formas: cutânea, mucosa, cutânea difusa e visceral (WHO, 2010).

A leishmaniose visceral (LV), que é a forma clínica mais grave das leishmanioses, manifesta-se, principalmente, pela hepatoesplenomegalia, anemia, adinamia e hipergamaglobulinemia. Caso o paciente não seja tratado, ocorre evolução para o óbito em cerca de 90% dos casos (BRASIL, 2009). Essa forma clínica da enfermidade é causada principalmente por espécies do complexo *L. donovani*, o qual possui duas espécies: a *L. donovani* e a *L. infantum* (sinônimo de *L. chagasi*) (MAURICIO et al., 1999; WHO, 2010; KUHLS et al., 2011).

A transmissão de protozoários do gênero *Leishmania* de um indivíduo para outro é feita por meio de fêmeas de insetos hematófagos do gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*, insetos vulgarmente conhecidos como flebotomos (KILLICK-KENDRICK; KILLICK-KENDRICK, 1999). A transmissão ocorre quando o flebotomo, depois de realizar repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado e adquirir as formas amastigotas, oferece condições para a diferenciação do parasito em formas promastigotas metacíclicas. Ao realizar um novo repasto sanguíneo o flebotomo pode transferir as formas promastigotas metacíclicas para um hospedeiro vertebrado (BARD, 1989; ASHFORD, 2000).

As espécies de *Leishmania* podem ser classificadas em espécies de ciclo biológico antroponótico ou zoonótico, dependendo do reservatório do protozoário ser o homem ou outros animais, respectivamente (WHO, 2010). A *L. infantum*, espécie que causa LV no Brasil, tem ciclo biológico zoonótico e o cão doméstico (*Canis familiaris*) é o principal reservatório do protozoário (SHERLOCK, 1996; GUARGA J L et al., 2000; COURTENAY O et al., 2002).

As medidas de controle para a LV no Brasil incluem o tratamento dos casos humanos, o combate ao inseto vetor, identificação e eutanásia de cães infectados

pelo parasito e ações de educação em saúde (BRASIL, 2014). Essas medidas são muito onerosas e laboriosas para serem sustentadas por longos períodos de tempo. Por isso, frequentemente, as medidas de controle são descontinuadas. Como consequência, a doença encontra-se fora de controle, apresentando a tendência de atingir áreas geográficas cada vez mais extensas (WERNECK, 2010).

Uma alternativa para o controle da LV zoonótica consiste no uso de uma vacina efetiva para o cão (GRADONI, 2015; ROCK et al., 2015).

A resposta imune adquirida associada ao controle da infecção por *L. infantum* no cão é mista Th1 e Th2, com predominância da resposta celular (Th1). Durante a resposta imune protetora no cão ocorre a produção de IFN- γ , e TNF- α e ativação de células fagocíticas, com consequente destruição dos parasitas intracelulares (PINELLI et al., 1994; CARRILLO; MORENO, 2009; TURCHETTI et al., 2015).

Vários antígenos candidatos a componente de uma vacina, incluindo Fucose Manose Ligante (FML), proteína quimérica Q, LACK, MML quimérica, cisteína proteases (CPA e CPB), KMPII, TRYP, GP63, A2 e fatores excretados e secretados de formas promastigotas *Leishmania infantum* (LiESP), foram avaliados em associação com adjuvante (entre eles, saponina Quil A, uma fração de saponina denominada QA-21 e MPL-SE) em camundongos e em cães, mostrando graus variados de proteção contra a infecção causada pelo desafio experimental (GRADONI, 2015).

No momento, existem duas vacinas contra LV canina disponíveis no mercado, a Leish-Tec (Hertape) e a Cani-Leish (Virbac), licenciadas no Brasil e na Europa, respectivamente. A vacina Leish-Tec é formulada com a proteína recombinante de *L. donovani* A2 e saponina Quil A, enquanto que a vacina Cani-Leish é formulada com LiESP e a fração de saponina QA-21.

Em um ensaio de fase II da Leish-Tec, realizado com cães Beagle, após o acompanhamento por 14 meses, a vacina mostrou uma eficácia de 60% de prevenir o desenvolvimento de manifestações clínicas compatíveis com LV, nos animais imunizados após o desafio experimental com 5×10^7 formas promastigotas de *L. infantum* por via venosa. Contudo, a avaliação de parasitos em cultura de aspirado de medula óssea mostrou a presença de *Leishmania*, ou seja, infecção ativa (MANZILLO et al., 2013), em 4 de 7 dos animais vacinados (FERNANDES et al., 2008). Os autores do estudo com A2 mencionam em uma publicação de 2012 a

realização de um ensaio de fase III da Leish-Tec com 1650 cães saudáveis de área endêmica para LV. Infelizmente, até o presente momento, os resultados detalhados de tal ensaio ainda não estão disponíveis (FERNANDES et al., 2012).

Um estudo de fase II realizado com a formulação de LiESP com monofosforil dipeptídeo (MDP) em cães Beagle, no qual os animais foram acompanhados por 13 meses após o desafio com 1×10^8 formas promastigotas de *L. infantum* por via venosa, mostrou eficácia de 100% de proteção contra o aparecimento de sinais clínicos nos cães imunizados. Em apenas 1 dos 3 dos cães vacinados com a menor dose da vacina (50 µg), foi detectada *Leishmania* em cultura de aspirado de medula óssea, e portanto, infecção ativa (LEMESRE et al., 2005).

Em um ensaio de fase III da vacina Cani-Leish (formulada com LiESP e QA-21) realizado com cães Beagle, no qual os animais foram seguidos por 24 meses após alojamento em uma área endêmica, foi observada uma eficácia de 68% relativa ao surgimento de manifestações clínicas compatíveis com LV. A avaliação de parasitismo por cultura de material aspirado de medula ou linfonodo, mostrou que 12,2% e 33,3% dos animais vacinados e do grupo controle, respectivamente, exibiam infecção ativa (OLIVA et al., 2014).

Dessa maneira, as vacinas contra LV canina disponíveis até o momento promovem apenas proteção parcial contra o desenvolvimento de doença e infecção ativa. Além disso, ainda não se sabe se o nível de proteção oferecido pelas vacinas disponíveis é suficiente para promover o controle da infecção e/ou doença em cães e contribuir para o controle da doença em seres humanos. Por isso, pesquisas visando o desenvolvimento de vacinas mais eficazes contra LV canina devem ser continuadas.

Visando o desenvolvimento de uma vacina contra LV canina, em nosso laboratório, antígenos recombinantes de *L. infantum* foram selecionados, a partir de uma biblioteca de cDNA e outra genômica em fago lambda, pelo uso de uma mistura de soros de cães e pacientes humanos com LV (TEIXEIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011). Alguns destes antígenos foram avaliados em diferentes protocolos de imunização e induziram resposta imune Th2 ou Th1/Th2 em camundongos BALB/c, não protetoras frente ao desafio experimental com *L. infantum* (PINHEIRO, 2011). Quando um desses antígenos (denominado rLci2B) foi utilizado em associação com Montanide ISA 720 e/ou oligonucleotídeos ricos em CpG (WERNETTE et al., 2002)

na imunização de cães observou-se indução de resposta imune humoral e celular fraca, não protetora contra um desafio experimental (dados não publicados).

Com a caracterização dos antígenos recombinantes selecionados observou-se que vários deles apresentavam sequências de aminoácidos com padrão repetitivo (domínios repetitivos) e segmento(s) não repetitivo(s) (domínios não repetitivos). Como proteínas com domínios repetitivos tendem a promover a apresentação de antígenos por linfócitos B e a indução de resposta imune humoral ou Th2 (GOTO et al., 2006; DEY et al., 2008; LINDELL et al., 2008), uma explicação para a falha dos antígenos recombinantes selecionados em induzir resposta imune predominantemente Th1, em camundongos ou em cães, provavelmente protetora contra a infecção, seria a existência dos domínios repetitivos nos antígeno testados.

Assim, novas construções de DNA foram concebidas para serem inseridas em um plasmídeo de modo que, através de um processo de subclonagem, pudessem ser geradas construções de DNA contendo: a) exclusivamente domínio(s) não repetitivo(s) ou b) domínio(s) não repetitivo(s) e domínios repetitivos (para serem usados como controle). Com a ajuda de alguns dos nossos colaboradores subclonagens foram realizadas para a obtenção das construções plasmideais (*pRSETA-Lci2-NT-CT*, *pRSETA-Lci2-NT-5R-CT*, *pRSETA-Lci3-NT-2R-CT*, *pRSETA-Lci10-NT-2R* e *pRSETA-Lci12-NT-4R-CT*) adequadas para a produção das proteínas recombinantes: a) sem domínio repetitivo (rLci2-NT-CT) e b) com domínio(s) não repetitivo(s) e domínios repetitivos (rLci2-NT-5R-CT, rLci3-NT-2R-CT, rLci10-NT-2R e rLci12-NT-4R-CT).

No presente trabalho, foram realizadas: a) subclonagens para a obtenção das construções *pRSETA-Lci3-NT-CT*, *pRSETA-Lci10-NT* e *pRSETA-Lci12-NT-CT*, b) otimização da expressão, produção e purificação das proteínas recombinantes rLci2-NT-CT, rLci2-NT-5R-CT, rLci3-NT-CT, rLci3-NT-2R-CT, rLci10-NT e rLci10-NT-2R, e c) avaliação da capacidade das proteínas recombinantes purificadas em induzir proliferação de linfócitos periféricos de cães assintomáticos inoculados com *L. infantum* por via dérmica (cães resistentes a LV).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE VISCERAL

A leishmaniose visceral (LV) é uma enfermidade causada por protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*. As espécies do complexo *Leishmania donovani* são as principais espécies causadoras da LV (WHO, 2010). Esse complexo é composto pelas espécies: *L. donovani* e *L. infantum* (sinônimo de *L. chagasi*) (MAURICIO et al., 1999; KUHLS et al., 2011).

No Brasil a LV tem como agente etiológico a *L. infantum* e como principal vetor o flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis*, popularmente conhecido como mosquito palha ou birigui (BRASIL, 2014).

Os parasitas do gênero *Leishmania* apresentam um ciclo biológico heteroxênico, exibindo duas formas, a forma amastigota (sem flagelo aparente) e a forma promastigota (com flagelo aparente) (LAINSON; WARD; SHAW, 1977). No hospedeiro vertebrado, a *Leishmania* é um parasita intracelular obrigatório de células do sistema fagocitário mononuclear. No tubo digestivo do hospedeiro invertebrado, após a ingestão de amastigotas durante o repasto sanguíneo, ocorrem diversas modificações químicas e morfológicas que culminam na geração de formas flageladas infectantes denominadas promastigotas metacíclicas (BARD, 1989; ASHFORD, 2000).

A transmissão do parasita ocorre quando o flebótomo ao realizar o repasto sanguíneo em hospedeiro vertebrado infectado adquire formas amastigotas do parasita, formas amastigotas transformam-se e diferenciam-se no tubo digestivo do flebótomo em promastigotas metacíclicas, durante um segundo repasto sanguíneo, o flebótomo introduz as promastigotas metacíclicas na pele de um hospedeiro vertebrado (LAINSON; WARD; SHAW, 1977).

O ciclo biológico das espécies de *Leishmania* pode ser classificado como antroponótico ou como zoonótico, quando o principal reservatório é o homem ou outro animal, respectivamente (WHO, 2010).

A espécie *L. donovani* exibe ciclo antroponótico e afeta principalmente a Ásia (região nordeste da Índia, sudoeste do Nepal, central de Bangladesh) e a África (Sudão e Sudão do Sul). A espécie *L. infantum* que apresenta ciclo zoonótico

abrange o Brasil, a bacia do mar Mediterrâneo e vários países do Oriente Médio e o cão doméstico é o principal reservatório do protozoário (WHO, 2010). O cão é um importante reservatório do protozoário, pois apresenta parasitismo cutâneo após adquirir a infecção, podendo ainda transmitir o parasita para o flebótomo mesmo quando apresenta baixa carga parasitária, facilitando desta forma a disseminação do parasita (SHERLOCK, 1996; GUARGA et al., 2000; COURTENAY O et al., 2002).

2.2 EPIDEMIOLOGIA E ASPECTOS CLÍNICOS

A LV é endêmica em vários países distribuídos em regiões tropicais e subtropicais do planeta. A incidência global é de 500 mil casos por ano, sendo que cerca de 90% dos registros encontrados na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão, Sudão do Sul e Brasil. Estima-se uma taxa de mortalidade anual de 50.000 ao redor do mundo (WHO, 2010).

No Brasil tem-se observado um aumento da incidência da doença, com registros em áreas peri-urbanas e urbanas (BRASIL, 2014). A região nordeste em 1990 apresentava cerca 90% dos casos humanos. A partir de 2000 passou a acontecer uma expansão da área geográfica afetada pela doença (WERNECK, 2010), principalmente para as regiões Norte, Centro-Oeste e Sudeste do país, tendo sido registrados em 2012 apenas 43,1 % dos casos na região nordeste (BRASIL, 2014). O aumento da área geográfica afetada pela doença está relacionado às mudanças ambientais, maior fluxo migratório de pessoas e a capacidade de adaptação do flebótomo às condições do peri-domicílio, em especial quando existe acúmulo de matéria orgânica (WERNECK, 2008).

Uma pequena parcela de seres humanos infectados com *Leishmania* desenvolve a doença em sua forma clínica clássica, a maioria dos indivíduos apresenta uma infecção subclínica ou assintomática (GAMA et al., 2004; SILVEIRA et al., 2010). O controle sobre a infecção e o desenvolvimento da doença depende do tipo de resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro frente ao patógeno (MAIA; CAMPINO, 2012), além dos fatores genéticos do protozoário e do hospedeiro e do estado nutricional do hospedeiro. Estes fatores influenciam o desfecho da infecção por *Leishmania* (CARRILLO et al., 2014). As manifestações clínicas da doença em

seres humanos são sistêmicas e incluem hepatoesplenomegalia, anemia, hipergamaglobulinemia, febre e adinamia (EVANS, 1985).

Em seres humanos, os casos não tratados evoluem para óbito em mais de 90% (BRASIL, 2014). O tratamento dos casos humanos é realizado com antimoniais pentavalentes (Glucantime), que são a drogas de primeira escolha (BRASIL, 2014), ou com anfotericina B. A anfotericina B é uma droga que exibe considerável toxicidade na apresentação convencional, porém, mostra-se menos tóxica quando formulada em lipossomas (BERN et al., 2006).

Os cães naturalmente infectados com *Leishmania* podem apresentar infecção assintomática ou desenvolver doença. Estima-se que cerca de 50-60% de cães infectados permanecem assintomáticos (MANZILLO, 2013). As principais manifestações clínicas apresentadas pelos cães que desenvolvem a doença são: perda de peso, apatia, anemia, linfadenomegalia, lesões cutâneas, lesões oculares, epistaxe, insuficiência renal, onicogribose e diarreia (CIARAMELA, 1997; MANZILLO et al., 2013; KOUTINAS; KOUTINAS, 2014).

Atualmente, o tratamento de cães com LV com as drogas utilizadas na terapia de seres humanos com a doença não é permitido no Brasil (Nota Técnica No. 023/CPV/DFIP/SDA/MAPA, MAPA, 2008). Isso se deve ao fato de que após o tratamento, os cães apresentam recidiva com frequência (SLAPPENDEL; TESKE, 1997), o tratamento não elimina necessariamente a infectividade do cão para o vetor (ALVAR et al., 1994) e pode contribuir para a seleção de cepas resistentes aos quimioterápicos disponíveis para a terapia de pacientes humanos (GRAMICCIA; GRADONI; ORSINI, 1992).

Uma vacina e/ou método imunoterápico eficaz contra leishmaniose visceral canina poderia contribuir para o controle da doença em seres humanos e em cães (TESH, 1995; DYE, 1996).

2.3 MARCADORES IMUNOLÓGICOS DE RESISTÊNCIA CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Tem sido observado que cerca de 50-60% dos cães inoculados naturalmente com *Leishmania* não apresentam sinais clínicos da doença (MANZILLO et al., 2013). O desfecho da infecção por *Leishmania* depende, sobretudo, da resposta imune do hospedeiro frente ao patógeno (MAIA; CAMPINO, 2012).

Basicamente uma resposta imune adquirida associada à proteção no cão é mista Th1 e Th2, com predominância da resposta celular (Th1). A resposta celular Th1 é caracterizada por uma elevada produção de citocinas IL-12, IFN- γ e TNF- α (PINELLI et al., 1994; STRAUSS-AYALI et al., 2005; CARRILLO; MORENO, 2009) que promovem a ativação de macrófagos, que ao produzirem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio eliminam o reservatório intracelular do parasita (MELBY et al., 1998; MURRAY; NATHAN, 1999).

Por outro lado, uma das citocinas associadas à progressão da infecção é o TGF- β , que leva à supressão da atividade de macrófagos em destruir o parasita na forma intracelular (BARRAL et al., 1993). Outra citocina associada à progressão da infecção é a IL-10. Em um estudo realizado por Alves e colaboradores (2009) foi observado que cães naturalmente infectados, sintomáticos e com alta carga parasitária apresentavam níveis aumentados de IL-10 e TGF- β em linfonodos. O aumento de IL-10 também foi detectado por Lage e colaboradores (2007) em esplenócitos de cães naturalmente infectados e que apresentavam alta carga parasitária.

IL-4 parece também estar envolvida com a suscetibilidade na leishmaniose visceral canina, sendo observado um aumento nos níveis de IL-4 em aspirado de medula óssea de cães sintomáticos (QUINNELL et al., 2001), por outro lado, níveis reduzidos desta citocina foram observados em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de cães assintomáticos experimentalmente inoculados com *L. infantum* (CHAMIZO; MORENO; ALVAR, 2005).

Outra importante característica de cães que apresentam progressão da infecção é a presença de elevados títulos de anticorpos IgG (INIESTA; GALLEGU; PORTUS, 2005). Interessantemente, alguns autores descrevem predominância de anticorpos específicos da subclasse IgG1 enquanto que outros autores mencionam

uma dominância de anticorpos específicos da subclasse IgG2 em cães susceptíveis a LV (INIESTA; GALLEGO; PORTUS, 2005; REIS et al., 2006a). Esses resultados, aparentemente contraditórios, podem ser consequência da qualidade dos anticorpos anti-IgG1 e IgG2 utilizados nos ensaio de detecção de subclasses de imunoglobulinas em cães (DAY, 2007).

O perfil de citocinas e presença de anticorpos IgG específicos anti-*Leishmania* podem atuar como biomarcadores, auxiliando na definição de grupos de animais susceptíveis e resistentes à infecção. Outro importante biomarcador é a imunofenotipagem (BOURDOISEAU et al., 1997; REIS et al., 2006b; DE ALMEIDA LEAL et al., 2014)

Neste contexto, têm sido investigados os tipos de células envolvidas com resistência e susceptibilidade em cães infectados por *L. infantum*. Bourdoiseau e colaboradores (1997) observaram uma redução na população de células TCD4⁺ e de células B (CD21⁺) em cães naturalmente infectados com *L. infantum* e que se apresentavam sintomáticos para LV.

Reis e colaboradores (2006) avaliaram grupos de cães naturalmente infectados com *L. infantum*, os quais apresentavam diferentes formas clínicas da infecção (assintomática, oligossintomática ou polisintomática) e comparou os tipos de células encontradas em cada um destes grupos. Foi observado, que cães oligossintomáticos e sintomáticos apresentavam redução da população de células B (CD21⁺) e que cães sintomáticos tinham baixo número absoluto de monócitos (CD14⁺). Entretanto cães assintomáticos e oligossintomáticos apresentavam aumento de linfócitos TCD5⁺ e TCD8⁺ quando comparado ao grupo polissintomático. As células TCD4⁺ foram encontradas aumentadas nos animais assintomáticos em relação aos sintomáticos (REIS et al., 2006b).

De Almeida Leal e colaboradores (2014) em ensaios *in vitro*, avaliando também cães naturalmente infectados com *L. infantum* com diferentes formas clínicas da doença, constataram que animais soropositivos e sintomáticos para leishmaniose visceral apresentavam uma redução no número absoluto de células TCD5⁺, bem como em suas subpopulações TCD4⁺ e TCD8⁺, além da redução no número de células B (CD21⁺) e monócitos (CD14⁺).

2.4 VACINAS CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL

Uma parcela dos seres humanos e dos cães naturalmente expostos à protozoários de espécies do complexo *L. donovani* mostra-se resistente ao surgimento da doença e apresentam resposta imune celular específica adquirida (PINELLI et al., 1994; D'OLIVEIRA JÚNIOR et al., 1997; CARRILLO; MORENO, 2009), o que sugere ser factível o desenvolvimento de uma vacina contra leishmaniose visceral, para isso deve-se buscar uma maneira de induzir artificialmente uma resposta imune semelhante à dos indivíduos que se mostram naturalmente resistentes à infecção.

Na literatura científica já foi descrito um grande número de antígenos candidatos a componente de uma vacina contra LV, desde antígenos do parasito inteiro morto ou atenuado, frações de antígenos do protozoário, até antígenos recombinantes (para serem administrados como proteína em combinação com um adjuvante ou como DNA codificante). O Quadro 1 mostra alguns dos candidatos a componente de vacina avaliados em cães.

No momento, existem duas vacinas contra a LV canina disponíveis comercialmente, a Leish-Tec (Hertape), e a Cani-Leish (Virbac), licenciadas no Brasil e na Europa, respectivamente. A vacina Leish-Tec é formulada com a proteína recombinante A2 de *L. donovani* e saponina Quil A, enquanto que a vacina Cani-Leish é formulada com LiESP e a fração de saponina QA-21.

Em 2008, Fernandes e colaboradores conduziram os estudos de fase II com a Leish-Tec, utilizando 21 cães Beagle, sendo 14 (7 vacinados e 7 controles) destes cães desafiados por via venosa com 5×10^7 formas promastigotas de *L. infantum*. A administração de 100 µg do antígeno recombinante rA2 e 250 µg de saponina foi bem tolerada pelos animais imunizados, não apresentando reações adversas como dor, febre ou ulcerações. Entretanto, quando avaliada a capacidade da vacina em prevenir o aparecimento de sinais clínicos da doença após o desafio experimental, foi observado que 2 dos 7 cães imunizados e desafiados apresentavam sintomatologia para leishmaniose visceral. Além disso, a avaliação de parasitos em cultura de aspirado de medula óssea mostrou a presença de *Leishmania*, ou seja, infecção ativa em 4 de 7 dos animais vacinados.

Em uma publicação de 2012 feita por Fernandes e colaboradores, os autores mencionam a realização de um estudo de fase III, no qual 1650 cães saudáveis de área endêmica foram acompanhados por um ano. Entre os animais vacinados com a Leish-Tec, 96% permaneceram sem infecção ativa, sendo a eficácia em torno de 71%, com base na avaliação da presença de *L. infantum* em cultura de aspirado de medula óssea. Contudo, estes dados não são conhecidos completamente, pois até o momento não foi feita uma publicação que mostre de forma detalhada como foram conduzidos estes experimentos.

O estudo de fase II da Cani-Leish foi realizado com 18 cães Beagle, os quais receberam diferentes doses da vacina (50 µg, 100 µg e 200 µg) juntamente com o adjuvante muramil dipeptídeo (MDP). Animais do grupo controle receberam apenas placebo e o adjuvante MDP. Os animais foram desafiados por via venosa com 1×10^8 formas de promastigotas de *L. infantum* e acompanhados periodicamente por 13 meses quanto ao desenvolvimento de sinais clínicos para leishmaniose visceral, presença do parasito em aspirado de medula óssea, produção de óxido nítrico *in vitro*, resposta imune celular (linfoproliferação e produção de citocinas) e humoral (produção de anticorpos IgG específicos) (LEMESRE et al., 2005).

Os cães imunizados com Cani-Leish de forma geral toleraram bem a vacina. Nenhum dos animais vacinados apresentou sinais clínicos de leishmaniose visceral ao longo dos 13 meses de acompanhamento, diferentemente dos cães que receberam placebo, dos quais, 4 de 6 desenvolveram sintomatologia entre 8-9 meses após o desafio experimental. Foi possível observar *L. infantum* em cultura de aspirado de medula óssea de todos os animais que receberam placebo, ao passo que, nos grupos vacinados com maiores doses da vacina (100 µg e 200 µg) nenhum animal apresentou *L. infantum* na cultura. Animais vacinados com doses maiores da vacina tinham maiores níveis de IgG2, bem como de IFN-γ e produção de NO em cultura. Os animais que receberam 100 µg da vacina tiveram a maior resposta linfoproliferativa *in vitro* (LEMESRE et al., 2005).

Em seguida foram feitos os testes de fase III, composto por 90 cães Beagle alocados em duas áreas endêmicas da Europa (Naples, na Itália e Barcelona, na Espanha). Foi um estudo do tipo duplo-cego randomizado, no qual os animais foram divididos em dois grupos: vacinados e não vacinados. Os cães vacinados receberam três doses da vacina em sua formulação comercial Cani-Leish, em intervalos de 21

dias a cada injeção e tiveram o reforço da imunização um ano após a primeira imunização. Estes animais foram acompanhados por 24 meses e durante este período avaliou-se: a segurança da vacina, aparecimento de sinais clínicos de leishmaniose visceral, presença de alteração em parâmetros bioquímicos, carga parasitária (isolamento do parasita por cultura de aspirado de medula óssea e quantificação por PCR), presença de anticorpos específicos e o nível de exposição dos animais nas áreas endêmicas (OLIVA et al., 2014).

Os cães tiveram uma tolerância razoável à vacina, assim como em estudos prévios. Animais vacinados predominantemente apresentavam altos títulos de IgG2 e baixa carga parasitária. Após 24 meses da infecção 33,3% dos animais do grupo controle mantiveram-se com infecção ativa, ao passo que o percentual para os animais vacinados foi de 12,2%. Sintomatologia clínica compatível com LV foi observada em 23% dos cães do grupo controle e 7,3 % dos cães vacinados. Foi observado que animais vacinados tinham uma menor chance de desenvolver sintomatologia, e mesmo quando presente, não era tão severa como o observado nos animais não vacinados (OLIVA et al., 2014).

Diante destes resultados, podemos afirmar que as vacinas contra LV canina disponíveis até o momento promovem apenas proteção parcial contra o desenvolvimento de doença e infecção ativa. Além disso, ainda não se sabe se o nível de proteção oferecido pelas vacinas disponíveis é suficiente para promover o controle da infecção e/ou doença em cães e contribuir para o controle da doença em seres humanos. Por isso, pesquisas visando o desenvolvimento de vacinas mais eficazes contra LV canina devem ser continuadas.

Visando o desenvolvimento de uma vacina contra leishmaniose visceral canina em nosso laboratório foi iniciada a busca por antígenos candidatos. Vários antígenos recombinantes de *L. infantum* foram selecionados a partir de uma biblioteca de cDNA da forma amastigota (provenientes de clones denominados Lci1, Lci2, Lci3 e Lci4) ou de uma biblioteca genômica (provenientes de clones denominados Lci5, Lci6, Lci7, Lci8, Lci9, Lci10 e Lci12) (TEIXEIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011), elaboradas em fago lambda. Para isto, antígenos recombinantes reativos a mistura de soros de cães naturalmente infectados (Lci1, Lci2, Lci3 e Lci4) e que apresentavam resposta imune humoral e celular (hipersensibilidade cutânea tardia) específicas ou antígenos recombinantes reativos

a misturas de soros de pacientes com LV (Lci5, Lci6, Lci7, Lci8, Lci9, Lci10 e Lci12) foram selecionados (MAGALHÃES, 2007; TEIXEIRA et al., 2007). A partir de clones de fagos lambda, foi realizado o processo de excisão e geração de clones de plasmídeo contendo inserto de *Leishmania*. Depois disso, os insertos foram sequenciados parcial ou totalmente. As sequências de nucleotídeos ou sequências deduzidas de polipeptídios obtidas foram usadas para comparação com sequências depositadas em bancos de dados (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> e Wellcome Trust Sanger Institute, <http://www.genedb.org/Homepage>) e, dessa maneira, os antígenos foram caracterizados (OLIVEIRA et al., 2011).

Alguns destes antígenos foram testados em diferentes protocolos de imunização. Um dos antígenos avaliados foi um polipeptídio recombinante correspondente a um fragmento carboxila terminal de cinesina denominado rLci2B (previamente referido como Lci9). A imunização de grupos de camundongos BALB/c com rLci2B ou com rLci2B em combinação com diferentes adjuvantes (adjuvante de Freund, hidróxido de alumínio, óleo de amendoim, saponina ou plasmídeo codificando IL-12 murina na forma de proteína de fusão de cadeia única-pcDNA3.1-mu-IL-12) resultou na indução de resposta imune Th2 (produção de anticorpos específicos da subclasse IgG1 e produção de IL-5), com exceção do grupo de animais injetados com rLci2B/saponina, que desenvolveu uma resposta imune mista Th1/Th2 com produção de IFN- γ e IL-5 (FRAGA, 2007).

A imunização de cães mestiços com rLci2B em combinação com o adjuvante montanide ISA 720 (Seppic, França) e oligonucleotídeo rico em CpG (ODN) ou plasmídeo codificando rLci2B (pBK-CMV-Lci2B) seguida de reforço com a proteína purificada resultou em resposta imune humoral de moderada intensidade e celular de baixa intensidade, sem proteção contra a infecção experimental com formas promastigotas de *L. infantum* (BAHIENSE e colaboradores dados não publicados).

Com a caracterização dos antígenos recombinantes selecionados observou-se que a maioria era composta por domínios repetitivos (sequências de aminoácidos repetitivas) e domínios não repetitivos. Como proteínas com domínios repetitivos, provavelmente, tendem a favorecer a apresentação de antígenos por linfócitos B e a indução de resposta imune humoral ou Th2 (GOTO et al., 2006; DEY et al., 2008), uma explicação para a dificuldade em induzir resposta imune Th1 intensa em

camundongos ou em cães após imunização com rLci2B-NH6 e/ou pBK-CMV-Lci2B, associada ou não a adjuvantes, poderia ser devido a existência dos domínios repetitivos do antígeno recombinante.

Objetivando-se determinar se polipeptídeos contendo apenas domínios não repetitivos, codificados por segmentos dos genes selecionados, seriam capazes de induzir resposta imune Th1, quando injetados isoladamente ou em combinação com adjuvantes, novas construções de DNA foram concebidas. A partir da sequência de DNA de 4 genes de *L. infantum* [LinJ14_V3.1180 (gene que codifica Lci2), LinJ34_V3.0700 e LinJ34_V3.0710 (Lci3), LinJ34_V3.2360 (Lci10) e LinJ29_V3.0110 (Lci12)], novas construções de DNA foram concebidas de modo a conter parte dos segmentos dos genes condificantes de domínio(s) não repetitivo(s) e parte dos segmentos condificantes de domínios repetitivos, gerando desta forma construções recombinantes correspondentes a parte de sequências dos genes supracitados. As construções foram concebidas para serem inseridas em um plasmídeo de modo que, através de um processo de subclonagem, pudessem ser geradas construções de DNA contendo: a) exclusivamente domínio(s) não repetitivo(s) ou b) domínio(s) não repetitivo(s) e domínios repetitivos (para serem usados como controle) (Dhalia e colaboradores, dados não publicados). As novas construções foram sintetizadas por uma empresa biotecnológica (Geneart GmbH, Regensburg, Alemanha) e inseridas no plasmídeo *pMA* ou *pMK*, gerando as construções *pMK-Lci2-NT-5R-CT*, *pMK-Lci3-NT-2R-CT*, *pMA-Lci10-NT-2R* e *pMK-Lci12-NT-4R-CT*. Previamente, alguns dos nosso colaboradores realizaram subclonagens para obtenção das construções plasmídeais (*pRSETA-Lci2-NT-CT*, *pRSETA-Lci2-NT-5R-CT*, *pRSETA-Lci3-NT-2R-CT*, *pRSETA-Lci10-NT-2R* e *pRSETA-Lci12-NT-4R-CT*) adequadas para a produção das proteínas recombinantes em *Escherichia coli*: a) sem domínio repetitivo (rLci2-NT-CT) e b) com domínio(s) não repetitivo(s) e com domínios repetitivos (rLci2-NT-5R-CT, rLci3NT-2R-CT, rLci10-NT-2R e rLci12-NT-4R-CT).

No presente trabalho, foram realizadas: a) subclonagens para a obtenção das construções plasmídeais *pRSETA-Lci3-NT-CT*, *pRSETA-Lci10-NT* e *pRSETA-Lci12-NT-CT*, b) otimização da expressão, produção e purificação das proteínas recombinantes rLci2-NT-CT, rLci2-NT-5R-CT, rLci3-NT-CT, rLci3-NT-2R-CT, rLci10-NT e rLci10-NT-2R, e c) avaliação da capacidade das proteínas recombinantes

purificadas de induzir a proliferação de linfócitos periféricos de cães inoculados com *L. infantum* por via dérmica (cães resistentes a LV).

Quadro 1 – Imunização de cães visando o desenvolvimento de vacina contra Leishmaniose visceral

Candidato a vacina contra LV	% desenvolvimento de doença no grupo teste	% desenvolvimento de doença no grupo controle	Referência Bibliográfica
<i>L. infantum</i> atenuada por Gentamicina	2,2%	35,5%	(DANESHVAR et al., 2014)
Proteínas secretadas excretadas de <i>Leishmania infantum</i> (LiESP) – Canileish	7,31%	23,1%	(OLIVA et al., 2014)
Fucose manose ligante (FML) – Leishmune	5%	25%	(BORJA-CABRERA et al., 2002)
Antígeno recombinante A2 - Leish-Tec	28,5%	71,5%	(FERNANDES et al., 2008)
Antígeno LACK (homóloga de <i>Leishmania</i> de receptores de proteína quinase C ativada) (<i>prime boost</i>)	60%	100%	(RAMIRO et al., 2003)
Proteína Q + BCG	0%	90%	(MOLANO et al., 2003)
Proteínas recombinantes cisteino peptidase (CPA + CPB)	100%	100%	(POOT et al., 2006)
Vacina de DNA codificando para os antígenos KMPII, TRYP, LACK e GP63	100%	66,6%	(RODRÍGUEZ-CORTÉS et al., 2007)

Quadro 2 – Caracterização dos antígenos recombinantes

Nome do gene	Depósito das sequências*	Nome da proteína	Função da proteína	Sequência da proteína recombinante
LinJ14_V3.1180	GeneDB e Genebank	Lci2	Cinesina K39	rLci2-NT-5R-CT
LinJ34_V3.0700 e LinJ34_V3.0710	GeneDB e Genebank	Lci3	Proteína de fixação flagelar	rLci3-NT-2R-CT
LinJ34_V3.2360	GeneDB e Genebank	Lci10	Proteína de fixação flagelar	rLci10-NT-2R
LinJ29_V3.0110	GeneDB e Genebank	Lci12	Domínio C2 em proteínas Dock 180 e Zizimina	rLci12-NT-4R-CT

***GeneDB**, <http://www.genedb.org> e **Genebank**, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral contribuir para o desenvolvimento de uma vacina contra leishmaniose visceral canina, a partir da avaliação de antígenos recombinantes selecionados previamente em nosso laboratório.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar subclonagem das construções plasmídeais *pRSETA-Lci3-NT-2R-CT*, *pRSETA-Lci10-NT-2R*, *pRSETA-Lci12-NT-4R-CT* para a geração de construções codificantes de polipeptídios contendo apenas domínio(s) não repetitivo(s) em um vetor de expressão em sistema procaríoto;
- Otimizar a expressão das proteínas recombinantes de *L. infantum* em diferentes cepas de *E. coli*;
- Produzir e purificar as proteínas recombinantes rLci2-NT-5R-CT, rLci2-NT-CT, rLci3-NT-2R-CT, rLci3-NT-CT, rLci10-NT-2R, rLci10-NT, Lci12-NT-4R-CT e Lci12-NT-CT;
- Avaliar a capacidade das proteínas recombinantes produzidas e purificadas em induzir resposta linfoproliferativa *in vitro* em cães assintomáticos inoculados por via dérmica com *L. infantum*.

4. METODOLOGIA

4.1 SEQUÊNCIAS CODIFICANTES DE PROTEÍNAS DE *LEISHMANIA INFANTUM*

As construções de DNA codificantes de segmentos dos genes *LinJ14_v3.1180* (*Lci2*), *LinJ34_V3.0700* ou *LinJ34_V3.0710* (*Lci3*), *LinJ34_V3.2360* (*Lci10*) e *LinJ29_V3.0110* (*Lci12*) com domínio(s) não repetitivo(s) e domínios repetitivos foram concebidas (*Lci2-NT-5R-CT*, *Lci3-NT-2R-CT*, *Lci10-NT-2R* e *Lci12-NT-4R-CT*) por um dos nossos colaboradores (Dr. Rafael Dhalia, Departamento de Virologia e Terapia Experimental, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife) de modo que, através de subclonagem, novas construções codificando apenas domínio(s) não repetitivo(s) repetitivos pudessem ser obtidas. As construções de DNA concebidas (Anexo III) foram sintetizadas quimicamente e inseridas em um plasmídeo (*pMA* ou *pMK*) (Geneart GmbH, Regensburg, Alemanha), gerando as construções plasmideais: *pMK-Lci2-NT-5R-CT*, *pMK-Lci3-NT-2R-CT*, *pMA-Lci10-NT-2R* e *pMK-Lci12-NT-4R-CT* (Figura 1A).

Para as subclonagens, as construções *pMK-Lci2-NT-5R-CT*, *pMK-Lci3-NT-2R-CT* e *pMK-Lci12-NT-4R-CT* foram digeridas pelas endonucleases *NheI* e *KpnI* e a construção *pMA-Lci10-NT-2R* foi digerida pelas endonucleases *XhoI* e *EcoRI*. Os insertos foram transferidos para o plasmídeo *pRSETA* (Invitrogen, Carlsbad, USA) digerido por estas mesmas enzimas. Esses experimentos foram realizados pelos Drs. Fabíola Holetz e Osvaldo Pompílio de Melo Neto, do Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife. Dessa maneira, foram obtidas as construções *pRSETA-Lci2-NT-5R-CT*, *pRSETA-Lci3-NT-2R-CT*, *pRSETA-Lci10-NT-2R* e *pRSETA-Lci12-NT-4R-CT* (Figura 1B).

Para obter as construções codificantes dos polipeptídeos *rLci2-NT-5R-CT*, *rLci3-NT-2R-CT* e *rLci12-NT-4R-CT*, compostos exclusivamente por domínios não repetitivos, as construções plasmideais *pRSETA-Lci2-NT-5R-CT*, *pRSETA-Lci3-NT-2R-CT* e *pRSETA-Lci12-NT-4R-CT* foram digeridas pelas endonucleases *XhoI* e *Sall* e os segmentos amino-terminal e carboxi-terminal do inserto foram ligados ao plasmídeo *pRSETA* também digeridos por *XhoI* e *Sall*, dando origem as construções *pRSETA-Lci2-NT-CT* (Fabíola Holetz, dados não publicados), *pRSETA-Lci3-NT-CT* e *pRSETA-Lci12-NT-CT* (Figura 1C). Para obter a construção codificante do

polipeptídeo rLci10-NT-2R, compostos por um domínio não repetitivo, a construção plasmídeoal *pRSETA-Lci10-NT-2R* foi digerida pelas enzimas *MfeI* e *EcoRI* e o DNA do plasmídeo contendo o segmento que codifica a região carboxi-terminal do inserto foi recircularizado, gerando a construção *pRSETA-Lci10-NT* (Figura 1C). Informações detalhadas das subclonagens podem ser encontradas no Anexo II.

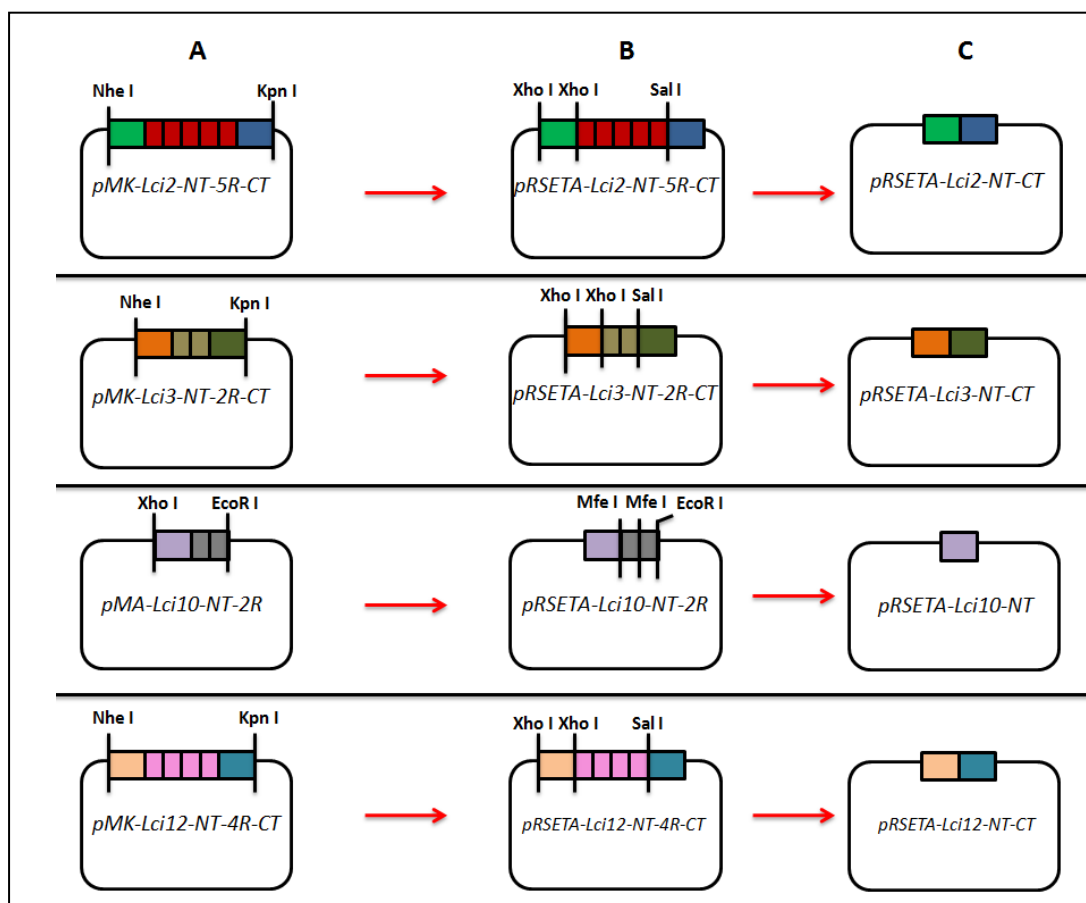


FIGURA 1. Esquema das subclonagens. Em (A) tem-se a representação do plasmídeo comercial (*pMA* ou *pMK*) contendo a sequência de cada peptídeo recombinante após síntese química realizada pela empresa biotecnológica, na extremidade encontram-se os sítios de restrição reconhecidos por cada enzima que realizou a clivagem nos pontos indicados, consistindo na primeira etapa de subclonagem, que teve como objetivo a transferência das sequências do plasmídeo comercial para o plasmídeo de expressão em bactéria (*pRSETA*). (B) representa as sequências das proteínas recombinantes em plasmídeo *pRSETA*, dentro dos peptídeos são indicados os sítios de restrição para reconhecimento por endonucleases, que foram utilizados para a remoção dos domínios repetitivos. (C) mostra a estrutura dos polipeptídeos compostos exclusivamente por segmentos não repetitivos em plasmídeo *pRSETA*.

4.2 PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *L. INFANTUM*

Com a finalidade de obter proteínas recombinantes de *L. infantum*, foi feito um ensaio de otimização da expressão dos polipeptídeos em diferentes cepas de *E. coli*, seguido de cultivo em meio líquido, lise do sedimento obtido, purificação em coluna de afinidade e por fim análise das proteínas purificadas em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e *western blot*.

4.2.1 Otimização da expressão de proteínas recombinantes de *L. infantum* em *E. coli*

A otimização da expressão de proteínas recombinantes consistiu em avaliar de forma qualitativa a intensidade de bandas correspondentes aos polipeptídeos em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) corado por azul de *Coomassie*, após o cultivo em meio líquido de diferentes cepas de *E. coli* (BL21(DE3) pLysS (Invitrogen, Carlsbad, USA), BL21(DE3) Codon plus RP (Stratagene, California, USA) e BL21(DE3) Codon plus RIL (Stratagene, California, USA) transformadas com as construções plasmídeais de interesse. Foi feita uma classificação arbitrária (discreta, moderada e intensa) quanto à forma de apresentação da banda no gel, permitindo, portanto, a comparação entre as cepas utilizadas.

O cultivo bacteriano foi feito segundo recomendações do fabricante. Resumidamente, uma colônia das diferentes cepas de bactérias foram transformadas com as construções plasmídeais (*pRSETA-Lci2-NT-5R-CT*, *pRSETA-Lci2-NT-CT*, *pRSETA-Lci3-NT-2R-CT*, *pRSETA-Lci3-NT-CT*, *pRSETA-Lci10-NT-2R*, *pRSETA-Lci10-NT*, *pRSETA-Lci12-NT-4R-CT* e *pRSETA-Lci12-NT-CT*) e cultivadas em um pré-inóculo de 6 mL de meio LB [caldo Luria-Bertani (LB): bacto-triptona a 1 % (m/v, HiMedia, Mumbai, Índia), extrato de levedura a 0,5 % (m/v, Isofar, Duque de Caxias, Brasil), cloreto de sódio a 1 % (m/v, Isofar), pH 7.0, 100 µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), 50 µg/mL de cloranfenicol para cepas BL21(DE3) Codon plus RP e RIL e na concentração de 35 µg/mL de cloranfenicol para BL21(DE3) pLysS (Sigma-Aldrich, Saint Louis USA) além de suplementação com glicose 1mg/mL (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA)], por 16 a 18 horas, sob agitação constante a uma temperatura de 37° C.

Após a saturação do pré-inóculo, diluições foram feitas em um volume de 50 mL de meio LB contendo concentrações adequadas de antibióticos (como descrito no parágrafo anterior) para obter-se um valor de densidade óptica (D.O) a 600 nm de 0,1 (Espectrofotômetro, Ultrospec 2000; Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra). Os cultivos bacterianos foram mantidos a 37°C, sob agitação de 250 rpm, quando a D.O 600nm atingiu um valor entre 0,4 e 0,6 foi feita a indução da expressão das proteínas recombinantes pela a adição de Isopropil-β-D-thiogalactosídeo (IPTG, Invitrogen, Carlsbad, EUA ou Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) em uma concentração final de 0,1 ou 1 mM.

Amostras de um mililitro de cultivo foram coletadas antes da indução com IPTG (tempo zero), 1, 3 e 5 horas após a adição do indutor. As amostras coletadas foram centrifugadas em tubos eppendorf a 12.000 x g por 60 segundos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi utilizado posteriormente para análise em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), para isso, as amostras foram normalizadas em relação a D.O atingida no momento da coleta.

4.2.2 Cultivo bacteriano

A produção das proteínas recombinantes: a) rLci2-NT-5R-CT e rLci2-NT-CT, b) rLci3-NT-2R-CT, rLci3-NT-CT e rLci10-NT-2R e c) rLci10-NT, foi realizada usando-se as cepas BL21(DE3) Codon plus RP, BL21(DE3) Codon plus RIL e BL21(DE3) pLysS, respectivamente. A produção das proteínas recombinantes foi realizada em meio líquido de um volume de 2 L para cada construção, conforme protocolo descrito no tópico anterior.

Três horas após indução com 0,1 mM de Isopropil-β-D-thiogalactosídeo (IPTG, Invitrogen, Carlsbad EUA ou Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) cada suspensão bacteriana foi centrifugada a 6.000 x g, 4°C por 15 minutos. Os sedimentos bacterianos foram armazenados a -20°C até o momento do uso.

4.2.3 Purificação de proteínas recombinantes de *L. infantum*

A lise dos sedimentos bacterianos armazenados a -20°C , foi realizada pela adição de 5 mL de tampão de lise (20 mM NaHPO_4 , 500 mM NaCl e 30 mM Imidazol, pH 7,4) e 5 mg de lisozima (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) por grama de sedimento, mistura da suspensão em aparelho vórtex e incubação por 20 minutos sob gelo. Posteriormente foram acrescentados 4 mg de desoxicolato de sódio (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) para cada grama de sedimento bacteriano. Para fragmentação de DNA genômico realizou-se sonicação, com aplicação de 12 pulsos de 500 watts, com 20 segundos de duração, com intervalos de 1 minuto entre cada dois pulsos consecutivos, mantendo-se o material sob o gelo. Posteriormente o material foi centrifugado a $17.000g$, a 4°C por 15 minutos, foi obtido desta forma uma fração solúvel e o sedimento. A amostra do sedimento foi primeiramente ressuspensa com tampão de lise e posteriormente foi adicionado tampão da amostra de gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS) duas vezes concentrado para análise por SDS-PAGE, uma amostra da porção solúvel também foi diluída em tampão de amostra de gel de poliacrilamida para a mesma finalidade. Todos os polipeptídeos produzidos estavam na forma de corpúsculo de inclusão. Os corpúsculos de inclusão foram solubilizados em tampão de lise contendo 8M de ureia (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA).

As proteínas recombinantes produzidas exibem uma cauda de histidina na extremidade amina codificada pelo plasmídeo *pRSETA* (Invitrogen, Carlsbad, USA). Por isso, a purificação das proteínas foi realizada por cromatografia de afinidade utilizando-se colunas Sepharose-níquel His-Trap Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences), conforme recomendações do fabricante. As frações de eluatos obtidas, contendo as proteínas purificadas, foram reunidas e dialisadas contra tampão fosfato tamponado com salina (PBS, NaCl a 137 mM, KCl a 2,68 mM, Na_2HPO_4 a 9,58 mM e Na_2HPO_4 a 1,47 mM, pH 7.2), e posteriormente armazenados a -70°C até o momento do uso. Amostras das proteínas e de quantidades conhecida de soro albumina bovina (BSA) (para se estabelecer uma curva de calibração para quantificação) foram fracionadas por SDS-PAGE e em, seguida, o gel foi corado por azul de *Coomassie*. A imagem do gel corado foi escaneada e o arquivo resultante foi utilizado para a análise e quantificação das bandas das proteínas recombinantes

usando-se o programa ImageQuant (GE Healthcare Life Sciences). Para a análise, o número de *pixels* de cada banda com quantidade conhecida de BSA foi determinado e usando-se regressão linear foi elaborada uma curva de calibração. A partir da curva de calibração a concentração e grau de pureza de cada proteína recombinante purificada foram determinados.

A esterilização das proteínas recombinantes purificadas foi realizada pela irradiação com 60.000 rads em tubos sob o gelo, usando-se irradiador IBL 437C, CIS Bio International.

4.2.4 *Western Blot*

Amostras das proteínas purificadas (rLci2-NT-5R-CT, rLci2-NT-CT, rLci3-NT-2R-CT, rLci3-NT-CT, rLci10-NT-2R e rLci10-NT) com cerca de 10 µg e amostras de sedimento de cultura (correspondentes a um volume de 30 µL oriundo de 50 mL de cultura) de *E. coli* produzindo as proteínas recombinantes (BL21(DE3) Codon plus RP para rLci2-NT-5R-CT e rLci2-NT-CT, BL21(DE3) Codon plus RIL para rLci3-NT-2R-CT, rLci3-NT-CT e rLci10-NT-2R, e BL21(DE3) pLysS para rLci10-NT) ou transformadas com plasmídeo sem inserto (*pRSETA*, controle negativo) foram fracionadas em gel de poliacrilamida a 10% contendo SDS. Em seguida, as proteínas dos géis foram transferidas para membranas de nitrocelulose (BIO-RAD, Hercules, EUA) utilizando-se o método semi-seco em um aparelho *transblotter* da BIO-RAD (BIO-RAD, Hercules, EUA), seguindo-se as recomendações do fabricante e conforme a descrição em (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979).

Após a transferência das proteínas, sítios de ligação inespecífica da membrana foram bloqueados pela incubação com leite Molico desnatado a 5 % (m/v) em salina tamponada com Tris (TBS, NaCl a 137 mM, Tris 24,8 mM, pH 7,5) e Tween 20 a 0,05 % (v/v, TBS-T), por 16 horas, a 4 °C. As membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-T e posicionadas em um aparelho *blotter* (Modelo MN25, Immunetics, Boston, USA). As canaletas do *blotter* receberam 360 µL de: a) soro de camundongo sadio diluído de 1:500 em TBS-T-L ou b) anticorpo monoclonal de camundongo anti-histidina (Invitrogen, Carlsbad, USA) diluído de 1:5.000 em TBS-T-L. Após a incubação do *blotter* com cada membrana por 1 hora, a temperatura ambiente, sob agitação suave, foram realizadas 3 lavagens de cada canaleta com

TBS-T. Em seguida, cada canaleta recebeu 360 µL de anticorpo anti-imunoglobulinas de camundongo conjugado a fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) diluído de 1:500 em TBS-T-L. Após incubação por 1 hora, a temperatura ambiente e sob agitação suave, cada membrana foi retirada do *blotter* e lavada 5 vezes com TBS-T e 2 vezes com TBS. Em 10 mL do tampão Tris a 100 mM, NaCl a 100 mM e MgCl₂ a 5 mM, pH 9,5) foi adicionado o substrato para fosfatase alcalina [33 µL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) a 50 mg/mL e 330 µL de *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) a 10 mg/mL sendo usado para a revelação de bandas de proteína detectadas pelos anticorpos por cerca de 5 minutos. A reação enzimática foi parada pela adição de água destilada. Depois disso, as membranas foram escaneadas.

4.3 CÃES RESISTENTES E CONTROLES

Para a avaliação da resposta linfoproliferativa frente à SLA e aos antígenos recombinantes utilizou-se células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de seis cães adultos, mestiços, de ambos os sexos, saudáveis, usados como controle negativo intacto. Foi também utilizado PBMC de seis cães adultos, mestiços, de ambos os sexos, os quais foram inoculados por via dérmica com *L. infantum* (cães resistentes), usados como grupo teste. Todos os procedimentos utilizando os cães foram conduzidos mediante aprovação do Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM – FIOCRUZ), sob protocolo de nº. 021/2011.

4.3.1 Obtenção de cães resistentes à leishmaniose visceral canina

Para a obtenção de cães resistentes à leishmaniose visceral, seis cães adultos, mestiços, de ambos os sexos, foram inoculados, por via dérmica, com 1×10^8 /animal, com formas promastigotas de *L. infantum*, em fase estacionária de cultura (BAGUES, 2016).

Previamente, *L. infantum* foi obtida de macerado de baço de um cão com leishmaniose visceral que exibia parasitismo esplênico, detectado por microscopia

em aspirado do baço. A *Leishmania* do isolado foi classificada como *L. infantum* cepa CAM/BR2013/CAO01 pelo serviço de caracterização taxonômica na Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC), Rio de Janeiro.

Os cães inoculados intradermicamente com *L. infantum* foram acompanhados através de exames clínicos, clínico-patológicos, determinação do parasitismo no baço (por cultura e PCR em tempo real), resposta imune humoral (dosagem de anticorpos por ELISA) e celular [linfoproliferação e produção de citocinas frente a estimulação antígenos solúveis de *Leishmania infantum* (SLA)], seguindo-se o esquema mostrado na Figura 2. Durante o exame clínico foram observadas características como: peso, temperatura corporal, aspecto da pele e possíveis alterações de linfonodos, baço e fígado. Estas avaliações foram feitas trimestralmente por uma médica veterinária, desde o primeiro mês após a inoculação intradérmica de *L. infantum* até o décimo oitavo mês de acompanhamento.

Os parâmetros bioquímicos e laboratoriais avaliados foram: dosagem de ureia, creatinina, proteínas (totais e frações), enzimas hepáticas (alanina aminotransferase - ALT e aspartato aminotransferase - AST) e hemograma. As análises clínico-patológicas foram realizadas antes da inoculação intradérmica de *L. infantum* e posteriormente nos tempos de um e nove meses após a inoculação.

Para a detecção de leishmânias, amostras de aspirado esplênico foram adicionadas a frascos de cultura com meio bifásico (meio NNN e meio Schneider) contendo 20% de Soro Bovino Fetal (SBF). Amostras dos frascos foram examinadas semanalmente durante um mês ao microscópio.

A determinação de carga parasitária no baço foi feita por PCR em tempo conforme método descrito por Francino e colaboradores (2006). Para isso, foi realizada a extração de DNA de amostras de aspirado esplênico coletada 12 e 21 meses a inoculação de *L. infantum*, usando-se reagentes do kit DNAeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Hilden, Alemanha). Poços das placas de microtitulação usadas para reação de PCR em tempo real continham as amostras de DNA de aspirado esplênico ou DNA de *Leishmania* correspondente a 10^{-1} , 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 ou 10^5 formas promastigotas (para elaboração da curva de calibração). As reações foram conduzidas e lidas em sistema de PCR em tempo real Fast 7500 (Applied Biosystems, Foster City, EUA). A carga parasitária foi expressa por número de leishmânias por 100 ng de DNA.

Para a avaliação da resposta imune humoral específica, foi realizado o ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Leishmania*. A mensuração dos títulos de anticorpos por ELISA foi feita em amostras de soro coletadas antes e 3, 6, 9, 12 e 14 meses após a inoculação de *L. infantum*. ELISA foi realizado em placas de microtitulação 96 poços sensibilizadas com 100 µL/poço de SLA (a 3,125 µg/mL). Amostras de soro foram adicionadas em duplicata na diluição de 1:800 em um volume de 100 µL/poço. Posteriormente, 100 µL/poço de anticorpo imunoconjugado [IgG-peroxidase anti-IgG de cão, Jackson Immunoresearch] na diluição de 1: 8.000 foram acrescentados e as placas incubados por 1 hora. A reação foi revelada pela adição de 100 µL/poço de substrato preparado com tampão fosfato/ citrato 0,05 M (1 mg/mL de TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina) em fosfato a 0,2 M, citrato a 0,1 M, pH 5,0 com 2 µL de H₂O₂ a 30 %, v/v). Para interrupção da reação enzimática, foram adicionados de 50 µL/poço de ácido sulfúrico a 4 M (Quimex, São Paulo, Brasil). A leitura de densidade óptica foi feita no comprimento de onda de 450 nm em espectrofotômetro (SpectraMax 340PC, Molecular Devices).

A resposta imune celular foi avaliada pelo ensaio de linfoproliferação e pela dosagem de citocinas. Mais detalhes referentes a estes ensaios podem ser encontrados nos tópicos a seguir.

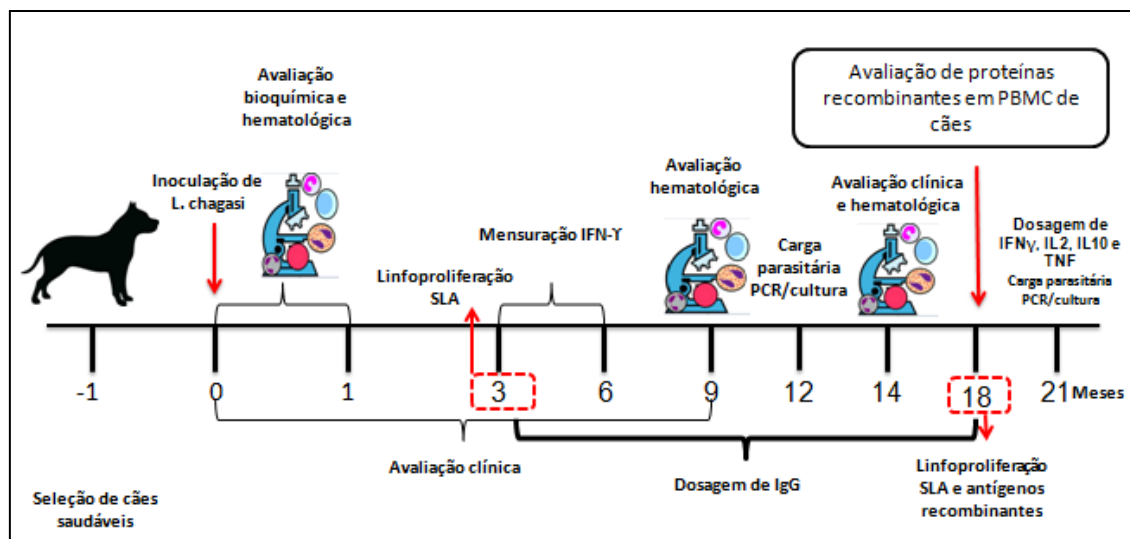


FIGURA 2. Acompanhamento dos cães inoculados pela via dérmica com *L. infantum*. Figura representativa das atividades realizadas na obtenção de cães resistentes a LV. Cães inoculados com *L. infantum* foram submetidos a avaliações clínicas, da bioquímica sérica, hematológicas e da resposta imune humoral e celular específicas. A resposta imune celular foi avaliada através de ensaio de linfoproliferação frente a estimulação com antígenos solúveis de *Leishmania* (SLA.). A produção de IFN- γ foi avaliada por ELISA, 3 e 6 após a inoculação de *Leishmania*, em sobrenadante de PBMC estimuladas com SLA. A produção de IFN- γ , IL-2, IL-10 e TNF- α foi determinada pelo ensaio multiplex em plasma. O plasma foi obtido após cultivo de sangue total heparinizado na presença de SLA por 24 horas.

4.4 SEPARAÇÃO DE PBMC

Um volume de 20 mL de sangue foi coletado da veia cefálica ou jugular de cada animal em seringa heparinizada. O sangue foi diluído na proporção de 1:2 em solução salina estéril. 20 mL da mistura foram colocados cuidadosamente sobre 10 mL de Ficoll-Hipaque (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), em tubos de poliestireno estéreis, de fundo cônico (Falcon – Corning – EUA), para separação por gradiente. Os tubos de poliestireno foram centrifugados a 450 x g por 30 minutos a 20°C. Depois disso, foi observado um anel de células no limite da separação entre o plasma e o Ficoll-Hipaque (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA). As células desse anel, correspondentes às células mononucleares, foram transferidas para um novo tubo Falcon estéril e foram lavadas três vezes com solução salina, centrifugando-se a 450 x g, 4°C, por 10 minutos a cada vez. O sedimento final foi ressuspensão em 10 mL de solução salina e uma alíquota de células foi misturada a uma solução de azul Tripán a 0,4% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) e contada em câmara de Neubauer. Dessa maneira foi determinada a concentração das células purificadas viáveis.

4.5 ENSAIO DE LINFOPROLIFERAÇÃO

A resposta linfoproliferativa *in vitro* foi avaliada em seis cães adultos, sadios (controle intactos) e em seis cães inoculados com *L. infantum*, por via dérmica (teste) e que se mostravam assintomáticos. A resposta proliferativa foi avaliada frente à estimulação com SLA e antígenos recombinantes (rLci2-NT-CT, rLci2-NT-5R-CT, rLci3-NT-CT, rLci3-NT-2R-CT, rLci10-NT e rLci10-NT-2R).

A linfoproliferação frente à SLA foi avaliada 3 meses após a inoculação intradérmica de *Leishmania* pelo ensaio de incorporação de timidina e aos 18 meses após a inoculação, avaliada pelo ensaio de marcação de PBMC com carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) e análise por citometria de fluxo.

A avaliação da capacidade dos antígenos recombinantes de promover proliferação de PBMC de cão foi feita 18 meses após a inoculação intradérmica de *L. infantum*, através da marcação das células com CFSE e análise por citometria de fluxo.

4.5.1 Ensaio de linfoproliferação utilizando timidina

Após a purificação do PBMC as células foram distribuídas em placas de microtitulação de 96 poços, na concentração de 5×10^5 célula/ poço. As células foram cultivadas na presença de meio RPMI completo, SLA (10 µg/mL) ou concanavalina A (Con A) na concentração de 2,5 µg/mL. As células foram cultivadas 37° C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. As células estimuladas com Con A foram coletadas após o terceiro dia de cultivo, e as células cultivadas nas demais condições foram coletadas após 5 dias de cultivo. Ao fim do período de cultivo aos poços foi adicionado 30 µL de meio RPMI completo contendo 1 µCi de timidina [H]³+ (atividade específica 2 µCi/mmol - Amersham Biosciences). 18 horas após a adição da timidina aos poços, as placas foram armazenadas a -20° C até o momento da contagem de partículas betas por minuto (cpm) em um aparelho Matrix 9600 Direct Beta Counter (Packard).

4.5.2 Ensaio de linfoproliferação com CFSE

A linfoproliferação frente à SLA e aos antígenos foi avaliada por citometria de fluxo após a marcação de PBMC com CFSE. Para marcação com CFSE (Invitrogen, CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit) as células mononucleares purificadas por gradiente de Ficoll foram ressuspensas em 2 mL de PBS contendo 0,1% de BSA (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), seguindo-se com a adição de 5 μ M de CFSE, incubando-se à 37 °C por 10 minutos e posteriormente mantidas em gelo durante 5 minutos. Ao fim da marcação as células foram centrifugadas a 350 x g, 20° C por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensado em meio de cultivo RPMI 1640 base (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), centrifugando-se posteriormente a 350 x g, 20° C por 10 minutos, este processo foi feito três vezes. No fim das lavagens o sedimento foi ressuspensado em 5 mL de meio RPMI 1640 completo (RPMI 1640 Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA, 10% de soro fetal bovino, Gibco BRL Life Technologies, EUA, L-glutamina a 2 mM, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA, e 2-mercaptoetanol, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA, a 0,01 mM).

Cem mil células marcadas com CFSE/poço ressuspensas em meio RPMI1640 completo foram adicionadas em duplicata em placas de microtitulação de 96 poços (Corning Incorporated Life Sciences). Aos poços foram também adicionados a uma concentração final de 1 μ g/mL e 10 μ g/mL cada um dos antígenos recombinantes (rLci2-T-5R-CT, rLci2-NT-CT, rLci3-NT-2R-CT, rLci3-NT-CT, rLci10-NT-2R e rLci10-NT), assim como SLA, além de 6 μ g/mL de PHA. A placa foi incubada a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por cinco dias. Após este período foi feita a coleta da suspensão celular em tubos de poliestireno, juntando-se as réplicas, protegendo-se da luz, adicionando-se 2 mL de PBS 1X, seguindo-se com centrifugação à 350 x g durante 10 minutos a 20°C. As células foram fixadas com PBS-Formaldeído a 1%. Prosseguiu-se com as aquisições de 10.000 eventos/tubo no citômetro de fluxo (BD FACSAria™, San Jose, CA) e posterior análise no *software* FlowJo versão 7.6.

O programa utilizado para analisar a intensidade de fluorescência, FlowJo, utiliza-se da intensidade de fluorescência emitida por cada célula e então são calculadas as medidas de proliferação. Dentre os parâmetros oferecidos pelo programa está a percentagem de células divididas. A percentagem de células

divididas é a porcentagem de células da amostra original que dividiram, assumindo que nenhuma célula morreu durante a cultura. Os valores referentes a esta variável foram normalizados, que corresponde à razão entre a (porcentagem de divisão das células cultivadas com os estímulos/ porcentagem de divisão das células cultivadas apenas com meio RPMI 1640 completo). Os valores da razão foram analisados no *software* graphpad Prism versão 5.0, considerando como medida de tendência central a mediana.

Para definir quais dos cães inoculados com *L infantum* tinham resposta linfoproliferativa frente à estimulação com SLA foi feito o cálculo da mediana e do desvio padrão do grupo controle. O desvio padrão do grupo controle foi multiplicado por três (que corresponde a três vezes o desvio padrão). Animais do grupo teste que apresentavam uma razão de proliferação acima de três vezes o desvio padrão do grupo controle foram considerados com resposta linfoproliferativa ao SLA e utilizados para avaliação de linfoproliferação com os antígenos recombinantes.

4.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE IFN- γ POR ELISA

Para avaliação da produção de IFN- γ , PBMC purificado foi cultivado na presença de meio RPMI completo, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de SLA ou 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de concanavalina A. Após 5 dias de cultivo em atmosfera contendo CO_2 o sobrenadante de cultura foi coletado e armazenado a -20°C até o uso. Os níveis de IFN- γ em sobrenadante de cultura foram mensurados pelo método de ELISA sanduíche. Para esta finalidade placas de 96 poços foram revestidas com 100 $\mu\text{L}/\text{poço}$ de anticorpo monoclonal anti-IFN- γ canino na concentração de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diluído em PBS, em seguida 100 $\mu\text{L}/\text{poço}$ de sobrenadante de cultivo de PBMC estimulado com SLA foi adicionado em duplicata. Foi feita uma incubação *overnight* e após este período adicionou-se 100 $\mu\text{L}/\text{poço}$ de anticorpo biotilado anti-IFN- γ canino na concentração de 200 ng/mL e 2% de soro de cabra inativado, sendo a placa incubada por 2 horas. Posteriormente acrescentou-se 100 $\mu\text{L}/\text{poço}$ de estreptavidina seguida de incubação por 1 hora. A reação foi revelada com (1 mg/mL de TMB (3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine) em fosfato a 0,2 M, citrato a 0,1 M, pH 5,0 com 2 μL de H_2O_2 a 30 %, v/v). Para interrupção da reação enzimática foi adicionado 50 $\mu\text{L}/\text{poço}$ de ácido sulfúrico a 1 M (Quimex, São Paulo, Brasil). A leitura de densidade óptica foi realizada no

comprimento de onda de 450 nm em espectrofotômetro (SpectraMax 340PC, Molecular Devices).

4.7 AVALIAÇÃO DE IFN- γ , IL-10, IL-2 E TNF- α UTILIZANDO O KIT MILLIPLEX[®]

As citocinas IFN- γ , IL-10, IL-2 e TNF- α foram mensuradas utilizando o kit Milliplex[®] map (Millipore, Darmstadt, Alemanha) conforme recomendações do fabricante. Amostras de sangue total dos cães foram incubadas na presença de SLA por 24 horas a 37° C. Após o período de incubação foi realizada uma centrifugação por 10 minutos, a 2.000 x g, a 4° C e o plasma foi coletado e armazenado a -20° C. Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 25 μ L da mistura de anticorpos imobilizados em *beads* magnéticas. Posteriormente foram acrescentadas a curva de calibração e as amostras armazenadas a -20° C previamente obtidas. As placas foram incubadas a 4°C, *overnight*. Após a lavagem dos poços com tampão de lavagem acrescentou-se 25 μ L de anticorpo de detecção, seguindo de agitação durante 1h em agitador de placas digital (IKA MS3, Staufen, Alemanha). Posteriormente foram acrescentados 25 μ L de Estreptavidina – Ficoeritrina e as placas foram incubadas por 30 minutos, lavadas e acrescentadas 150 μ L de tampão de ensaio. A intensidade de fluorescência e a quantidade de cada citocina em pg/mL foi obtida após leitura em aparelho LUMINEX 200 - Milliplex analyzer Millipore com auxílio do *software* Xponent 3.1.

As citocinas foram mensuradas trimestralmente do terceiro ao vigésimo mês após inoculação dos cães intradérmica com *L. infantum*. A Figura 2 mostra de forma cronológica os experimentos realizados para a caracterização do modelo de cão resistente

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a avaliação da distribuição da amostra pelos testes de D`Agostino e de Shapiro-Wilk constatou-se que os dados não apresentavam uma distribuição normal, portanto, aplicou-se estatística não paramétrica para análise dos dados de proliferação.

Os dados de linfoproliferação frente aos antígenos recombinantes dos animais do grupo controle e teste foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. Adotou-se um intervalo de confiança de 95% e nível de significância de $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 OBTENÇÃO DE CONSTRUÇÕES PLASMIDEAIS EM *PRSETA* SEM DOMÍNIOS REPETITIVOS

Com a finalidade de obter a construção *pRSETA-Lci3-NT-CT* digeriu-se *pRSETA-Lci3-NT-2R-CT* com as enzimas XhoI e Sall, dando origem a 3 fragmentos, sendo eles: 3583 pares de base (pb) referente ao plasmídeo contendo a porção carboxi-terminal da proteína, 2481 pb correspondente ao inserto e 426 pb correspondente aos segmentos repetitivos. Plasmídeo e inserto foram unidos pela ação da enzima T4-ligase, o produto de ligação foi utilizado para transformar bactérias quimicamente competentes da linhagem TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, USA). Extraíu-se o DNA dos clones obtidos pela transformação de TOP10 e digeriu-se com XhoI e EcoRI para certificação da remoção dos domínios repetitivos. A digestão das sequências com XhoI e EcoRI gerou fragmentos de 3192 pb e 2818 pb. Considerando que a porção N-terminal do inserto poderia se ligar na orientação correta ou invertida, foi feita uma digestão com Bgl II para confirmação de orientação. A digestão com Bgl II originou bandas de 4649 pb e 1361 pb (Figura 3A), o que corresponde ao plasmídeo sem domínios repetitivos e com a porção N-terminal correta. A orientação e a sequência do inserto foram posteriormente confirmados por sequenciamento de DNA.

Para a remoção dos segmentos repetitivos de *pRSETA-Lci10-NT-2R*, digeriu-se com MfeI e EcoRI. A digestão deu origem a fragmentos de: 4696 pb referente ao plasmídeo e porção amino-terminal da proteína e 804 pb referente aos domínios repetitivos. O plasmídeo contendo a porção N-terminal foi recircularizado e utilizado para transformar bactérias da linhagem TOP 10 (Invitrogen, Carlsbad, USA) quimicamente competentes. O DNA dos clones foi extraído e digerido com a enzima Hind III, para certificar-se de que os dois segmentos repetitivos haviam sido removidos. A digestão gerou fragmentos de 3350 pb e 1405 pb (Figura 3B), sugestivo de remoção de domínios repetitivos. A remoção foi confirmada por sequenciamento de DNA.

A digestão de *pRSETA-Lci12-NT-4R-CT* com XhoI e Sall originou fragmentos de: 4873 pb referente ao plasmídeo, 516 pb corresponde ao inserto e 102 pb

referente aos segmentos repetitivos. Plasmídeo e inserto foram ligados pela ação de T-4 ligase, o resultante da ligação foi utilizado para transformar bactérias TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, USA) quimicamente competentes. O DNA de colônias isoladas foi extraído e digerido por XhoI e EcoRI. Clones sugestivos de não possuírem domínios repetitivos apresentavam fragmentos de 2818 pb e 2571 pb (Figura 3C). A orientação e composição da sequência foram confirmadas por sequenciamento de DNA.

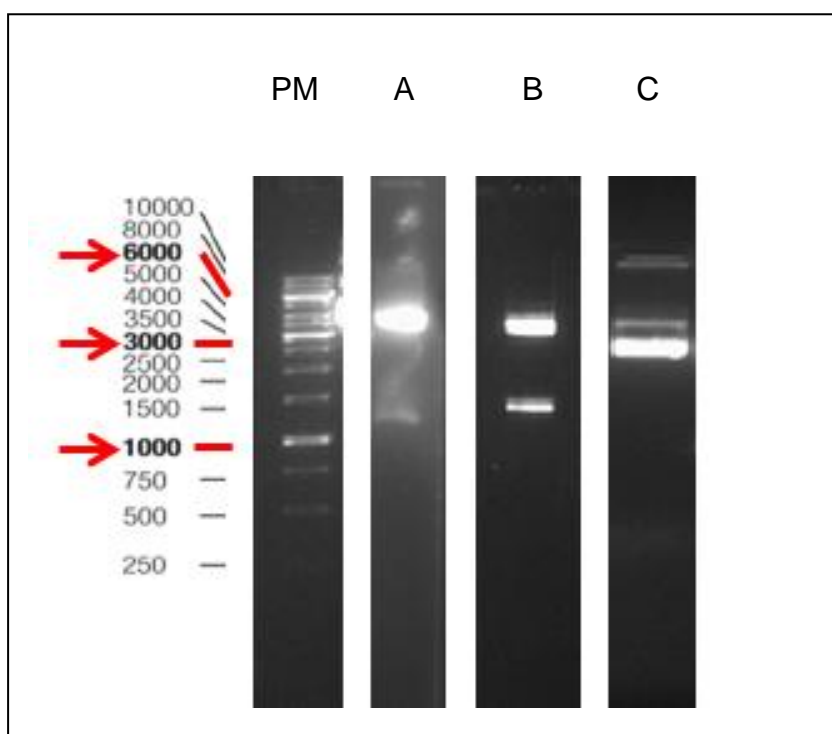


FIGURA 3. Avaliação de DNA plasmideal por eletroforese em gel de agarose. A figura apresenta o marcador de peso molecular (**PM**) e em seguida os plasmídeos digeridos com diferentes enzimas para verificação de remoção de segmentos repetitivos. **A)** refere-se ao plasmídeo *pRSETA-Lci3-NT-CT* digerido por Bgl II no intuito de confirmar a orientação do inserto. A digestão deu origem a fragmentos de 4649 pb e 1361 pb, comprovando a orientação correta do inserto. Em **B)** tem-se o plasmídeo *pRSETA-Lci10-NT* digerido por Hind III, originando fragmentos de 3350 pb e 1405 pb, referente ao plasmídeo sem segmentos repetitivos. **C)** é representativo do plasmídeo *pRSETA-Lci12-NTCT* digerido por Xho I e EcoR I, gerando bandas de 2818 pb e 2571 pb, sugerindo que houve a remoção de domínios repetitivos.

5.2 EXPRESSÃO E PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *L. INFANTUM*

As proteínas recombinantes rLci2-NT-CT e rLci2-NT-5R-CT já haviam sido expressas anteriormente em nosso laboratório, portanto seguiu-se o mesmo protocolo diferindo apenas quanto a adição de glicose (1 mg/L). Os peptídeos foram expressos em *E. coli* BL21(DE3) Codon plus RP e a indução foi feita com 0,1mM de IPTG.

A molécula de rLci3-NT-2R-CT foi inicialmente expressa em *E. coli* BL21(DE3) pLysS, porém embora fosse observado a expressão da proteína recombinante, a banda referente a proteína em gel de SDS-PAGE corado por azul de *Comassie* era discreta. Desta forma seguiu-se com a transformação de BL21(DE3) Codon plus RP e BL21(DE3) Codon plus RIL. Entretanto o crescimento no pré-inóculo só foi observado para colônias BL21(DE3) Codon plus RIL mesmo com adição de glicose a 1mg/L. O nível de expressão de rLci3-NT-2R-CT em BL21(DE3) Codon plus RIL foi satisfatório.

rLci3-NT-CT foi expresso em BL21(DE3) pLysS, BL21(DE3) Codon plus RP e BL21(DE3) Codon plus RIL. Contudo, comparando-se arbitrariamente o nível de expressão nas diferentes cepas, observou-se uma maior expressão em BL21(DE3) Codon plus RIL. A indução tanto para rLci3-NT-2R-CT quanto para rLci3-NT-CT foi feita com IPTG a 0,1mM.

A proteína recombinante rLci10-NT-2R foi expressa em BL21(DE3) pLysS, BL21(DE3) Codon plus RP e BL21(DE3) Codon plus RIL, apresentando comparativamente um maior nível de expressão na cepa BL21(DE3) Codon plus RIL. rLci10-NT inicialmente foi expressa em BL21(DE3) pLysS, como o nível de expressão foi bastante satisfatório, ensaios adicionais não foram realizados para expressão desta proteína. A concentração de indutor foi de 0,1 mM de IPTG.

As proteínas rLci12-NT-4R-CT e rLci12-NT-CT não foram expressas em qualquer das cepas avaliadas, mesmo variando-se as concentrações de indutor de 0,1 mM e 1mM de IPTG.

Após a padronização das condições de expressão, realizou-se o cultivo em suspensão em um volume de 2 L com *E. coli* transformada com plasmídeos codificantes para cada proteína recombinante. A tabela 1 contém o sumário dos

resultados obtidos referentes à otimização da expressão dos antígenos recombinantes.

Tabela 1. Otimização da expressão de antígenos recombinantes de *Leishmania* em cepas de *E. coli*. Na tabela é possível encontrar o nível de expressão obtido por cada cepa de *E. coli* quando transformadas com plasmídeos codificantes para os antígenos recombinantes. Foi adotado uma escala arbitrária para classificar o nível de expressão, tendo como critério a intensidade da banda correspondente à proteína em gel de SDS-PAGE corado por azul de *Coomassie*.

Construção	Cepa utilizada para expressão	Banda da proteína em gel de SDS-PAGE
<i>pRSETA-Lci2-NT-5R-CT</i>	BL21(DE3)Codon plus RP	Intensa
<i>pRSETA-Lci2-NT-CT</i>	BL21(DE3)Codon plus RP	Intensa
<i>pRSETA-Lci3-NT-2R-CT</i>	BL21(DE3)pLysS	Discreta *
	BL21(DE3)Codon plus RP	
	BL21(DE3)Codon plus RIL	Intensa
<i>pRSETA-Lci3-NT-CT</i>	BL21(DE3)pLysS	Moderada
	BL21(DE3)Codon plus RP	Discreta
	BL21(DE3)Codon plus RIL	Intensa
<i>pRSETA-Lci10-NT-2R</i>	BL21(DE3)pLysS	Moderada
	BL21(DE3)Codon plus RP	Discreta
	BL21(DE3)Codon plus RIL	Intensa
<i>pRSETA-Lci10-NT</i>	BL21(DE3)pLysS	Intensa
<i>pRSETA-Lci12-NT-4R-CT</i>	BL21(DE3)pLysS	Não houve expressão
	BL21(DE3)Codon plus RP	Não houve expressão
	BL21(DE3)Codon plus RIL	Não houve expressão
<i>pRSETA-Lci12-NT-CT</i>	BL21(DE3)pLysS	Não houve expressão
	BL21(DE3)Codon plus RP	Não houve expressão
	BL21(DE3)Codon plus RIL	Não houve expressão

Nota: * indica que nenhum dos critérios utilizados para a classificação do nível de expressão se aplicam, em detrimento do não crescimento da cepa BL21(DE3) Codon plus RP no pré-inóculo.

5.3 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Após obtenção de sedimento bacteriano prosseguiu-se com o processo de lise e avaliação da solubilidade das proteínas recombinantes produzidas. Todas as proteínas recombinantes foram produzidas majoritariamente na forma de corpúsculo de inclusão.

O grau de pureza das frações eluídas em coluna cromatográfica foi avaliado em gel de SDS-PAGE, as frações que continham a proteína de interesse foram unidas e dialisadas dando origem a um lote único. A Figura 4 contém amostras representativas do lote único obtido para cada proteína, todas as proteínas purificadas apresentam uma banda predominante referente à proteína intacta e outras bandas de menor peso molecular oriundas do processo de degradação ou síntese parcial.

Amostras foram colocadas em um novo gel ao lado de concentrações conhecidas de BSA objetivando-se quantificar as proteínas. Utilizando-se a ferramenta ImageQuant (GE Healthcare Life Sciences) e aplicando-se o modelo matemático de regressão linear foi possível inferir a concentração das proteínas recombinantes após a purificação. A Tabela 2 mostra a concentração obtida de cada polipeptídeo purificado, considerando-se apenas a banda com maior peso molecular.

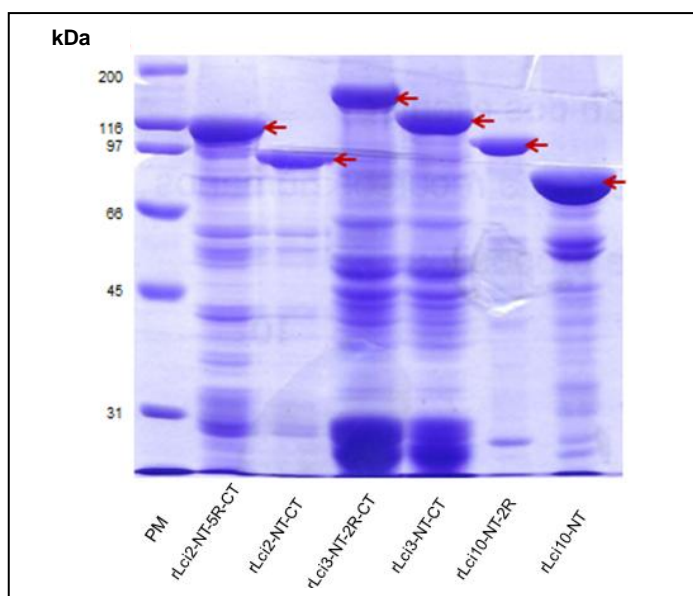


FIGURA 4. Avaliação dos polipeptídeos recombinantes purificados por SDS-PAGE. Gel de SDS-PAGE 10% corado por azul de *Commasie* contendo amostras de proteínas recombinantes obtidas após purificação por coluna de afinidade. Bandas de proteína com maior peso molecular (indicadas por seta) provavelmente representam os polipeptídeos não degradados.

Tabela 2. Concentração de proteínas recombinantes após purificação por cromatografia de afinidade. A tabela mostra a concentração final obtida para cada proteína recombinante após a purificação em coluna de afinidade. Para a determinação da concentração, foi levada em consideração somente as bandas com maior peso molecular de cada proteína. Na tabela mostra-se o peso molecular esperado para forma intacta de cada proteína quando produzida em *E. coli*.

Proteína	Peso molecular esperado	Cepa utilizada para expressão	Concentração
rLci2-NT-CT	98 kDa	BL21(DE3)Codon plus RP	207 ug/mL
rLci2-NT-5R-CT	116 kDa	BL21(DE3)Codon plus RP	500 ug/mL
rLci3-NT-CT	120 kDa	BL21(DE3)Codon plus RIL	166 ug/mL
rLci3-NT-2R-CT	150 kDa	BL21(DE3)Codon plus RIL	472 ug/mL
rLci10-NT	90 kDa	BL21(DE3)pLysS	240 ug/mL
rLci10-NT-2R	110 kDa	BL21(DE3)Codon plus RIL	203 ug/mL

5.4 AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS PURIFICADAS POR *WESTERN BLOT*

O ensaio de *western blot* foi realizado no intuito de avaliar as proteínas recombinantes purificadas que contém cauda de histidina. Com base na marcação das bandas na membrana de nitrocelulose encontrado, foi possível inferir que as proteínas co-purificadas com a proteína intacta também apresentam a cauda de histidina (Figura 5), o que sugere que pode ter ocorrido uma síntese parcial das proteínas, ou degradação durante o processo de manipulação.

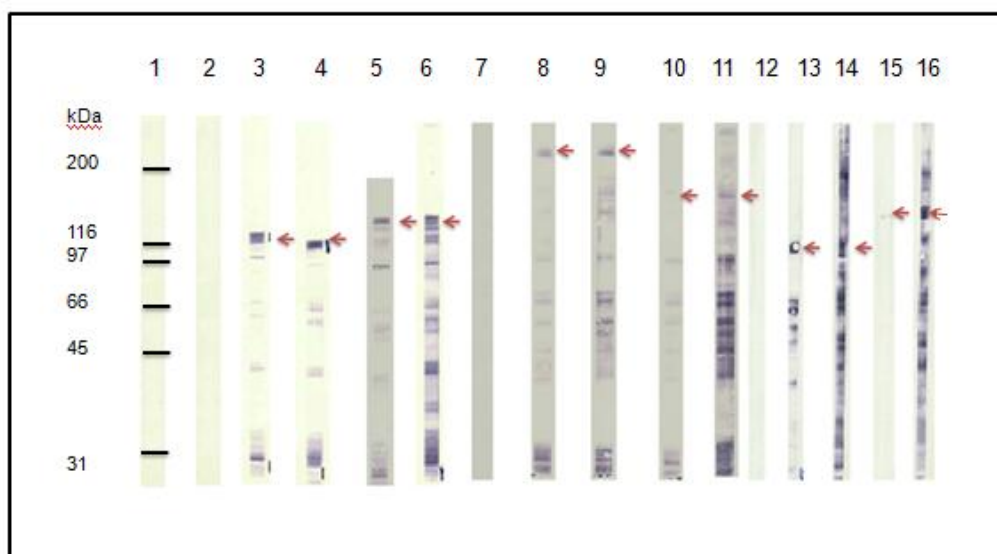


FIGURA 5. Avaliação de polipeptídios purificados por Western blot. Western blot contendo amostras de cultivo de bactérias transformadas com plasmídeo vazio e plasmídeos codificantes para proteínas recombinantes, além das proteínas na forma purificada. As raias correspondem a: 1) Marcador de peso molecular; 2) BL21(DE3) Codon plus RP transformada com plasmídeo *pRSETA* sem inserto; 3) BL21(DE3) Codon plus RP transformada com *pRSETA-Lci2-NT-CT*; 4) rLci2-NT-CT purificada; 5) BL21(DE3) Codon plus RP transformada com *pRSETA-Lci2-NT-5R-CT*; 6) rLci2-NT-5R-CT purificada; 7) BL21(DE3) Codon plus RIL transformada com plasmídeo *pRSETA* sem inserto; 8) BL21(DE3) Codon plus RIL transformada com *pRSETA-Lci3-NT-2R-CT*; 9) rLci3-NT-2R-CT purificada; 10) BL21(DE3) Codon plus RIL transformada com *pRSETA-Lci3-NT-CT*; 11) rLci3-NT-CT purificada; 12) BL21(DE3) pLysS transformada com *pRSETA* sem inserto; 13) BL21(DE3) pLysS transformada com *pRSETA-Lci10-NT*; 14) rLci10-NT purificada; 15) BL21(DE3) Codon plus RIL transformada com *pRSETA-Lci10-NT-2R* e por fim 16) rLci10-2R purificada. As setas indicam as bandas referentes à proteína em sua forma intacta.

5.5 ACOMPANHAMENTO DOS ANIMAIS INOCULADOS POR VIA DÉRMICA COM *L. INFANTUM*

Aproximadamente um mês após a inoculação de *L. infantum* por via dérmica, foi possível observar em todos os animais uma reação local, caracterizada por endureção seguida de ulceração rasa em uma área de aproximadamente 1 cm de extensão. Ao longo dos dois anos de acompanhamento dos cães inoculados, nenhum animal apresentou sintomatologia compatível com leishmaniose visceral canina.

A mediana dos parâmetros bioquímicos (proteínas totais e frações, dosagem de transaminases hepáticas, uréia e creatinina) e hematológicos (hemácias, hemoglobina, linfócitos e plaquetas) encontrava-se dentro dos limites de

normalidade (BAGUES, 2016) em todos os tempos de avaliação (antes da inoculação intradérmica, um e nove meses após inoculação).

A carga parasitária avaliada por PCR em tempo real foi considerada baixa quando comparada à carga parasitária de cães naturalmente infectados de área endêmica. Foi observada ainda uma redução do número de parasitas por grama de tecido esplênico na comparação da avaliação de 21 meses com a de 12 meses (Figura 6), porém a redução não foi estatisticamente significativa. Não foi possível isolar *L. infantum* em cultura de material de aspirado esplênico, sugerindo que os animais apresentam baixa carga parasitária

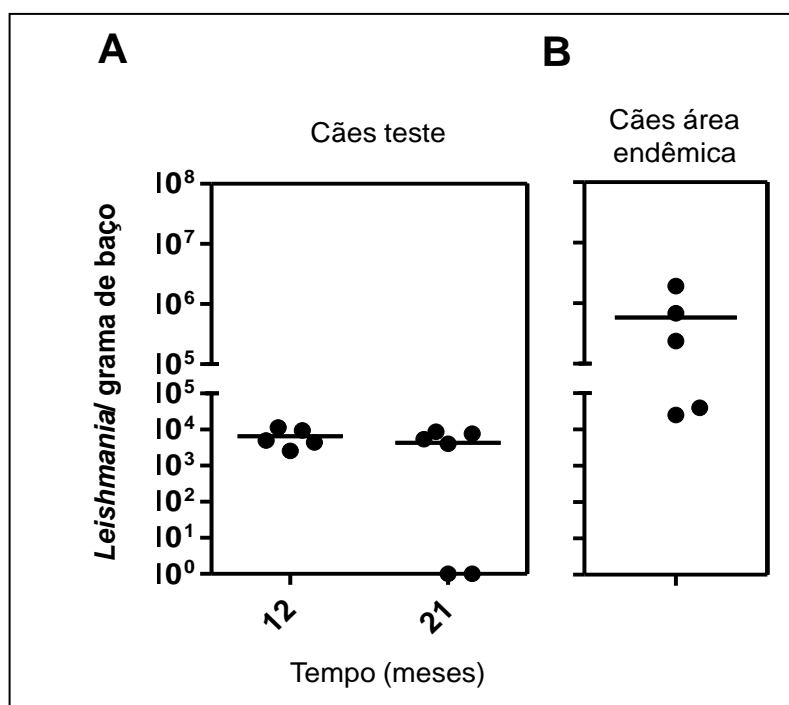


FIGURA 6. Avaliação da carga parasitária esplênica em cães inoculados com *L. infantum* por via dérmica. A carga parasitária foi determinada pela PCR em tempo real em material de aspirado esplênico. Dados da carga parasitária são de animais experimentalmente (A) ou naturalmente (B) inoculados com *Leishmania*. Os dados representam valor da carga parasitaria de cada cão avaliado.

Os cães começaram a apresentar anticorpos da classe IgG anti-*Leishmania* partir do terceiro mês após a inoculação de *Leishmania*. Os níveis de anticorpos mantiveram-se baixos até o décimo quarto mês de avaliação, tendo como base os valores de densidade óptica de amostras de animais naturalmente infectados e sintomáticos (Figura 7).

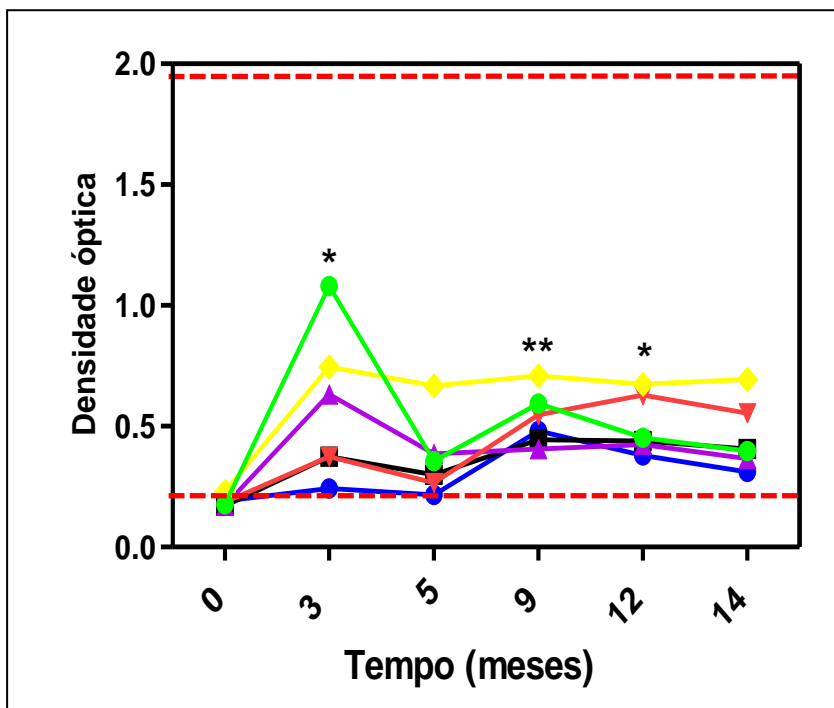


FIGURA 7. Detecção de anticorpos IgG anti-*Leishmania* em cães inoculados por via dérmica com *L. infantum*. Níveis de IgG anti-*Leishmania* antes e durante 14 meses em relação à inoculação de *Leishmania*. A detecção dos níveis de anticorpos da classe IgG foi realizada através de ensaio imunoenzimático (ELISA) e leitura em espectrofotômetro a 450 nm. Os dados mostrados correspondem aos valores de densidade óptica obtidos para amostra de soro de cada animal. A linha pontilhada inferior e superior indica o valor médio de densidade óptica obtido para amostra de soro de 6 cães de área não endêmica com a forma polissintomática de leishmaniose visceral (controle positivo de ensaio) e 6 cães (controle negativo de ensaio). Os valores de título de anticorpos foram comparados entre o mês zero e nos meses subsequentes através do Teste Não-Paramétrico de Friedman seguido do Pós-teste de Dunn. Os valores estabelecidos para a significância estatística foram definidos como: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Quanto à produção de citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-10) por PBMC ou em sangue total de cães inoculados por via dérmica com *L. infantum* frente à estimulação com SLA, mensurada por duas diferentes técnicas [ELISA e pelo kit Milliplex (Millipore)] não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nos níveis destas citocinas comparando-se o estímulo com SLA e o cultivo sem estímulo adicional, após análise dos dados pelo teste não paramétrico de Friedman e pós-teste de Dunn para TNF- α , IL-2 e IL-10. Contudo, avaliando a produção de IFN- γ , não foi observada a produção de IFN- γ três meses após a inoculação intradérmica com *L. infantum*, entretanto seis meses após a infecção experimental foi observada produção de IFN- γ por três cães (Figura 8).

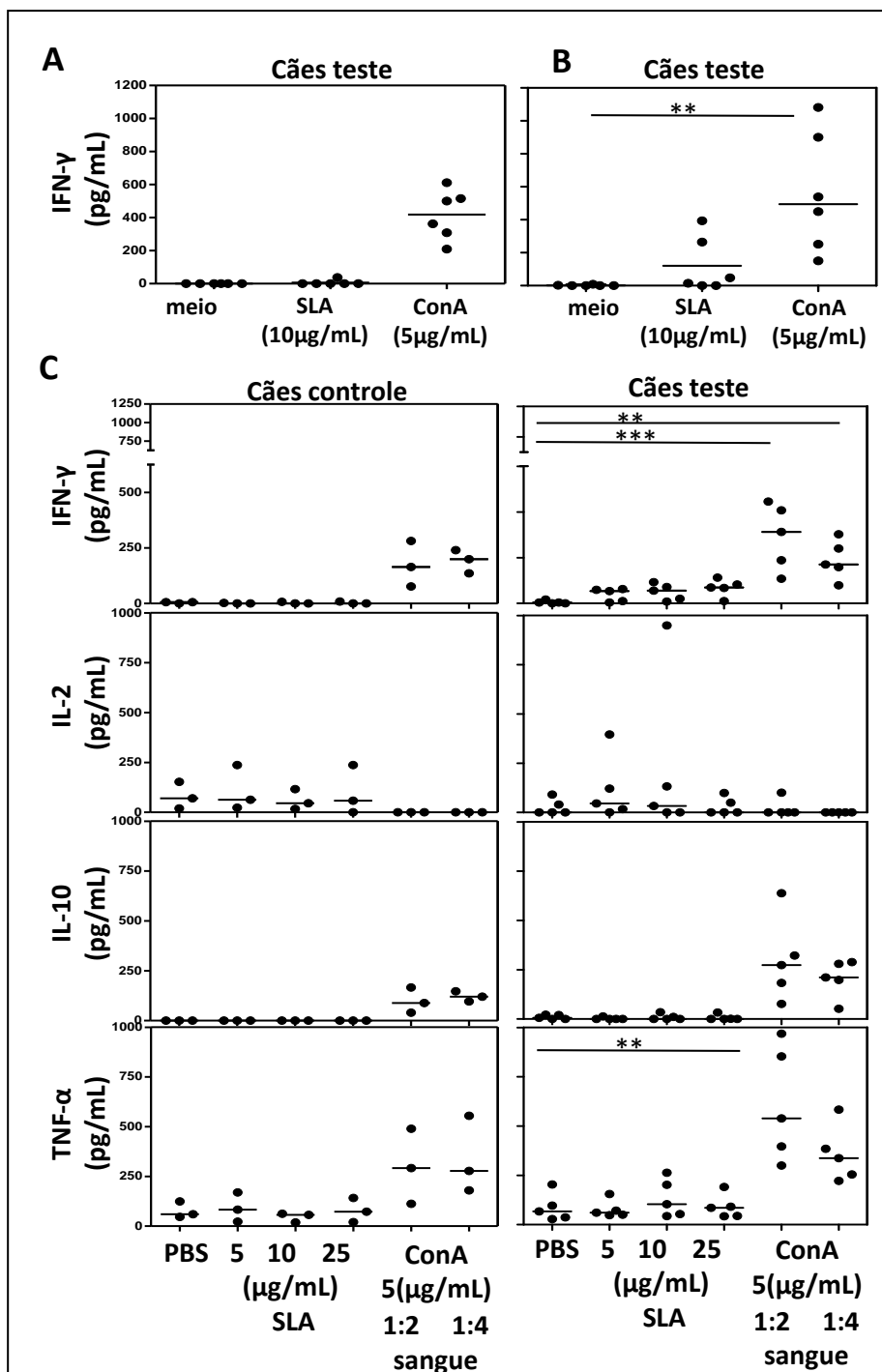


FIGURA 8. Avaliação da produção de citocinas. A produção de interferon gama foi mensurada no sobrenadante de PBMC de cães inoculados intradermicamente com *L. infantum* (teste) cultivado apenas com meio de cultura, na presença de SLA ou de mitógeno Concanavalina A (ConA) aos 3 (A) e 6 meses após a inoculação. A mensuração de interferon gama foi realizada através de ensaio imunoenzimático. A avaliação da produção de citocinas (interferon gam, IL-10, IL-2 e TNF-alfa) foi mensurada em sangue total de cães sadios ou cães inoculados com *L. infantum* por via dérmica (C). Para isso, amostras de 1 mL sangue total foram incubadas com 10 μ L de PBS, SLA ou Con A (amostras de sangue diluído de 1:2 ou 1:4 em PBS) por 24 h a 37 °C. A produção das citocinas foi avaliada em amostras de plasma ou plasma diluído pelo ensaio Multiplex. Barras: medianas; símbolos: valores individuais; análise: Teste Friedman e Pós-teste de Dunn para comparação adicional entre cada dois grupos. Os valores estabelecidos para a significância estatística foram definidos como: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

A resposta linfoproliferativa frente à SLA foi observada em cinco dos seis animais infectados com *L. infantum*, quando avaliados três meses após a infecção experimental pelo ensaio de timidina (BAGUES, 2016). Entretanto, dezoito meses após a inoculação apenas quatro dos seis animais infectados respondiam ao SLA no ensaio de marcação de PBMC com CFSE, com base na mediana e três vezes o desvio padrão do grupo controle, como será detalhado na sessão seguinte.

5.6 AVALIAÇÃO DA LINFOPROLIFERAÇÃO FRENTE AO ESTÍMULO COM ANTÍGENOS SOLÚVEIS DE *LEISHMANIA* (SLA) E MITÓGENO

O ensaio de linfoproliferação realizado no décimo oitavo mês após a infecção experimental foi feito marcando-se PBMC de cães com CFSE e posteriormente avaliando a fluorescência emitida pelas células por citometria de fluxo e análise no *software* FlowJo. Entre os parâmetros de proliferação gerados pelo *software* (índice de proliferação, índice de divisão e percentagem de células divididas) optou-se por pela percentagem de células divididas. Os dados referentes a esta variável foram normalizados (razão entre os valores de percentagem de células divididas de PBMC cultivado com SLA/ percentagem de células divididas cultivadas apenas com meio). O dado normalizado nos permite saber quantas vezes a mais as células proliferaram frente ao estímulo em relação ao meio.

Para definir quais dos cães inoculados com *L. infantum* tinham resposta linfoproliferativa frente à estimulação com SLA foi feito o cálculo da mediana e do desvio padrão do grupo controle. O desvio padrão do grupo controle foi multiplicado por três (que corresponde a três vezes o desvio padrão). Animais do grupo teste que apresentavam uma razão de proliferação acima de três vezes o desvio padrão do grupo controle foram considerados com resposta linfoproliferativa ao SLA e utilizados para avaliação de linfoproliferação com os antígenos recombinantes. Na Figura 9 é possível encontrar os dados de linfoproliferação com SLA e mitógeno PHA.

É possível observar na Figura 9A que a concentração de 1 µg/mL de SLA promoveu uma maior proliferação de PBMC de cães assintomáticos inoculados por via dérmica com *L. infantum* quando comparado a estimulação promovida por SLA

na concentração de 10 µg/mL. Desta forma os cálculos de desvio padrão foram feitos com base nesta concentração de estímulo.

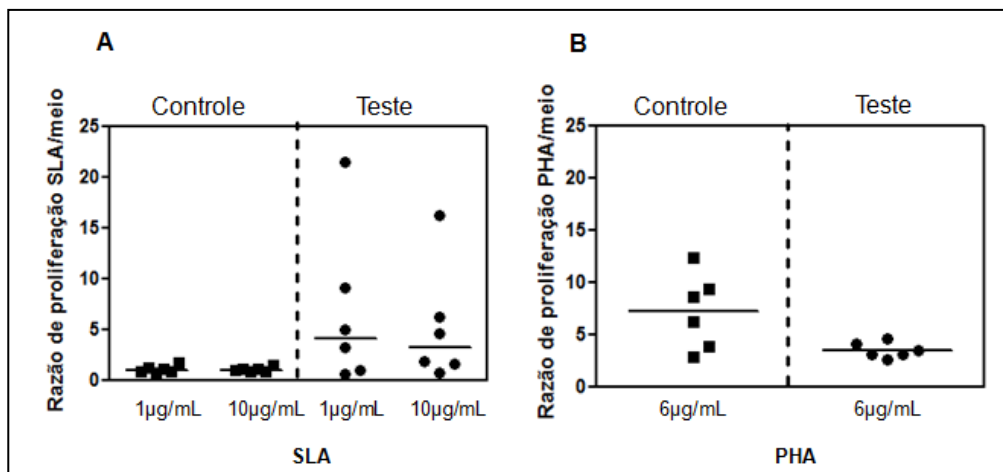


FIGURA 9. Avaliação da linfoproliferação de PBMC de cães inoculados por via dérmica com *L. infantum* e cães saudáveis estimulados com SLA e PHA. Ensaio de linfoproliferação realizado 18 meses após inoculação de seis animais com *L. infantum*. A linfoproliferação foi avaliada após marcação de PBMC de cão com CFSE e análise por citometria de fluxo. Os dados estão representados pela razão de proliferação, que corresponde ao percentual de células divididas de PBMC cultivado com SLA dividido pelo percentual de células divididas de PBMC cultivado apenas com meio. Em **A)** são as células estimuladas com SLA em diferentes concentrações e **B)** Células estimuladas com mitógeno fitohemaglutinina (PHA). Barra: mediana da razão entre estímulo e meio de cultura e símbolos: valores individuais. Os animais do grupo controle são representados pelo (■) e os animais inoculados por via dérmica com *L. infantum*, representados pelo (●). A) Os valores de mediana para o grupo controle são: 1,02 [0,90-1,34] e 1,03 [0,91-1,22] estimulados com 1 µg/mL e 1 µg/mL de SLA. Para o grupo teste os valores de mediana são 4,19 [0,92-12,22] e 3,25[1,38-8,77] após estimulação com 1 µg/mL e 10 µg/mL de SLA.

A mediana do grupo controle estimulado com 1 µg/mL de SLA foi igual a $1,02 \pm 0,33$, com base no valor de três vezes o desvio padrão é possível afirmar que quatro dos seis cães do grupo teste apresentam a razão de proliferação acima de 1 sendo portanto, respondedores a SLA e por isso utilizados na avaliação dos ensaios de proliferação com os antígenos recombinantes.

Em relação ao mitógeno PHA é possível observar que ambos os grupos de animais proliferam frente ao mitógeno. Entretanto no grupo controle ocorreu uma maior proliferação (7,47 [3,63-10,18]) quando comparado ao grupo teste (3,38 [3,03-4,25]).

5.7 AVALIAÇÃO DA LINFOPROLIFERAÇÃO FRENTE AOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES

Os antígenos recombinantes de *L. infantum* (rLci2-NT-CT, rLci2-NT-5R-CT, rLci3-NT-CT, rLci3-NT-2R-CT, rLci10-NT e rLci10-NT-2R) foram avaliados quanto a capacidade de estimular resposta linfoproliferativa de PBMC de cães inoculados intradermicamente com *L. infantum* quando comparados aos cães do grupo controle.

Foi feita a marcação das células com CFSE e análise por citometria de fluxo. Os resultados obtidos foram avaliados no *software* Flowjo, no qual foi possível obter os dados de proliferação celular baseado na fluorescência emitida pelas células marcadas. Os dados de percentagem de divisão foram normalizados (razão entre a percentagem de células divididas quando cultivadas com cada uma das proteínas recombinantes/ percentagem de divisão das células cultivadas apenas em meio).

Ao dado normalizado foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Foram encontradas diferenças estatisticamente significantes comparando-se o grupo teste e controle em relação aos antígenos rLci2-NT-CT na concentração de 10 µg/mL ($p= 0,009$) com medianas de 1,10 [0,84-1,49] e 4,99 [2,65-51,53] referentes aos grupos controle e teste respectivamente, rLci2-NT-5R-CT na concentração de 1 µg/mL ($p=0,01$) com medianas de 0,92 [0,68-1,24] grupo controle e 3,69 [2,27-10,95] para o grupo teste, e rLci3-NT-2R-CT na concentração de 10 µg/mL ($p= 0,03$) com medianas de 0,93 [0,09-1,20] e 2,80 [1,45-4,45]. Para as demais proteínas em suas diferentes concentrações não foram encontradas diferenças estatísticas, como é possível observar na Figura 10.

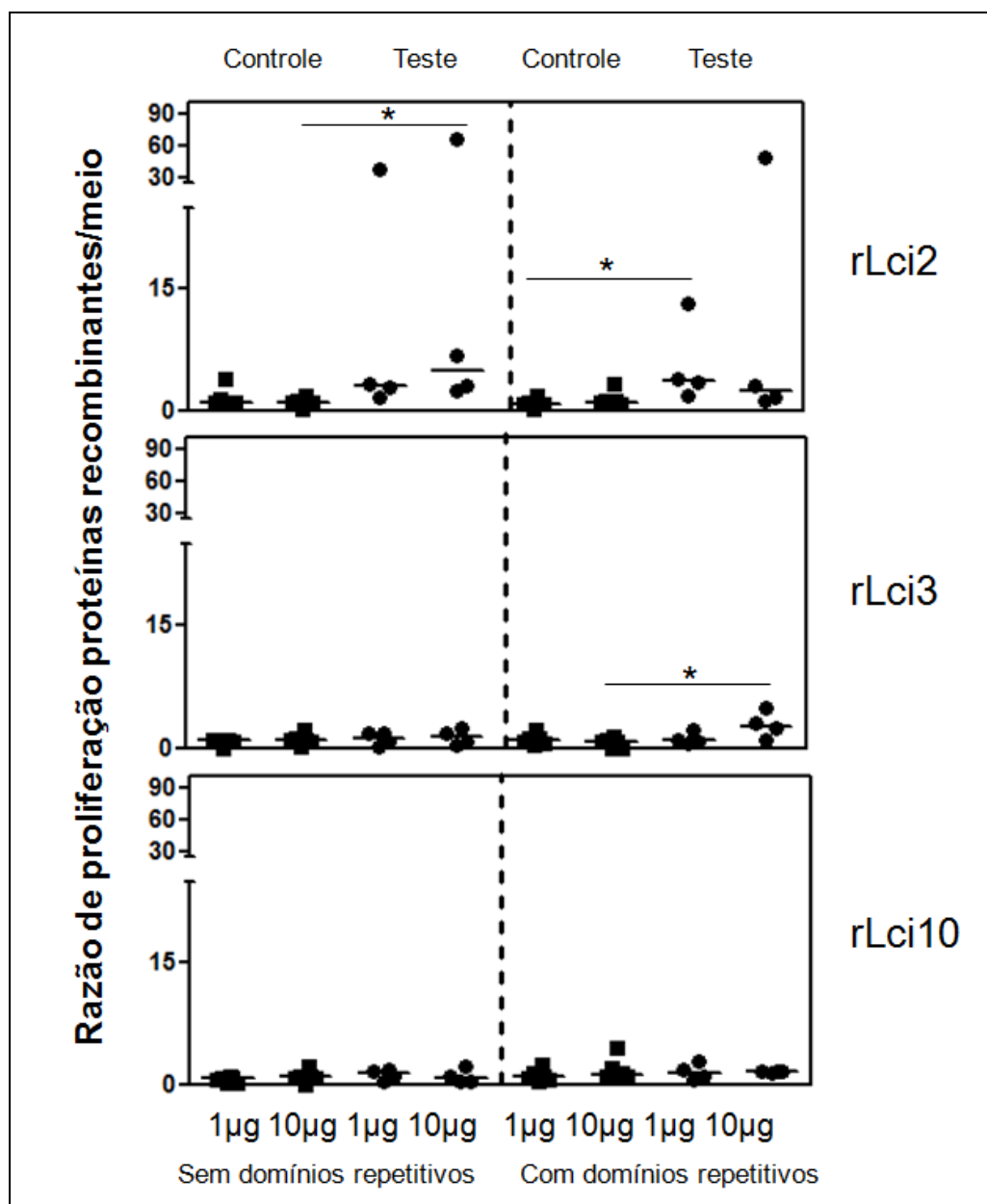


FIGURA 10. Ensaio de linfoproliferação de PBMC de cães inoculados por via dérmica com *L infantum* e cães saudáveis estimulados com antígenos recombinantes. Os gráficos apresentam a razão entre o % de divisão de células estimuladas com antígenos recombinantes pelo % de divisão das células estimuladas com meio (Razão de proliferação antígeno recombinante/meio). No eixo X estão as diferentes concentrações dos antígenos (1 µg/mL ou 10 µg/mL) com e sem domínios repetitivos. Do lado esquerdo da linha pontilhada central são os animais estimulados com antígenos sem domínios repetitivos e do lado direito os antígenos com domínios repetitivos. Cães do grupo controle, são representados pelo (■) e os cães do grupo teste, representados pelo (●). Barra: mediana da razão entre estímulo e meio de cultura e símbolos: valores individuais.* indica a existência de significância estatística, com p-valor ≤0,05. A análise foi feita com o teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney.

6. DISCUSSÃO

Visando contribuir para o desenvolvimento de uma vacina contra leishmaniose visceral canina, previamente em nosso laboratório foi feita a triagem de antígenos candidatos a partir da construção de bibliotecas genômica e de cDNA de *L. infantum* em fago lambda. Os clones de fago lambda foram selecionados a partir da reatividade ao soro de cães e humanos com leishmaniose visceral (TEIXEIRA et al., 2007, MAGALHÃES, 2007, OLIVEIRA et al., 2011).

Alguns dos antígenos triados foram avaliados em diferentes protocolos de imunização em camundongo e em cães e induziu uma resposta imune predominantemente Th2 ou Th1/Th2 não protetoras frente ao desafio experimental com *L. infantum* (DOS SANTOS, 2007; FRAGA, 2007; PINHEIRO, 2011).

Após a caracterização dos antígenos recombinantes selecionados, foi possível observar que os mesmos apresentavam segmentos de aminoácidos não repetitivos e segmentos repetitivos (domínios repetitivos). Domínios repetitivos são importantes epítomos para células B, pois, apresentam a capacidade de ativar linfócitos B independentemente de células T (CASELNA et al., 2008), o fato das proteínas utilizadas nos protocolos de imunizações anteriores estimularem uma resposta Th2 pode ser justificado pela presença dos domínios repetitivos (GOTO et al, 2006, DEY et al., 2008, LINDELL et. al., 2008).

Com base nestes conhecimentos novas construções de DNA foram concebidas, havendo a possibilidade de que a partir da subclonagem fossem geradas sequências com a) segmentos não repetitivos e segmentos repetitivos, assim como moléculas exclusivamente compostas por b) domínios não repetitivos.

No presente trabalho foram realizadas subclonagens para a remoção de domínios repetitivos de rLci3-NT-2R-CT, rLci10-NT-2R e rLci12-NT-4R-CT, obtendo-se rLci3-NT-CT, rLci10-NT e rLci12-NT-CT em plasmídeo *pRSETA* apropriado para a expressão em *E. coli*, possibilitando a produção e purificação das proteínas para posterior avaliação em ensaios *in vitro* quanto à capacidade de estimular PBMC de cães assintomáticos inoculados por via dérmica com *L. infantum*.

Os plasmídeos codificantes para as proteínas recombinantes foram utilizados para transformar diferentes cepas de *E. coli* (BL21(DE3) pLysS, BL21(DE3) Codon plus RP e BL21(DE3) Codon plus RIL). As bactérias da linhagem BL21(DE3)

apresentam um promotor T7 polimerase induzível, a enzima é codificada pelo elemento DE3, o que permite o controle da expressão da proteína de interesse. Outra característica é a deleção de genes codificantes para as proteases lon e ompT, o que impede a degradação da proteína que está sendo sintetizada (STUDIER; MOFFATTF, 1986).

Bactérias da linhagem BL21(DE3) pLysS expressam a enzima T7 lisozima, que é um indutor natural da T7 RNA polimerase, que representa um elemento adicional para o controle da expressão gênica, favorecendo a expressão de proteínas potencialmente tóxicas para a bactéria. Entretanto em testes iniciais foi observado que bactérias da linhagem BL21(DE3) pLysS transformadas com os plasmídeos codificantes para as proteínas recombinantes de *L. infantum* na ausência de glicose não cresciam em meio líquido. Desta forma a adição de glicose controlou a expressão das proteínas de *L. infantum* que provavelmente são tóxicas para *E.coli*. Isso devido ao fato da glicose exercer uma repressão transiente do operon *Lac* (TYLER; LOOMIS; MAGASANIK, 1967). Quando o operon *Lac* está ativado, ocorre a expressão das sequências das proteínas recombinantes de *L. infantum*, que ao serem tóxicas inibem o crescimento bacteriano.

As bactérias do tipo códon plus apresentam tRNA atípicos de bactérias permitindo a expressão de proteínas heterólogas. BL21(DE3) Codon plus RP contém cópias extras dos genes argU e proL e BL21(DE3) Codon plus RIL contém cópias de tRNA dos genes argU, ileY, e leuW. Outra característica que difere as duas cepas é que BL21(DE3) Codon plus RP são mais eficientes em expressar sequências ricas em CG, enquanto que BL21(DE3) Codon plus RIL são mais eficientes em expressar sequências ricas em AT (STRATAGENE, 2005).

A presença das cópias extras de tRNA nas cepas Codon plus podem ter favorecido a expressão das sequências de DNA de *L. infantum* utilizadas no presente trabalho, pois para a maioria das proteínas avaliadas (rLci2-NT-CT, rLci2-NT-5R-CT, rLci3-NT-CT, rLci3-NT-2R-CT e rLci10-NT-2R), um maior nível de expressão foi encontrado nestas cepas. Contudo não foi possível expressar as proteínas rLci12-NT-4R-CT e rLci12-NT-CT. Para que estas proteínas fossem produzidas, uma importante estratégia seria a otimização de códons para expressão em bactérias, uma vez que as sequências de rLci12-NT-4R-CT e rLci12-NT-CT quando foram concebidas tiveram os códons otimizados para expressão em

camundongo e em cães, visando utilizar as sequências na forma de vacinas de DNA.

Todas as proteínas recombinantes (rLci2-NT-5R-CT, rLci2-NT-CT, rLci3-NT-2R-CT, rLci3-NT-CT, rLci10-NT-2R e rLci10-NT) foram produzidas na forma de corpúsculo de inclusão. A formação de corpúsculos de inclusão é favorecida por altas temperaturas de cultivo (DE GROOT; VENTURA, 2006), considerando que as proteínas foram produzidas a 37°C a formação de corpúsculos de inclusão pode ter sido favorecida. Os corpúsculos de inclusão foram solubilizados com ureia 8M e posteriormente purificados por cromatografia de afinidade.

Após a purificação foi possível observar em gel de SDS-PAGE que os eluatos das proteínas purificadas eram compostos por uma banda principal e bandas de menor peso molecular abaixo da banda principal. Foi feito o *western blot* para avaliar se as proteínas do gel de SDS-PAGE apresentavam cauda de histidina. Após a marcação com anticorpo anti-histidina foi possível constatar que as bandas fracionadas no gel continham a cauda de histidina, correspondendo desta forma às proteínas recombinantes purificadas na forma degradada ou parcialmente sintetizadas.

A utilização das proteínas recombinantes na forma degradada não representa uma limitação para a avaliação da capacidade das mesmas em estimular resposta imune celular Th1, considerando-se a forma com que ocorre a apresentação de peptídeos via MHC. Quando uma célula apresentadora de antígeno (APC) processa um antígeno, o mesmo é fragmentado em peptídeos de aproximadamente 8-11 aminoácidos e posteriormente é direcionado para as moléculas de MHC I para então estimular os linfócitos TCD8⁺. Na estimulação de linfócitos TDC4⁺ via MHC II os peptídeos são fragmentados em 10-30 aminoácidos (ABBAS, 2012 p.123).

No que tange a avaliação de moléculas em sistema biológico deve-se prezar para que as mesmas tenham uma composição similar, ou com pouca variação entre os lotes, este critério foi seguido para nossas avaliações, sendo produzido um lote único de proteínas que foram utilizadas para todos os ensaios. Porém pensando em novas avaliações, como não é garantida a mesma composição, uma possibilidade é utilizar o método de eletroeluição para obter proteínas com banda única.

A eletroeluição consiste resumidamente em um processo de separação de proteínas em SDS-PAGE por peso molecular (BONGERTZ, 1989). As moléculas

migram no gel em arcos concêntricos e ao fim da corrida são misturadas em uma câmara de eluição e posteriormente direcionadas para um fracionador. A análise das frações obtidas permite saber em quais frações há a proteína de interesse com banda única. Este método foi testado com as proteínas rLci2-NT-CT e rLci2-NT-5R-CT. Ao fim do processo foi possível obter as proteínas com banda única (dados não mostrados), possibilitando em testes futuros utilizar estas proteínas compostas apenas com a banda principal.

As proteínas recombinantes produzidas e purificadas foram avaliadas quanto à capacidade de estimular a proliferação *in vitro* de linfócitos de cães assintomáticos inoculados intradermicamente com *L. infantum*. A hipótese é que linfócitos de cães resistentes funcionam como uma importante ferramenta para a triagem de antígenos candidatos à vacina contra leishmaniose visceral canina. Isso porque cães resistentes à infecção por *L. infantum* desenvolvem uma resposta imune predominantemente Th1, sendo este tipo de resposta importante para o controle da infecção.

Dados na literatura sugerem que a inoculação intradérmica do parasita favorece a estimulação de uma resposta do tipo Th1 (CHAMIZO et al., 2005; KILLICK-KENDRICK; KILLICK-KENDRICK 1994; SANTOS-GOMES; CAMPINO; ABRANCHES, 2000), provavelmente nesse processo de estabelecimento da resposta imune celular haja o envolvimento de células de Langerhans que ao migrarem da epiderme para a derme conseguem direcionar as promastigotas para os linfonodos drenantes, e este pode ser um passo essencial para a apresentação de antígenos e estimulação de resposta imune celular (Moll, 1993 revisto em KILLICK-KENDRICK; KILLICK-KENDRICK 1994).

Ao se estabelecer uma resposta imune celular predominantemente Th1 há uma maior produção de citocinas como IL-2, IL-12 e IFN- γ e resposta linfoproliferativa *in vitro* frente a SLA (CARRILLO; MORENO, 2009; CHAMIZO et al., 2005; KILLICK-KENDRICK; KILLICK-KENDRICK, 1994). Este perfil de resposta faz com que os animais permaneçam assintomáticos por muito tempo ou mesmo por tempo indeterminado e apresentem baixa carga parasitária, mantendo um controle sob a infecção, como foi visto nos trabalhos de Killick-Kendrick e colaboradores (1994) e Chamizo e colaboradores (2005).

Os animais inoculados por via dérmica com *L. infantum* em nosso laboratório mantiveram-se assintomáticos durante todo o período de acompanhamento, sendo observado apenas reação no local da inoculação. Estes animais tiveram resposta linfoproliferativa frente à SLA nos dois pontos de avaliação (3 e 18 meses após a inoculação), entretanto a linfoproliferação não foi detectada em todos os cães. A ausência de resposta linfoproliferativa frente à SLA em cães assintomáticos foi também observada por Killick-Kendrick e colaboradores (1994) ao inocular *L. infantum* por via dérmica. Provavelmente a infecção pode ter sido controlada pela resposta imune inata, uma vez que estes animais apresentavam baixa carga parasitária e baixos níveis de IgG anti-*Leishmania*. Contudo a resposta imune inata contra *L. infantum* deve ser mais explorada, para que fique melhor esclarecida a função dos receptores Toll e NOD like (Nramp1, NOD1, NOD2, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, e TLR9) no controle da infecção por *Leishmania* (TURCHETTI et al., 2015).

Desta forma, animais infectados experimentalmente por *L. infantum* que permanecem assintomáticos e que desenvolvem uma resposta linfoproliferativa contra SLA, são úteis para triar antígenos candidatos a uma vacina contra leishmaniose visceral canina. Pois alguns dos antígenos que são importantes para o estabelecimento de uma resposta imune protetora podem ser os antígenos recombinantes selecionados previamente em nosso laboratório.

Portanto, utilizou-se PBMC de cães que respondiam ao estímulo com SLA *in vitro* para avaliar a resposta linfoproliferativa frente aos antígenos recombinantes (rLci2-NT-5R-CT, rLci2-NT-CT, rLci3-NT-2R-CT, rLci3-NT-CT, rLci10-NT-2R e rLci10-NT). Foi observada resposta linfoproliferativa frente ao estímulo com os antígenos rLci2-NT-CT, rLci2-NT-5R-CT e rLci3-NT-2R-CT.

Considerando que moléculas com unidades repetitivas de aminoácidos são preferencialmente epítomos para células B (GOTO et al, 2006, DEY et al., 2008, LINDELL et. al., 2008), a capacidade de rLci2-NT-5R-CT e rLci3-NT-2R-CT em estimular uma resposta imune celular não era esperado. Entretanto, moléculas com domínios repetitivos são expressas na fase promastigota e amastigota e parecem estar envolvidas com a capacidade do parasita sobreviver em mamíferos (GOTO et al., 2010), e por isso provavelmente tem um elevado nível de expressão, havendo uma maior probabilidade de que o sistema imune reconheça esse tipo de molécula

para geração de resposta imune. Desta forma, mais importante que a estrutura da molécula seria o quanto ela é apresentada ao sistema imune. O que pode justificar a imunogenicidade também encontrada para o antígeno A2, que é composto por dez unidades repetitivas de aminoácidos (FERNANDES et al., 2012).

Apesar de ter havido proliferação frente aos antígenos rLci2-NT-5R-CT e rLci3-NT-2R-CT, a resposta linfoproliferativa mais expressiva foi para rLci2-NT-CT. Dey e colaboradores (2008) também encontraram maior resposta linfoproliferativa em células de camundongos BALB/c imunizados e posteriormente estimulados *in vitro* com o domínio motor da cinesina composto de domínios não repetitivos, quando comparada a resposta linfoproliferativa de camundongos BALB/c imunizados e estimulados com o domínio imunodominante composto por domínios repetitivos.

Mais ensaios são necessários para avaliar o real potencial destes antígenos para formulação de vacina contra leishmaniose visceral canina. Novas avaliações poderão ser feitas com as seguintes estratégias: 1) encapsular os antígenos recombinantes em lipossoma, melhorando desta forma o sistema de entrega, como visto com as proteínas recombinantes gp63 e LmST11 (JAAFARI et al., 2006; BADIEE et al., 2008); 2) realizar uma nova inoculação de *L. infantum* no grupo resistente para verificar se a resposta imune montada aos antígenos recombinantes e até mesmo ao SLA serão mais intensas; 3) realizar ensaios *in vitro* adicionando citocinas recombinantes caninas como IL-12 e IL-2 caninas, além da tentativa do bloqueio da ação de IL-10 pelo receptor solúvel de cão (concebido em nosso laboratório), esta combinação deve proporcionar uma maior estimulação de PBMC *in vitro* quando combinado aos antígenos candidatos.

7. CONCLUSÕES

Com a realização do presente trabalho foi possível:

- Obter antígenos recombinantes de *L. infantum* compostos exclusivamente por domínios não repetitivos (rLci3-NT-CT, rLci10-NT e rLci12-NT-CT);
- Expressar, produzir e purificar seis (rLci2-NT-5R-CT, rLci2-NT-CT, rLi3-NT-2R-CT, rLci3-NT-CT, rLci10-NT-2R e rLci10-NT) dos oito antígenos recombinantes previamente selecionados (rLci2-NT-5R-CT, rLci2-NT-CT, rLi3-NT-2R-CT, rLci3-NT-CT, rLci10-NT-2R, rLci10-NT, rLci12-NT-4R-CT e rLci12-NT-CT);
- Dos seis antígenos recombinantes produzidos, três (rLci2-NT-CT, rLci2-NT-2R-CT e rLci3-NT-2R-CT) tiveram a capacidade de estimular resposta linfoproliferativa em PBMC de cães assintomáticos inoculados por via dérmica com *L. infantum*;
- Entre os antígenos que estimularam resposta linfoproliferativa, o que melhor estimulou PBMC *in vitro* foi o antígeno composto apenas por domínios não repetitivos (rLci2-NT-CT).

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que alguns dos antígenos recombinantes anteriormente triados em nosso laboratório são imunogênicos para células de cães assintomáticos inoculados por via dérmica com *L. infantum*, porém novas investigações devem ser realizadas com maior número de cães e em outros modelos animais, combinado a outras moléculas imunomodulatórias para avaliar a utilidade destes antígenos na composição de uma vacina contra leishmaniose visceral canina.

8. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K; LICHTMAN, A.H;PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 7ed. Elsevier, 2012. 123p.

ALVAR, J.; MOLINA et al. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 88, n. 4, p. 371-378, 1994

ALVES, C. F. et al. Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 128, n. 4, p. 349-358, 2009.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, p. 1269-1281, 2000.

BADIEE, A. et al. Coencapsulation of CpG oligodeoxynucleotides with recombinant *Leishmania* major stress-inducible protein 1 in liposome enhances immune response and protection against leishmaniasis in immunized BALB/c mice. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 15, n. 4, p. 668-674, 2008.

BAGUES, N. T. C. **Contribuição para o desenvolvimento de uma vacina contra leishmaniose visceral canina**. 2016 (Doutorado em Biotecnologia) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2016

BARD, E. Molecular biology of *Leishmania*. **Cell Bio**, v. 67, p. 516-524, 1989.

BARRAL, A. et al. Transforming growth factor f8 as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. **Proc. Natl. Acad.Sci.**, v. 90, p. 3442-3446, 1993.

BERN, C. et al. Liposomal Amphotericin B for the Treatment of Visceral Leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, p. 917-924, 2006.

BONGERTZ, V. Eletroeluição de proteínas de gel de poliacrilamida: descrição da metodologia simples e econômica. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 31, n. 1, p. 44-47, 1989.

BORJA-CABRERA, G. P., N. N. et al. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amarante, RN). **Vaccine**, v. 20, n. 27-28, p. 3277-3284, 2002.

BOURDOISEAU, G. et al. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 56, p. 345-351, 1997.

BRASIL. **Guia de vigilância em Saúde**. 2009

BRASIL. **Guia de vigilância em Saúde**. 2014

CARRILLO, E. et al. Protein malnutrition impairs the immune response and influences the severity of infection in a hamster model of chronic visceral leishmaniasis. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e89412, 2014.

CARRILLO, E.; MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 128, n. 1-3, p. 67-70, 2009.

CASELNA, T. T. T. et al. Linfócito B: da imunologia aos imunobiológicos. **Sinop. Reumatol.**, v. 2, n. 35-57, 2008.

CHAMIZO, C.; MORENO, J.; ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 103, n. 1-2, p. 67-75, 2005.

CIARAMELA, P., OLIVA, G., DE LUNA, R., GRADONI, L., AMBROSIO, R., CORTESE, L., SCALONE, A., PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 naturally infected by *Leishmania infantum* **Vet. Record**, v. 141, p. 539-543, 1997.

COURTENAY O et al. Infectiousness in a cohort of brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **J. Infect. Dis.**, v. 186, n. 9, p. 1314-1320, 2002.

D'OLIVEIRA JÚNIOR, A. et al. Asymptomatic *Leishmania chagasi* Infection in Relatives and Neighbors of Patients with Visceral Leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 1, 1997.

DANESHVAR, H. et al. Gentamicin-attenuated *Leishmania infantum* vaccine: protection of dogs against canine visceral leishmaniosis in endemic area of southeast of Iran. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n. 4, p. e2757, 2014.

DAY, M. J. Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniosis: a review and analysis of pitfalls in interpretation. **Vet. Parasitol.**, v. 147, n. 1-2, p. 2-8, 2007.

DE ALMEIDA LEAL, G. G. et al. Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. **Vet. Parasitol.**, v. 205, n. 3-4, p. 472-82, 2014.

DE GROOT, N. S.; VENTURA, S. Effect of temperature on protein quality in bacterial inclusion bodies. **FEBS Lett**, v. 580, n. 27, p. 6471-6476, 2006.

DEY, A. et al. Kinesin motor domain of *Leishmania donovani* as a future vaccine candidate. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 15, n. 5, p. 836-42, 2008.

DOS SANTOS, L. R. **Avaliação de protocolos para indução de resposta imune contra antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi***. 2007. (Doutorado em Imunologia) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007.

DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, n. 2, p. 125-130, 1996.

EVANS, T., REIS, M.F.F.E., ALENCAR, J.E., NAIDU, T.G American Visceral Leishmaniasis (Kaka-azar). **West J. Med.**, v. 142, n. 6, p. 777-781, 1985.

FERNANDES, A. P. et al. Making an anti-amastigote vaccine for visceral leishmaniasis: rationale, update and perspectives. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 15, n. 4, p. 476-85, 2012.

FERNANDES, A. P. et al. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, v. 26, n. 46, p. 5888-5895, 2008.

MANZILLO, V. F. et al. Prospective study on the incidence and progression of clinical signs in naive dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 7, n. 5, p. e2225, 2013.

FRAGA, R. E. **Avaliação da resposta imune murina após imunização com antígeno recombinante de *Leishmania chagasi*/ *Leishmania infantum* em associação com diferentes adjuvantes.** 2007. (Mestrado em Imunologia) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007.

FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, n. 137 p. 214-221, 2006

GAMA, M. E. A. et al. Subclinical Form of the American Visceral Leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 8, p. 889-893, 2004.

GOTO, Y. et al. Upregulated expression of B-cell antigen family tandem repeat proteins by *Leishmania* amastigotes. **Infect. Immun.**, v. 78, n. 5, p. 2138-2145, 2010.

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.

GRADONI, L. Canine *Leishmania* vaccines: still a long way to go. **Vet. Parasitol.**, v. 208, n. 1-2, p. 94-100, 2015.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; ORSINI, S. Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of *Leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 86, n. 6, p. 613-620, 1992.

GUARGA J L et al. Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. **Acta Trop.**, v. 77, n. 2, p. 203-207, 2000.

INIESTA, L.; GALLEGO, M.; PORTUS, M. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniosis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 103, n. 1-2, p. 77-81, 2005.

JAAFARI, M. R. et al. Immune response and protection assay of recombinant major surface glycoprotein of *Leishmania* (rgp63) reconstituted with liposomes in BALB/c mice. **Vaccine**, v. 24, n. 29-30, p. 5708-17, 2006.

KILLICK-KENDRICK, R.; KILLICK-KENDRICK, M. Biology of sand fly vectors of Mediterranean canine eishmaniasis. **Proceedings of a Canine Leishmaniasis Forum, Barcelona (Sitges)**, p. 26-31, 1999.

KILLICK-KENDRICK, R. et al. A laboratory model of canine leishmaniasis: the inoculation of dogs with *Leishmania infantum* promastigotes from midguts of experimentally infected phlebotomine sandflies. **Parasite**, v. 1, n. 4, p. 311-318, 1994.

KOUTINAS, A. F.; KOUTINAS, C. K. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum*/chagasi. **Vet. Pathol.**, v. 51, n. 2, p. 527-38, 2014.

KUHLS, K. et al. Comparative microsatellite typing of new world leishmania infantum reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 5, n. 6, p. e1155, 2011.

LAGE, R. S. et al. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 115, n. 1-2, p. 135-145, 2007.

LAINSON, R.; WARD, R. D.; SHAW, J. J. Experimental transmission of *Leishmania chagasi*, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Nature** v. 266, 1977.

LEMESRE, J. L. et al. Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes. **Vaccine**, v. 23, n. 22, p. 2825-2840, 2005.

LINDELL, D. M. et al. B cell antigen presentation promotes Th2 responses and immunopathology during chronic allergic lung disease. **PLoS One**, v. 3, n. 9, p. e3129, 2008.

MAGALHÃES, F. B. **Identificação e avaliação de novos antígenos recombinantes para o diagnóstico das leishmanioses viscerais humana e canina.** 2007. (Doutorado em Imunologia) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Cytokine and Phenotypic Cell Profiles of *Leishmania infantum* Infection in the Dog. **J. Trop. Med.**, v. 2012, p. 541571, 2012.

MAURICIO, I. L. et al. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v. 119, p. 237-246, 1999.

MELBY, P. C. et al. Regional Differences in the Cellular Immune Response to Experimental Cutaneous or Visceral Infection with *Leishmania donovani*. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 1, p. 18-27, 1998.

MOLANO, I. et al. A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 92, n. 1-2, p. 1-13, 2003.

MURRAY, H. W.; NATHAN, C. F. Macrophage Microbicidal Mechanisms In Vivo: Reactive Nitrogen versus Oxygen Intermediates in the Killing of intracellular Visceral *Leishmania donovani*. **J. Exp. Med.**, v. 189, n. 4, p. 741-746, 1999.

OLIVA, G. et al. A randomised, double-blind, controlled efficacy trial of the LiESP/QA-21 vaccine in naive dogs exposed to two *leishmania infantum* transmission seasons. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n. 10, p. e3213, 2014.

OLIVEIRA, G. G. et al. Characterization of novel *Leishmania infantum* recombinant proteins encoded by genes from five families with distinct capacities for serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 85, n. 6, p. 1025-1034, 2011.

PINELLI, E. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 1, p. 229-235, 1994.

PINHEIRO, C. G. M. D. **Avaliação de resposta imune em camundongos utilizando diferentes protocolos de imunização com antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi***. 2011. (Doutorado em Biotecnologia) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, 2011.

POOT, J. et al. Vaccination with a preparation based on recombinant cysteine peptidases and canine IL-12 does not protect dogs from infection with *Leishmania infantum*. **Vaccine**, v. 24, n. 14, p. 2460-2468, 2006.

QUINNELL, R. J. et al. Tissue Cytokine Responses in Canine Visceral Leishmaniasis. **J of Infect Diseases**, v. 183, n. 1421-4, 2001.

RAMIRO, M. J. et al. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. **Vaccine**, v. 21, n. 19-20, p. 2474-2484, 2003.

REIS, A. B. et al. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 112, n. 3-4, p. 102-116, 2006a.

REIS, A. B. et al. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 146, n. 2, p. 303-311, 2006b.

ROCK, K. S. et al. Uniting mathematics and biology for control of visceral leishmaniasis. **Trends Parasitol.**, v. 31, n. 6, p. 251-259, 2015.

RODRÍGUEZ-CORTÉS, A. et al. Vaccination with plasmid DNA encoding KMP11, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. **Vaccine**, v. 25, p. 7962–7971, 2007.

SANTOS-GOMES, G. M.; CAMPINO, L.; ABRANCHES, P. Canine Experimental Infection: Intradermal Inoculation of *Leishmania infantum* Promastigotes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 2, p. 193-198, 2000.

SHERLOCK, Í. Ecological Interactions of Visceral Leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 671-683, 1996.

SILVEIRA, F. T. et al. A prospective study on the dynamics of the clinical and immunological evolution of human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in the Brazilian Amazon region. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 104, n. 8, p. 529-535, 2010.

SLAPPENDEL, R., J; TESKE, E. The effect of intravenous or subcutaneous administration of meglumine antimoniate (Glucantime) in dogs with leishmaniasis: A randomized clinical trial. **Vet Q**, v. 19, n. 1, p. 10-13, 1997.

STRATAGENE. **BL21-CodonPlus® Competent Cells INSTRUCTION MANUAL**. BL21-CodonPlus® Competent Cells. STRATAGENE 2005.

STRAUSS-AYALI, D. et al. Interleukin-12 augments a Th1-type immune response manifested as lymphocyte proliferation and interferon gamma production in *Leishmania infantum*-infected dogs. **Int. J. Parasitol.**, v. 35, n. 1, p. 63-73, 2005.

STUDIER, F. W.; MOFFATTF, B. A. Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-level Expression of Cloned Genes. **J. Mol. Biol.**, v. 189, p. 113-130, 1986.

TEIXEIRA, M. C. et al. A strategy for identifying serodiagnostically relevant antigens of *Leishmania* or other pathogens in genetic libraries. **Biologicals**, v. 35, n. 1, p. 51-54, 2007.

TESH, R. B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 52, n. 3, p. 287-292, 1995.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

TURCHETTI, A. P. et al. Transcription of innate immunity genes and cytokine secretion by canine macrophages resistant or susceptible to intracellular survival of *Leishmania infantum*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 163, n. 1-2, p. 67-76, 2015.

TYLER, B.; LOOMIS, W. F.; MAGASANIK, B. Transient Repression of the lac Operon. **J. Bacteriol.** v. 94, n. 6, p. 2001-2011, 1967.

WERNECK, G. L. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. **Cad. Saúde Públ.**, v. 24, n. 12, p. 2937-2940, 2008.

WERNECK, G. L. Geographic spread of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cad. Saúde Públ.**, v. 26, n. 4, p. 644-645, 2010.

WERNETTE, C. M. et al. CpG oligodeoxynucleotides stimulate canine and feline immune cell proliferation. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 84, n. 3-4, p. 223-236, 2002.

WHO. **Control of the leishmaniases**. 2010. p.1-202.

9. Anexos

Anexo I

Título:

Avaliação de antígenos recombinantes potencialmente úteis para desenvolvimento de uma vacina contra leishmaniose visceral canina

Autores:

Jéssica Mariane Ferreira Mendes^{1*}, Naiara Teixeira Carvalho¹, Cristiane Gaborggini Melo de Pinheiro¹, Geraldo Gileno de Sá Oliveira²

¹ Laboratório de Patologia e Biointervenção do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM) - Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Brasil.

² Pesquisador do Laboratório de Patologia e Biointervenção do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM) - Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

Autor correspondente:

Jéssica Mariane Ferreira Mendes

Endereço: Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Laboratório de Patologia e Biointervenção, Rua Waldemar Falcão, No. 121, Candeal. Salvador-Bahia, BRASIL. CEP. 40295-001. Tel: 55-71-3176-2257
E-mail: jmarianemendes@gmail.com

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença infectoparasitária que tem o cão como principal reservatório do agente causal, a *Leishmania infantum*. Uma vacina efetiva contra a LV canina pode contribuir para o controle da infecção no homem. Visando o desenvolvimento de uma vacina contra LV canina, antígenos recombinantes de *Leishmania infantum* foram selecionados pelo uso de mistura de soros de indivíduos e animais naturalmente infectados. Alguns destes antígenos foram testados em combinação com adjuvantes em camundongos e em cães, porém a resposta imune induzida foi Th2 ou mista Th1/Th2 não protetora frente a infecção experimental. O resultado encontrado justifica-se pela presença de sequências de aminoácidos repetitivas nos antígenos, as quais propiciariam um reconhecimento por linfócitos B, direcionando para uma resposta Th2. Novas construções de DNA foram obtidas codificando exclusivamente sequência de aminoácidos não repetitiva ou sequências repetitivas e não repetitivas. O objetivo do trabalho foi produzir oito proteínas recombinantes com e sem domínios repetitivos e avaliar a capacidade dessas proteínas em induzir resposta imune celular em cães resistentes. Foi realizado: a) subclonagem de quatro construções de DNA em um plasmídeo apropriado para expressão em *E. coli*, b) determinação de condições apropriadas para produção de proteínas recombinantes em bactérias c) purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade. d) A capacidade das proteínas purificadas de induzir resposta imune Th1 foi avaliada pela estimulação de células mononucleares sangue periférico de cães resistentes marcadas por CFSE, analisada por citometria de fluxo. Foi possível expressar e produzir e purificar seis proteínas recombinantes. Dentre os antígenos avaliados o que promoveu maior resposta linfoproliferativa foi o antígeno rLci2-NT-CT, seguido de rLci2-NT-2R-CT e rLci3-NT-2R-CT os demais antígenos não promoveram a linfoproliferação de PBMC de cães resistentes. Novas avaliações são necessárias para investigar o potencial de rLci2-NT-CT, rLci2-NT-2R-CT e rLci3-NT-2R-CT como componente de uma vacina contra leishmaniose visceral canina.

Palavras-chave: Vacinas, Leishmaniose visceral, antígenos recombinantes

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um conjunto de doenças infecciosas e parasitárias que tem como agentes etiológicos protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*. A leishmaniose visceral é a forma mais grave da doença, podendo levar a óbito quando não tratada (BRASIL, 2014).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) a leishmaniose visceral é uma doença endêmica em várias regiões tropicais e subtropicais do planeta, apresentando uma incidência de 500 mil novos casos por ano, estima-se uma taxa de mortalidade de 50.000 anualmente ao redor do mundo. A grande maioria dos casos (90%) ocorre na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão, Sudão do Sul e Brasil (WHO, 2010).

Considerando que as estratégias de controle da leishmaniose visceral canina são onerosas e laboriosas, havendo uma dificuldade na continuidade das mesmas, a ferramenta mais efetiva para o controle da leishmaniose visceral seria pelo método da vacinação (GRADONI, 2015; ROCK et al., 2015).

O que torna factível o desenvolvimento de uma vacina contra leishmaniose visceral canina é que alguns cães conseguem desenvolver uma resposta imune protetora e controlar a infecção por *L. infantum*. A resposta imune protetora em cães é uma resposta imune predominantemente celular, sendo caracterizada por uma linfoproliferação com elevada produção de interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e IL-2 por células mononucleares de sangue periférico, e baixos níveis de IL-10, IL-4 e TGF- β (PINELLI et al., 1994; CARRILLO; MORENO, 2009; TURCHETTI et al., 2015).

Atualmente apenas duas vacinas estão disponíveis no mercado, sendo elas a LeishTec (Hertape, Brasil) comercializada no Brasil (FERNANDES et al., 2008), e CaniLeish (Virbac, Franca) comercializada na Europa.

Os resultados de avaliações com as vacinas comercialmente disponíveis, até o momento, apontam para uma proteção apenas parcial, portanto o desenvolvimento de uma vacina para leishmaniose visceral é ainda um desafio.

Visando o desenvolvimento de uma vacina contra leishmaniose visceral canina foram construídas bibliotecas genômica e de cDNA em fago lambda cujos clones foram selecionados quanto a reatividade a uma mistura de soro de cães e indivíduos naturalmente infectados (TEIXEIRA et al., 2007; MAGALHÃES, 2007). A

partir de clones de fagos lambda, foi realizado o processo de excisão e geração de clones de plasmídeo contendo inserto de DNA de *L. infantum*, depois disso, os insertos foram sequenciados parcial ou totalmente. As sequências de nucleotídeos ou sequências deduzidas de polipeptídios obtidas foram usadas para comparação com sequências depositadas em bancos de dados (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> e Wellcome Trust Sanger Institute, <http://www.genedb.org/Homepage>) permitindo a caracterização dos genes (OLIVEIRA et al., 2011).

Alguns destes antígenos foram avaliados em diferentes protocolos de imunização e induziram resposta imune Th2 ou Th1/Th2 em camundongos BALB/c, não protetoras frente ao desafio experimental com *L. infantum* (PINHEIRO, 2011). Quando um desses antígenos (denominado rLci2B) foi utilizado em associação com Montanide ISA 720 e/ou oligonucleotídeos ricos em CpG (WERNETTE et al, 2002) na imunização de cães observou-se indução de resposta imune humoral e celular fraca, não protetora contra um desafio experimental (dados não publicados).

Com a caracterização dos antígenos recombinantes selecionados observou-se que vários deles apresentavam sequências de aminoácidos com padrão repetitivo (domínios repetitivos) e segmento(s) não repetitivo(s) (domínios não repetitivos). Como proteínas com domínios repetitivos tendem a promover a apresentação de antígenos por linfócitos B e a indução de resposta imune humoral ou Th2 (GOTO et al, 2006, DEY et al., 2008, LINDELL et. al., 2008), uma explicação para a falha dos antígenos recombinantes selecionados em induzir resposta imune predominantemente Th1, em camundongos ou em cães, provavelmente protetora contra a infecção, seria a existência dos domínios repetitivos nos antígenos testados.

Assim, novas construções de DNA foram concebidas para serem inseridas em um plasmídeo para expressão em bactéria, de modo que, através de um processo de subclonagem, pudessem ser geradas construções de DNA contendo: a) exclusivamente domínio(s) não repetitivo(s) ou b) domínio(s) não repetitivo(s) e domínios repetitivos (para serem usados como controle).

O presente trabalho tem como objetivos: realizar subclonagens para a obtenção de moléculas compostas apenas por domínios não repetitivos, expressar, produzir e purificar as proteínas a) com domínios não repetitivos e domínios

repetitivos, assim como b) proteínas compostas exclusivamente por domínios não repetitivos (rLci2-NT-5R-CT, rLci2-NT-CT, rLci3-NT-2R-CT, rLci3-NT-CT, rLci10-NT-2R, rLci10-NT, rLci12-NT-4R-CT e rLci12-NT-CT) e avaliar a capacidade destas proteínas em estimular resposta linfoproliferativa de células mononucleares de sangue periféricos de cães assintomáticos inoculados pela via dérmica com *L. infantum*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Sequências codificantes de proteínas de *Leishmania infantum*

As construções de DNA codificantes de segmentos dos genes *LinJ14_v3.1180* (*Lci2*), *LinJ34_V3.0700* ou *LinJ34_V3.0710* (*Lci3*), *LinJ34_V3.2360* (*Lci10*) e *LinJ29_V3.0110* (*Lci12*) com domínio(s) não repetitivo(s) e domínios repetitivos foram concebidas (*Lci2-NT-5R-CT*, *Lci3-NT-2R-CT*, *Lci10-NT-2R* e *Lci12-NT-4R-CT*) por um dos nossos colaboradores (Dr. Rafael Dhalia, Departamento de Virologia e Terapia Experimental, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife) de modo que, através de subclonagem, novas construções codificando domínio(s) não repetitivo(s) ou domínio(s) repetitivos pudessem ser obtidas. As construções de DNA concebidas foram sintetizadas quimicamente e inseridas em um plasmídeo (*pMA* ou *pMK*) (Geneart GmbH, Regensburg, Alemanha), gerando as construções plasmideais: *pMK-Lci2-NT-5R-CT*, *pMK-Lci3-NT-2R-CT*, *pMA-Lci10-NT-2R* e *pMK-Lci12-NT-4R-CT*.

Para as subclonagens, as construções *pMK-Lci2-NT-5R-CT*, *pMK-Lci3-NT-2R-CT* e *pMK-Lci12-NT-4R-CT* foram digeridas pelas endonucleases *NheI* e *KpnI* e a construção *pMA-Lci10-NT-2R* foi digerida pelas endonucleases *XhoI* e *EcoRI*. Os insertos foram transferidos para o plasmídeo *pRSETA* (Invitrogen, Carlsbad, USA) digerido por estas mesmas enzimas. Esses experimentos foram realizados pelos Drs. Fabíola Holetz e Osvaldo Pompílio de Melo Neto, do Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife. Dessa maneira, foram obtidas as construções *pRSETA-Lci2-NT-5R-CT*, *pRSETA-Lci3-NT-2R-CT*, *pRSETA-Lci10-NT-2R* e *pRSETA-Lci12-NT-4R-CT*.

Para obter as construções codificantes dos polipeptídeos rLci2-NT-5R-CT, rLci3-NT-2R-CT e rLci12-NT-4R-CT, compostos exclusivamente por domínios não

repetitivos, as construções plasmideais *pRSETA-Lci2-NT-5R-CT*, *pRSETA-Lci3-NT-2R-CT* e *pRSETA-Lci12-NT-4R-CT* foram digeridas pelas endonucleases XhoI e Sall e os segmentos amino-terminal e carboxi-terminal do inserto foram ligados ao plasmídeo *pRSETA* também digeridos por XhoI e Sall, dando origem as construções *pRSETA-Lci2-NT-CT* (Fabíola Holetz, dados não publicados), *pRSETA-Lci3-NT-CT* e *pRSETA-Lci12-NT-CT*. Para obter a construção codificante do polipeptídeo rLci10-NT, compostos por um domínio não repetitivo, a construção plasmideal *pRSETA-Lci10-NT* foi digerida pelas enzimas MfeI e EcoRI e o DNA do plasmídeo contendo o segmento que codifica a região carboxi-terminal do inserto foi recircularizado, gerando a construção *pRSETA-Lci10-NT*.

Otimização da expressão de proteínas recombinantes de *L. infantum*

A otimização da expressão de proteínas recombinantes consistiu em avaliar de forma qualitativa a intensidade de bandas correspondentes aos polipeptídeos em gel de poli-acrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) corado por azul de Coomassie, após o cultivo em meio líquido de diferentes cepas de *E. coli* [BL21(DE3) pLysS (Invitrogen, Carlsbad, USA), BL21(DE3) Codon plus RP (Stratagene, California, USA) e BL21(DE3) Codon plus RIL (Stratagene, California, USA)] transformadas com as construções plasmideais de interesse. Foi feita uma classificação arbitrária (discreta, moderada e intensa) quanto à forma de apresentação da banda no gel, permitindo, portanto, a comparação entre as cepas utilizadas.

Produção e Purificação

A produção das proteínas recombinantes: a) rLci2-NT-5R-CT e rLci2-NT-CT, b) rLci3-NT-2R-CT, rLci3-NT-CT e rLci10-NT-2R e c) rLci10-NT, foi realizada usando-se as cepas BL21(DE3) Codon plus RP, BL21(DE3) Codon plus RIL e BL21(DE3) pLysS, respectivamente.

O cultivo bacteriano foi feito a 37°C em meio Lúria-Bertani líquido suplementado com glicose 1mg/mL (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA). A indução foi feita com Isopropil- β -D-thiogalactosídeo (IPTG, Invitrogen, Carlsbad, EUA ou Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) a uma concentração final de 0,1 mM, segundo recomendações do fabricante.

Três horas após indução com 0,1 mM de Isopropil- β -D-thiogalactosídeo (IPTG, Invitrogen, Carlsbad EUA ou Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) cada suspensão bacteriana foi centrifugada a 6.000 x g, 4°C por 15 minutos. As células foram ressuspensas em tampão fosfato e solução salina (PBS) e lisadas por sonicação. A purificação das proteínas recombinantes foi realizada como descrito por de Melo e colaboradores (1995) utilizando colunas Sepharose-níquel His-Trap Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences).

Proteínas purificadas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), seguido por coloração das proteínas com azul de *Comassie*. Para estimar as concentrações de proteínas recombinantes, as densidades de suas bandas em gel de SDS-PAGE foram comparadas com as de concentrações conhecidas de albumina de soro bovino.

As proteínas purificadas foram avaliadas por *western blot* para detectar as proteínas rLci2-NT-5R-CT, rLci2-NT-CT, rLci3-NT-2R-CT, rLci3-NT-CT, rLci10-NT-2R, rLci10-NT, rLci12-NT-4R-CT, rLci12-NT-CT usando uma mistura de soro de cães com anticorpos anti-*Leishmania* e anticorpo de camundongo anti-histidina após transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose utilizando-se o método semi-seco em um aparelho *transblotter* da BIO-RAD (BIO-RAD, Hercules, EUA), seguindo-se as recomendações do fabricante.

Cães resistentes

A manipulação dos cães foi feita de acordo com as diretrizes nacionais e internacionais aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM – FIOCRUZ), CEUA sob protocolo de nº. 021/2011.

Um grupo de seis cães adultos, mestiços, de ambos os sexos, foi inoculado por via dérmica com 1×10^8 formas promastigotas de *L. infantum*, em fase estacionária de cultura, por animal. Para isso, *L. infantum* foi obtida de macerado de baço de um cão doente que exibia parasitismo esplênico, detectado por microscopia em aspirado do baço. A *Leishmania* do isolado foi classificada como *L. infantum* cepa CAM/BR2013/CAO01 pelo serviço de caracterização taxonômica na Coleção de

Leishmania do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC), Rio de Janeiro. Seis cães adultos, mestiços, de ambos os sexos, sadios, intactos foram usados como controle.

Os cães inoculados intradermicamente com *L. infantum* foram acompanhados periodicamente através de exames clínicos, clínico-patológicos, determinação do parasitismo no baço (por cultura e PCR em tempo real), resposta imune humoral (ELISA) e celular (linfoproliferação e produção de citocinas) contra antígenos solúveis de *Leishmania infantum* (SLA).

Maiores detalhes da metodologia aplicada para a caracterização da resposta imune dos animais inoculados por via dérmica com *L. infantum* podem ser encontrados em (BAGUES, 2016).

Marcação de PBMC com carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) e avaliação de linfoproliferação

Para marcação com CFSE (Invitrogen, CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit) as células mononucleares purificadas de sangue heparinizado por gradiente de Ficoll foram ressuspensas em 2 mL de PBS contendo 0,1% de BSA (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), seguindo-se com a adição de 5 µM de CFSE, o protocolo de marcação com CFSE foi feito conforme recomendações do fabricante.

1×10^5 células marcadas com CFSE/poço ressuspensas em meio RPMI 1640 completo foram adicionadas em duplicata em placas de microtitulação de 96 poços (Corning Incorporated Life Sciences). Aos poços foram também adicionados a uma concentração final de 1 µg/mL e 10 µg/mL cada um dos antígenos recombinantes (rLci2-T-5R-CT, rLci2-NT-CT, rLci3-NT-2R-CT, rLci3-NT-CT, rLci10-NT-2R e rLci10-NT), assim como de antígeno solúvel de *leishmania* (SLA), além de 6 µg/mL de fitohemaglutinina (PHA). A placa foi incubada a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 5 dias. Após este período foi feita a coleta da suspensão celular em tubos de poliestireno, juntando-se as réplicas, protegendo-se da luz, adicionando-se 2 mL de PBS 1X, seguindo-se com centrifugação à 350 x g durante 10 minutos a 20°C. As células foram fixadas com PBS-Formaldeído a 1%. Prosseguiu-se com as aquisições de 10.000 eventos/tubo no citômetro de fluxo (BD FACSAria™, San Jose CA) e posterior análise no software FlowJo versão 7.6.

Utilizou-se a percentagem de células divididas como medida de proliferação. Os valores referentes a esta variável foram normalizados, que corresponde à razão

entre a percentagem de divisão das células cultivadas com os estímulos pela percentagem de divisão das células cultivadas apenas com meio RPMI 1640 completo. Os valores da razão foram analisados no *software* graphpad Prism versão 5.0, considerando como medida de tendência central a mediana.

Os animais inoculados com *L. infantum* eram considerados como respondedores a SLA quando o valor de mediana era superior a três vezes o desvio padrão da mediana do grupo controle. Apenas os animais que a partir deste critério, respondiam à SLA é que foram utilizados nas análises de resposta aos antígenos recombinantes.

Análise estatística

Após a avaliação da distribuição da amostra pelo teste de D'agostino, constatou-se que os dados não apresentavam uma distribuição normal, portanto, aplicou-se estatística não paramétrica para análise dos dados de proliferação.

Os dados de linfoproliferação frente aos antígenos recombinantes dos animais do grupo controle e teste foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. Adotou-se um intervalo de confiança de 95% e nível de significância de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Obtenção de construções plasmidiais em pRSETA sem domínios repetitivos

A confirmação da remoção dos domínios repetitivos de rLci2-NT-2R-CT, rLci3-NT-2R-CT, rLci10-NT-2R e rLci12-NT-4R-CT foi feita por meio da digestão com enzimas de restrição e posterior análise em gel de agarose 1%. Os clones avaliados em gel de agarose 1% que continham bandas sugestivas de subclonagem foram sequenciados e confirmada a sequência de DNA e a orientação do inserto.

Expressão, produção e purificação de proteínas recombinantes de *L. infantum*

A produção das proteínas recombinantes foi feita com: a) rLci2-NT-5R-CT e rLci2-NT-CT, b) rLci3-NT-2R-CT, rLci3-NT-CT e rLci10-NT-2R e c) rLci10-NT, foi realizada usando-se as cepas BL21(DE3) Codon plus RP, BL21(DE3) Codon plus RIL e BL21(DE3) pLysS, respectivamente, uma vez que o maior nível de expressão foi encontrado nestas cepas.

As proteínas produzidas foram purificadas por cromatografia de afinidade e avaliadas por SDS-PAGE. A Figura 1 mostra as proteínas purificadas em gel de SDS-PAGE corado por azul de Comassie, no qual é possível observar as proteínas de interesse em uma banda predominante e de maior peso molecular, seguida de fragmentos de menor peso molecular. Para avaliar se todas as proteínas do gel de SDS-PAGE apresentavam cauda de histidina, foi feito o *Western blot* que é representado na Figura 2. Conforme a marcação da membrana de nitrocelulose com anticorpo anti-histidina é possível inferir que todas as proteínas do gel de SDS-PAGE contêm cauda de histidina, sendo os fragmentos de menor peso molecular referente à proteína degradada ou parcialmente sintetizada.

Acompanhamento dos animais inoculados por via dérmica com *L. infantum*

Aproximadamente um mês após a inoculação de *L. infantum* por via dérmica, foi observado em todos os animais uma reação local, caracterizada por endurecimento seguida de ulceração rasa em uma área de aproximadamente 1cm de extensão. Ao longo dos dois anos de acompanhamento dos cães inoculados, nenhum animal apresentou sintomatologia compatível com leishmaniose visceral canina.

A mediana dos parâmetros bioquímicos (proteínas totais e frações, dosagem de transferases hepáticas, ureia e creatinina) e hematológicos (hemácias, hemoglobina, linfócitos e plaquetas) estavam dentro dos limites de normalidade (dados não mostrados) em todos os tempos de avaliação (antes da inoculação intradérmica, um e nove meses após inoculação).

A carga parasitária avaliada por PCR em tempo real foi considerada baixa quando comparada à carga parasitária de cães naturalmente infectados de área endêmica. Houve ainda uma redução do número de parasitas por grama de tecido ao comparar as avaliações de 12 e 21 meses. Não foi possível isolar *L. infantum* em cultura de material de aspirado esplênico, confirmando que os animais apresentam baixa carga parasitária (BAGUES, 2016).

Em relação a detecção de anticorpos totais da classe IgG anti-*Leishmania*, representados pela densidade óptica, foi observado um aumento nos níveis destes anticorpos a partir do terceiro mês após a infecção experimental, comparando-se com os níveis encontrados antes da inoculação por via dérmica de *L. infantum*. Os níveis de anticorpos mantiveram-se baixos até o décimo quarto mês de avaliação,

tendo como base os resultados de densidade óptica de amostras de animais naturalmente infectados e sintomáticos (BAGUES, 2016).

A resposta linfoproliferativa frente à SLA foi observada em cinco dos seis animais infectados com *L. infantum*, quando avaliados três meses após a infecção experimental pelo ensaio de timidina (BAGUES, 2016). Entretanto, dezoito meses após a inoculação apenas quatro dos seis animais infectados respondiam ao SLA no ensaio de marcação de PBMC com CFSE, com base na mediana e três desvio padrão dos animais do grupo controle, como é mostrado na Figura 3. Os valores de mediana de cada grupo são: 1,027 (desvio padrão = 0,3349) e 1,039 (desvio padrão = 0,2415) para o grupo controle estimulado com 1 µg/mL e 10µg/mL de SLA respectivamente e para o grupo teste 4,197 (desvio padrão = 7,878) e 3,250 (desvio padrão = 5,797) estimulado com 1 µg/mL e 10µg/mL de SLA respectivamente.

Quanto a produção de citocinas (IFN-γ, TNF-α, IL-2 e IL-10) por PBMC de cães inoculados por via dérmica com *L. infantum* frente à estimulação com SLA, mensurada por duas diferentes técnicas (ELISA e pelo kit Milliplex (Millipore) não mostram diferenças estatisticamente significantes, quando comparado às células estimuladas apenas com meio de cultura, após análise dos dados pelo teste não paramétrico de Friedman e pós-teste de Dunn.

Resposta linfoproliferativa frente aos antígenos recombinantes

Para avaliar a capacidade das proteínas recombinantes em estimular a proliferação de células mononucleares de sangue periférico de cães inoculados por via dérmica com *L. infantum*, utilizou-se nesta avaliação apenas os cães que respondiam ao SLA *in vitro*, conforme descrito no tópico anterior.

Os dados de proliferação foram normalizados, que corresponde à razão entre a percentagem de divisão das células estimuladas com as proteínas recombinantes pela percentagem de divisão das células estimuladas apenas com meio. Ao dado normalizado foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Foram encontradas diferenças estatisticamente significantes comparando-se o grupo teste e controle em relação aos antígenos rLci2-NT-CT na concentração de 10ug/mL ($p= 0,0095$) com medianas de 1,104 e 4,992 referentes aos grupos controle e teste respectivamente, rLci2-NT-5R-CT na concentração de 1ug/mL ($p=0,0190$) com medianas de 0,925 e 3,691 e rLci3-NT-2R-CT na concentração de 10ug/mL ($p=$

0,0381) com medianas de 0,934 e 2,802. Para as demais proteínas em suas diferentes concentrações não foram encontradas diferenças estatísticas, como é possível observar na Figura 4.

DISCUSSÃO

Visando contribuir para o desenvolvimento de uma vacina contra leishmaniose visceral canina, previamente em nosso laboratório foi feita a triagem de antígenos candidatos a partir da construção de bibliotecas genômica e de cDNA de *L. infantum* em fago lambda. Os clones de fago lambda foram selecionados a partir da reatividade ao soro de cães e humanos com leishmaniose visceral (TEIXEIRA et al., 2007, MAGALHÃES, 2007, OLIVEIRA et al., 2011).

Alguns dos antígenos triados foram avaliados em diferentes protocolos de imunização em camundongo e em cães e induziu uma resposta imune predominantemente Th2 ou Th1/Th2 não protetoras frente ao desafio experimental com *L. infantum* (DOS SANTOS, 2007; FRAGA, 2007; PINHEIRO, 2011).

Após a caracterização dos antígenos recombinantes selecionados, foi possível observar que os mesmos apresentavam segmentos de aminoácidos não repetitivos e segmentos repetitivos (domínios repetitivos). Domínios repetitivos são importantes epítomos para células B, pois, apresentam a capacidade de ativar linfócitos B independentemente de células T (CASELNA et al., 2008), o fato das proteínas utilizadas nos protocolos de imunizações anteriores estimularem uma resposta Th2 pode ser justificado pela presença dos domínios repetitivos (GOTO et al, 2006, DEY et al., 2008, LINDELL et. al., 2008).

Com base nestes conhecimentos novas construções de DNA foram concebidas, havendo a possibilidade de que a partir da subclonagem fossem geradas sequências com a) segmentos não repetitivos e segmentos repetitivos, assim como moléculas exclusivamente compostas por b) domínios não repetitivos.

No presente trabalho foram realizadas subclonagens para a remoção de domínios repetitivos de rLci3-NT-2R-CT, rLci10-NT-2R e rLci12-NT-4R-CT, obtendo-se rLci3-NT-CT, rLci10-NT e rLci12-NT-CT em plasmídeo *pRSETA* apropriado para a expressão em *E. coli*, possibilitando a produção e purificação das proteínas para posterior avaliação em ensaios *in vitro* quanto à capacidade de estimular PBMC de cães assintomáticos inoculados por via dérmica com *L. infantum*.

Os plasmídeos codificantes para as proteínas recombinantes foram utilizados para transformar diferentes cepas de *E. coli* (BL21(DE3) pLysS, BL21(DE3) Codon plus RP e BL21(DE3) Codon plus RIL). As bactérias da linhagem BL21(DE3) apresentam um promotor T7 polimerase induzível, a enzima é codificada pelo elemento DE3, o que permite o controle da expressão da proteína de interesse. Outra característica é a deleção de genes codificantes para as proteases lon e ompT, o que impede a degradação da proteína que está sendo sintetizada (STUDIER; MOFFATTF, 1986).

Bactérias da linhagem BL21(DE3) pLysS expressam a enzima T7 lisozima, que é um indutor natural da T7 RNA polimerase, que representa um elemento adicional para o controle da expressão gênica, favorecendo a expressão de proteínas potencialmente tóxicas para a bactéria. Entretanto em testes iniciais foi observado que bactérias da linhagem BL21(DE3) pLysS transformadas com os plasmídeos codificantes para as proteínas recombinantes de *L. infantum* na ausência de glicose não cresciam em meio líquido. Desta forma a adição de glicose controlou a expressão das proteínas de *L. infantum* que provavelmente são tóxicas para *E.coli*. Isso devido ao fato da glicose exercer uma repressão transiente do operon *Lac* (TYLER; LOOMIS; MAGASANIK, 1967). Quando o operon *Lac* está ativado, ocorre a expressão das sequências das proteínas recombinantes de *L. infantum*, que ao serem tóxicas inibem o crescimento bacteriano.

As bactérias do tipo códon plus apresentam tRNA atípicos de bactérias permitindo a expressão de proteínas heterólogas. BL21(DE3) Codon plus RP contém cópias extras dos genes argU e proL e BL21(DE3) Codon plus RIL contém cópias de tRNA dos genes argU, ileY, e leuW. Outra característica que difere as duas cepas é que BL21(DE3) Codon plus RP são mais eficientes em expressar sequências ricas em CG, enquanto que BL21(DE3) Codon plus RIL são mais eficientes em expressar sequências ricas em AT (STRATAGENE, 2005).

A presença das cópias extras de tRNA nas cepas Codon plus podem ter favorecido a expressão das sequências de DNA de *L. infantum* utilizadas no presente trabalho, pois para a maioria das proteínas avaliadas (rLci2-NT-CT, rLci2-NT-5R-CT, rLci3-NT-CT, rLci3-NT-2R-CT e rLci10-NT-2R), um maior nível de expressão foi encontrado nestas cepas. Contudo não foi possível expressar as proteínas rLci12-NT-4R-CT e rLci12-NT-CT. Para que estas proteínas fossem

produzidas, uma importante estratégia seria a otimização de códons para expressão em bactérias, uma vez que as sequências de rLci12-NT-4R-CT e rLci12-NT-CT quando foram concebidas tiveram os códons otimizados para expressão em camundongo e em cães, visando utilizar as sequências na forma de vacinas de DNA.

Todas as proteínas recombinantes (rLci2-NT-5R-CT, rLci2-NT-CT, rLci3-NT-2R-CT, rLci3-NT-CT, rLci10-NT-2R e rLci10-NT) foram produzidas na forma de corpúsculo de inclusão. A formação de corpúsculos de inclusão é favorecida por altas temperaturas de cultivo (DE GROOT; VENTURA, 2006), considerando que as proteínas foram produzidas a 37°C a formação de corpúsculos de inclusão era esperado. Os corpúsculos de inclusão foram solubilizados com ureia 8M e posteriormente purificados por cromatografia de afinidade.

Após a purificação foi possível observar em gel de SDS-PAGE que os eluatos das proteínas purificadas eram compostos por uma banda principal e bandas de menor peso molecular abaixo da banda principal. Foi feito o *western blot* para avaliar se as proteínas do gel de SDS-PAGE apresentavam cauda de histidina. Após a marcação com anticorpo anti-histidina foi possível constatar que as bandas fracionadas no gel continham a cauda de histidina, correspondendo desta forma às proteínas recombinantes purificadas na forma degradada ou parcialmente sintetizadas.

A utilização das proteínas recombinantes na forma degradada não representa uma limitação para a avaliação da capacidade das mesmas em estimular resposta imune celular Th1, considerando-se a forma com que ocorre a apresentação de peptídeos via MHC. Quando uma célula apresentadora de antígeno (APC) processa um antígeno, o mesmo é fragmentado em peptídeos de aproximadamente 8-11 aminoácidos e posteriormente é direcionado para as moléculas de MHC I para então estimular os linfócitos TCD8⁺. Na estimulação de linfócitos TDC4⁺ via MHC II os peptídeos são fragmentados em 10-30 aminoácidos (ABBAS, 2012 p.123).

No que tange a avaliação de moléculas em sistema biológico deve-se prezar para que as mesmas tenham uma composição similar, ou com pouca variação entre os lotes, este critério foi seguido para nossas avaliações, sendo produzido um lote único de proteínas que foram utilizadas para todos os ensaios. Porém pensando em

novas avaliações, como não é garantida a mesma composição, uma possibilidade é utilizar o método de eletroeluição para obter proteínas com banda única.

A eletroeluição consiste resumidamente em um processo de separação de proteínas em SDS-PAGE por peso molecular (BONGERTZ, 1989). As moléculas migram no gel em arcos concêntricos e ao fim da corrida são misturadas em uma câmara de eluição e posteriormente direcionadas para um fracionador. A análise das frações obtidas permite saber em quais frações há a proteína de interesse com banda única. Este método foi testado com as proteínas rLci2-NT-CT e rLci2-NT-5R-CT. Ao fim do processo foi possível obter as proteínas com banda única (dados não mostrados), possibilitando em testes futuros utilizar estas proteínas compostas apenas com a banda principal.

As proteínas recombinantes produzidas e purificadas foram avaliadas quanto à capacidade de estimular a proliferação *in vitro* de linfócitos de cães assintomáticos inoculados intradermicamente com *L. infantum*. A hipótese é que linfócitos de cães resistentes funcionam como uma importante ferramenta para a triagem de antígenos candidatos à vacina contra leishmaniose visceral canina. Isso porque cães resistentes à infecção por *L. infantum* desenvolvem uma resposta imune predominantemente Th1, sendo este tipo de resposta importante para o controle da infecção.

Dados na literatura sugerem que a inoculação intradérmica do parasita favorece a estimulação de uma resposta do tipo Th1 (CHAMIZO et al., 2005; KILLICK-KENDRICK; KILLICK-KENDRICK 1994; SANTOS-GOMES; CAMPINO; ABRANCHES, 2000), provavelmente nesse processo de estabelecimento da resposta imune celular haja o envolvimento de células de Langerhans que ao migrarem da epiderme para a derme conseguem direcionar as promastigotas para os linfonodos drenantes, e este pode ser um passo essencial para a apresentação de antígenos e estimulação de resposta imune celular (Moll, 1993 revisto em KILLICK-KENDRICK; KILLICK-KENDRICK 1994).

Ao se estabelecer uma resposta imune celular predominantemente Th1 há uma maior produção de citocinas como IL-2, IL-12 e IFN- γ e resposta linfoproliferativa *in vitro* frente a SLA (KILLICK-KENDRICK; KILLICK-KENDRICK, 1994; CHAMIZO et al., 2005; CARRILLO; MORENO, 2009). Este perfil de resposta faz com que os animais permaneçam assintomáticos por muito tempo ou mesmo por

tempo indeterminado e apresentem baixa carga parasitária, mantendo um controle sob a infecção, como foi visto nos trabalhos de Killick-Kendrick e colaboradores (1994) e Chamizo e colaboradores (2005).

Os animais inoculados por via dérmica com *L. infantum* em nosso laboratório mantiveram-se assintomáticos durante todo o período de acompanhamento, sendo observado apenas reação no local da inoculação. Estes animais tiveram resposta linfoproliferativa frente à SLA nos dois pontos de avaliação (3 e 18 meses após a inoculação), entretanto a linfoproliferação não foi detectada em todos os cães. A ausência de resposta linfoproliferativa frente à SLA em cães assintomáticos foi também observada por Killick-Kendrick e colaboradores (1994) ao inocular *L. infantum* por via dérmica. Provavelmente a infecção pode ter sido controlada pela resposta imune inata, uma vez que estes animais apresentavam baixa carga parasitária e baixos níveis de IgG anti-*Leishmania*. Contudo a resposta imune inata contra *L. infantum* deve ser mais explorada, para que fique melhor esclarecida a função dos receptores Toll e NOD like (Nramp1, NOD1, NOD2, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, e TLR9) no controle da infecção por *Leishmania* (TURCHETTI et al., 2015).

Desta forma, animais infectados experimentalmente por *L. infantum* que permanecem assintomáticos e que desenvolvem uma resposta linfoproliferativa contra SLA, são úteis para triar antígenos candidatos a uma vacina contra leishmaniose visceral canina. Pois alguns dos antígenos que são importantes para o estabelecimento de uma resposta imune protetora podem ser os antígenos recombinantes selecionados previamente em nosso laboratório.

Portanto, utilizou-se PBMC de cães que respondiam ao estímulo com SLA *in vitro* para avaliar a resposta linfoproliferativa frente aos antígenos recombinantes (rLci2-NT-5R-CT, rLci2-NT-CT, rLci3-NT-2R-CT, rLci3-NT-CT, rLci10-NT-2R e rLci10-NT). Foi observada resposta linfoproliferativa frente ao estímulo com os antígenos rLci2-NT-CT, rLci2-NT-5R-CT e rLci3-NT-2R-CT.

Considerando que moléculas com unidades repetitivas de aminoácidos são preferencialmente epítopos para células B (GOTO et al, 2006, DEY et al., 2008, LINDELL et. al., 2008), a capacidade de rLci2-NT-5R-CT e rLci3-NT-2R-CT em estimular uma resposta imune celular não era esperado. Entretanto, moléculas com domínios repetitivos são expressas na fase promastigota e amastigota e parecem

estar envolvidas com a capacidade do parasita sobreviver em mamíferos (GOTO et al., 2010), e por isso provavelmente tem um elevado nível de expressão, havendo uma maior probabilidade de que o sistema imune reconheça esse tipo de molécula para geração de resposta imune. Desta forma, mais importante que a estrutura da molécula seria o quanto ela é apresentada ao sistema imune. O que pode justificar a imunogenicidade também encontrada para o antígeno A2, que é composto por dez unidades repetitivas de aminoácidos (FERNANDES et al., 2012).

Apesar de ter havido proliferação frente aos antígenos rLci2-NT-5R-CT e rLci3-NT-2R-CT, a resposta linfoproliferativa mais expressiva foi para rLci2-NT-CT. Dey e colaboradores (2008) também encontraram maior resposta linfoproliferativa em células de camundongos BALB/c imunizados e posteriormente estimulados *in vitro* com o domínio motor da cinesina composto de domínios não repetitivos, quando comparada a resposta linfoproliferativa de camundongos BALB/c imunizados e estimulados com o domínio imunodominante composto por domínios repetitivos.

Mais ensaios são necessários para avaliar o real potencial destes antígenos para formulação de vacina contra leishmaniose visceral canina. Novas avaliações poderão ser feitas com as seguintes estratégias: 1) encapsular os antígenos recombinantes em lipossoma, melhorando desta forma o sistema de entrega, como visto com as proteínas recombinantes gp63 e LmSTI1 (JAAFARI et al., 2006; BADIEE et al., 2008); 2) realizar uma nova inoculação de *L. infantum* no grupo resistente para verificar se a resposta imune montada aos antígenos recombinantes e até mesmo ao SLA serão mais intensas; 3) realizar ensaios *in vitro* adicionando citocinas recombinantes caninas como IL-12 e IL-2 caninas, além da tentativa do bloqueio da ação de IL-10 pelo receptor solúvel de cão (concebido em nosso laboratório), esta combinação deve proporcionar uma maior estimulação de PBMC *in vitro* quando combinado aos antígenos candidatos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K; LICHTMAN, A.H;PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 7ed. Elsevier, 2012. 123p.

BADIEE, A. et al. Coencapsulation of CpG oligodeoxynucleotides with recombinant *Leishmania major* stress-inducible protein 1 in liposome enhances immune response and protection against leishmaniasis in immunized BALB/c mice. **Clin Vaccine Immunol**, v. 15, n. 4, p. 668-74, Apr 2008.

BAGUES, N. T. C. **Contribuição para o desenvolvimento de uma vacina contra leishmaniose visceral canina**. 2016 (Doutorado em Biotecnologia) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2016

BONGERTZ, V. Eletroeluição de proteínas de gel de poliacrilamida: descrição da metodologia simples e econômica. **Rev Inst. Med. trop**, v. 31, n. 1, p. 44-47, 1989.

BRASIL. **Guia de vigilância em Saúde**. 2014

CARRILLO, E.; MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 128, n. 1-3, p. 67-70, Mar 15 2009.

CASELNA, T. T. T. et al. Linfócito B: da imunologia aos imunobiológicos. **Sinopse de Reumatologia**, v. 2, n. 35-57, 2008.

CHAMIZO, C.; MORENO, J.; ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 103, n. 1-2, p. 67-75, Jan 10 2005.

DE GROOT, N. S.; VENTURA, S. Effect of temperature on protein quality in bacterial inclusion bodies. **FEBS Lett**, v. 580, n. 27, p. 6471-6, Nov 27 2006.

DE MELO NETO, O. P.; STANDART, C.M.D. Autoregulation of poly(A)-binding protein synthesis in vitro. **Nucleic Acids Res**, v. 23, p. 2198-205, 1995.

DEY, A. et al. Kinesin motor domain of *Leishmania donovani* as a future vaccine candidate. **Clin Vaccine Immunol**, v. 15, n. 5, p. 836-42, May 2008.

DOS SANTOS, L. R. **Avaliação de protocolos para indução de resposta imune contra antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi***. 2007. (Doutorado). Imunologia, Universidade Federal da Bahia

FERNANDES, A. P. et al. Making an anti-amastigote vaccine for visceral leishmaniasis: rational, update and perspectives. **Curr Opin Microbiol**, v. 15, n. 4, p. 476-85, Aug 2012.

FERNANDES, A. P. et al. Protective immunity against challenge with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, v. 26, n. 46, p. 5888-95, Oct 29 2008.

FRAGA, R. E. **Avaliação da resposta imune murina após imunização com antígeno recombinante de *Leishmania chagasi*/ *Leishmania infantum* em associação com diferentes adjuvantes**. 2007. (Mestrado). Imunologia, Universidade Federal da Bahia

GOTO, Y. et al. Upregulated expression of B-cell antigen family tandem repeat proteins by *Leishmania* amastigotes. **Infect Immun**, v. 78, n. 5, p. 2138-45, May 2010.

GOTO, Y. et al. Cloning, characterization, and serodiagnostic evaluation of *Leishmania infantum* tandem repeat proteins. **Infect Immun**, v. 74, n. 7, p. 3939-45, Jul 2006.

GRADONI, L. Canine *Leishmania* vaccines: still a long way to go. **Vet Parasitol**, v. 208, n. 1-2, p. 94-100, Feb 28 2015.

JAAFARI, M. R. et al. Immune response and protection assay of recombinant major surface glycoprotein of *Leishmania* (rgp63) reconstituted with liposomes in BALB/c mice. **Vaccine**, v. 24, n. 29-30, p. 5708-17, Jul 17 2006.

KILLICK-KENDRICK, R. et al. A laboratory model of canine leishmaniasis: the inoculation of dogs with *Leishmania infantum* promastigotes from midguts of experimentally infected phlebotomine sandflies. **Parasite**, v. 1, n. 4, p. 311-318, 1994.

LINDELL, D. M. et al. B cell antigen presentation promotes Th2 responses and immunopathology during chronic allergic lung disease. **PLoS One**, v. 3, n. 9, p. e3129, 2008.

MAGALHÃES, F. B. **Identificação e avaliação de novos antígenos recombinantes para o diagnóstico das leishmanioses viscerais humana e canina**. 2007. (Doutorado). Imunologia, Universidade Federal da Bahia

OLIVA, G. et al. A randomised, double-blind, controlled efficacy trial of the LiESP/QA-21 vaccine in naive dogs exposed to two *Leishmania infantum* transmission seasons. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 10, p. e3213, Oct 2014.

OLIVEIRA, G. G. et al. Characterization of novel *Leishmania infantum* recombinant proteins encoded by genes from five families with distinct capacities for serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 85, n. 6, p. 1025-34, Dec 2011.

PINELLI, E. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect. Immun**, v. 62, n. 1, p. 229-235, 1994.

PINHEIRO, C. G. M. D. **Avaliação de resposta imune em camundongos utilizando diferentes protocolos de imunização com antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi***. 2011. (Doutorado). Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz

ROCK, K. S. et al. Uniting mathematics and biology for control of visceral leishmaniasis. **Trends Parasitol**, v. 31, n. 6, p. 251-9, Jun 2015.

SANTOS-GOMES, G. M.; CAMPINO, L.; ABRANCHES, P. Canine Experimental Infection: Intradermal Inoculation of *Leishmania infantum* Promastigotes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 2, p. 193-198, 2000.

STRATAGENE. **BL21-CodonPlus® Competent Cells INSTRUCTION MANUAL**. BL21-CodonPlus® Competent Cells. STRATAGENE 2005.

STUDIER, F. W.; MOFFATTF, B. A. Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-level Expression of Cloned Genes. **J. Mol Biol**, v. 189, p. 113-130, 1986.

TEIXEIRA, M. C. et al. A strategy for identifying serodiagnostically relevant antigens of *Leishmania* or other pathogens in genetic libraries. **Biologicals**, v. 35, n. 1, p. 51-4, Mar 2007.

TURCHETTI, A. P. et al. Transcription of innate immunity genes and cytokine secretion by canine macrophages resistant or susceptible to intracellular survival of *Leishmania infantum*. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 163, n. 1-2, p. 67-76, Jan 15 2015.

TYLER, B.; LOOMIS, W. F.; MAGASANIK, B. Transient Repression of the lac Operon. **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**, v. 94, n. 6, p. 2001-2011, 1967.

WERNETTE, C. M. et al. CpG oligodeoxynucleotides stimulate canine and feline immune cell proliferation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 84, n. 3-4, p. 223-236, 1/15/ 2002.

WHO. **Control of the leishmaniases**. p.1-202. 2010

Legenda das Figuras

FIGURA 1. Gel de poliacrilamida de proteínas purificadas Gel de SDS-PAGE 10% corado por azul de *comassie* contendo amostras de proteínas recombinantes obtidas após purificação por coluna de afinidade. É possível observar para todas as proteínas uma banda de maior peso molecular, referente às proteínas de interesse intactas (indicado pelas setas) e bandas de menor peso molecular correspondente a proteínas co-purificadas.

FIGURA 2. Western blot de amostras de cultivo e proteínas purificadas. *Western blot* contendo amostras de cultivo de bactérias transformadas com plasmídeo vazio e plasmídeos codificantes para proteínas recombinantes, além das proteínas na forma purificada. As raias correspondem a: 1) Marcador de peso molecular; 2) BL21(DE3) códon plus RP transformada com plasmídeo *pRSETA* sem inserto; 3) BL21(DE3) códon plus RP transformada com *pRSETA-Lci2-NT-CT*; 4) rLci2-NT-CT purificada; 5) BL21(DE3) códon plus RP transformada com *pRSETA-Lci2-NT-5R-CT*; 6) rLci2-NT-5R-CT purificada; 7) BL21(DE3) códon plus RIL transformada com plasmídeo *pRSETA* sem inserto; 8) BL21(DE3) códon plus RIL transformada com *pRSETA-Lci3-NT-2R-CT*; 9) rLci3-NT-2R-CT purificada; 10) BL21(DE3) códon plus RIL transformada com *pRSETA-Lci3-NT-CT*; 11) rLci3-NT-CT purificada; 12) BL21(DE3) pLysS transformada com *pRSETA* sem inserto; 13) BL21(DE3) pLysS transformada com *pRSETA-Lci10-NT*; 14) rLci10-NT purificada; 15) BL21(DE3) códon plus RIL transformada com *pRSETA-Lci10-NT-2R* e por fim 16) rLci10-2R purificada. As setas indicam as bandas referentes à proteína em sua forma intacta.

FIGURA 3. Ensaio de linfoproliferação de PBMC de cães inoculados por via dérmica com *L. infantum* e cães saudáveis. Ensaio de marcação de PBMC com CFSE. Ensaio de linfoproliferação realizado 18 meses após inoculação de seis animais com *L. infantum*. A linfoproliferação foi avaliada após marcação de PBMC de cão com CFSE e análise por citometria de fluxo. Os dados estão representados pela razão de proliferação, que corresponde ao percentual de células divididas de PBMC cultivado com SLA dividido pelo percentual de células divididas de PBMC

cultivado apenas com meio. Barra: mediana da razão entre estímulo e meio de cultura e símbolos: valores individuais. Os animais do grupo controle são representados pelo (■) e os animais inoculados por via dérmica com *L. infantum*, representados pelo (●). Os valores de mediana de cada grupo são: 1,027(desvio padrão = 0,3349) e 1,039 (desvio padrão = 0,2415) para o grupo controle estimulado com 1 µg/mL e 10µg/mL de SLA respectivamente e para o grupo teste 4,197 (desvio padrão = 7,878) e 3,250 (desvio padrão = 5,797) estimulado com 1 µg/mL e 10µg/mL de SLA respectivamente.

FIGURA 4. Ensaio de linfoproliferação de PBMC de cão frente à estimulação com antígenos recombinantes. Os gráficos apresentam a razão entre o % de divisão de células estimuladas com antígenos recombinantes pelo % de divisão das células estimuladas com meio (Razão de proliferação antígeno recombinante/meio). No eixo X estão as diferentes doses do antígeno (1µg/mL ou 10 µg/mL) com e sem domínios repetitivos. Do lado esquerdo da linha pontilhada central são os animais estimulados com antígenos sem domínios repetitivos e do lado direito os antígenos com domínios repetitivos. Os animais do grupo controle,são representados pelo (■) e os animais resistentes, representados pelo (●). Barra: mediana da razão entre estímulo e meio de cultura e símbolos: valores individuais.* indica a existência de significância estatística, com p-valor ≤0,05.

Figura 1

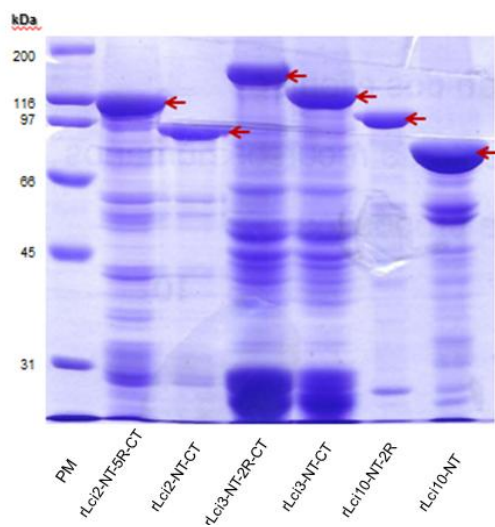


Figura 2

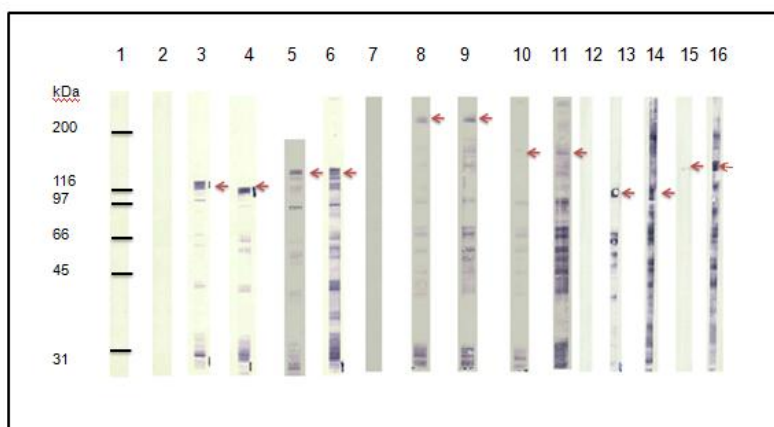


Figura 3

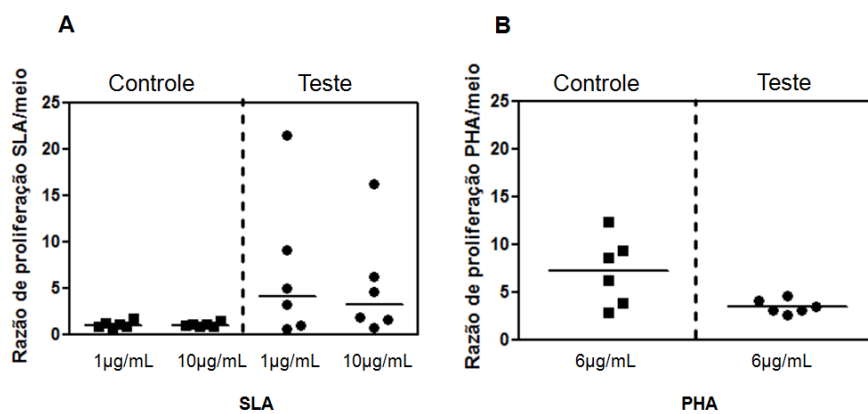
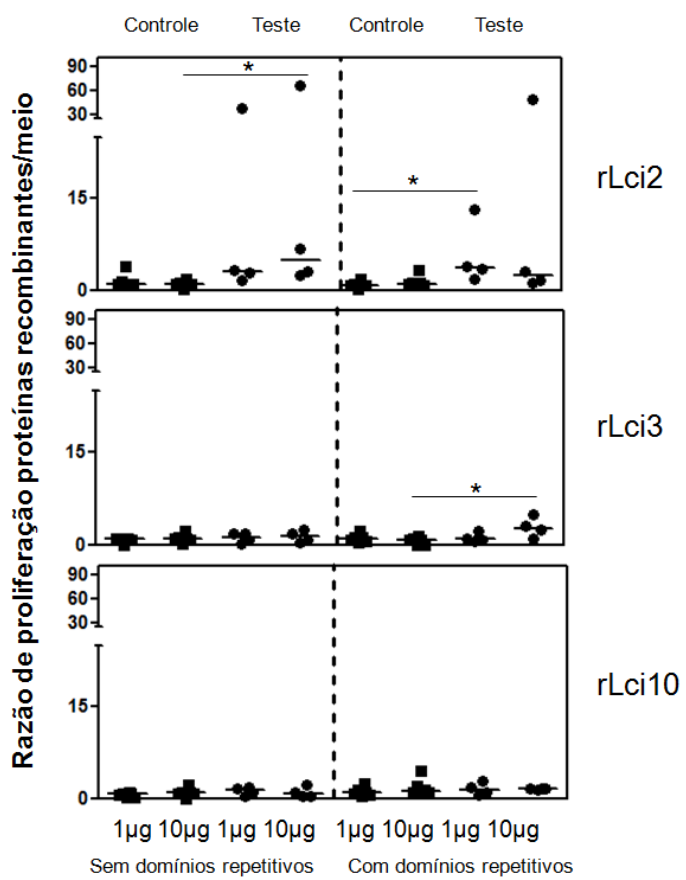
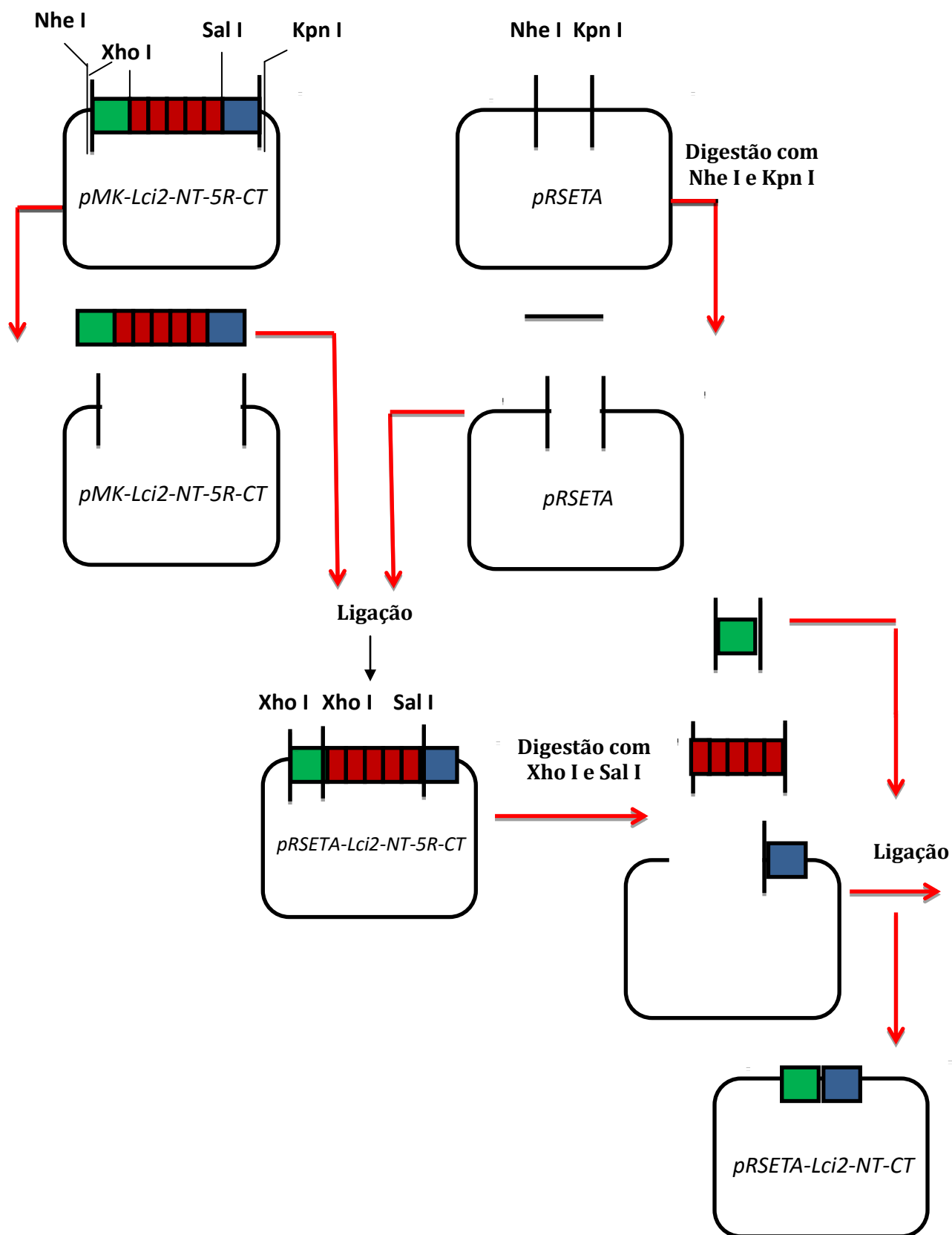


Figura 4

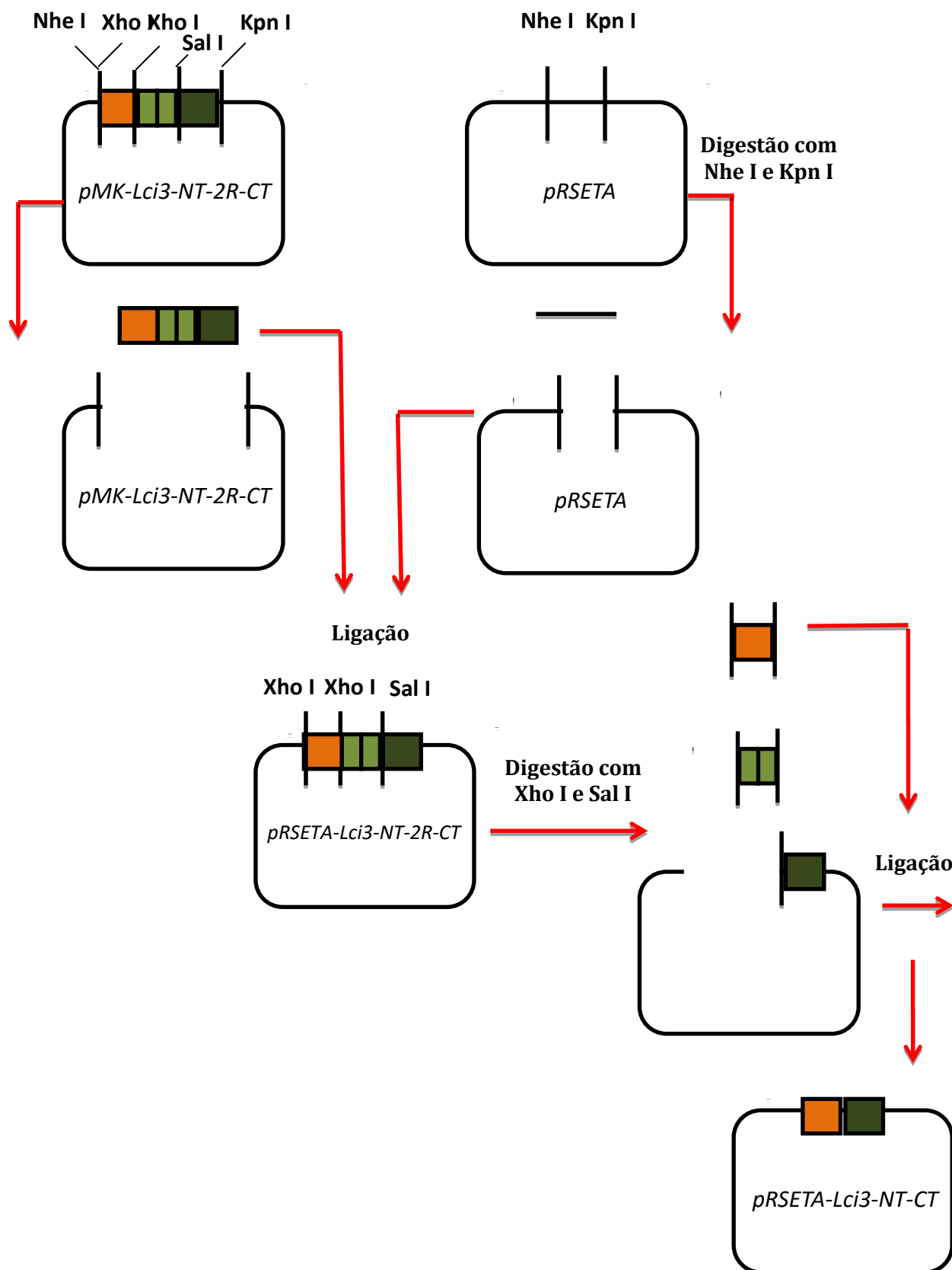


Anexo II

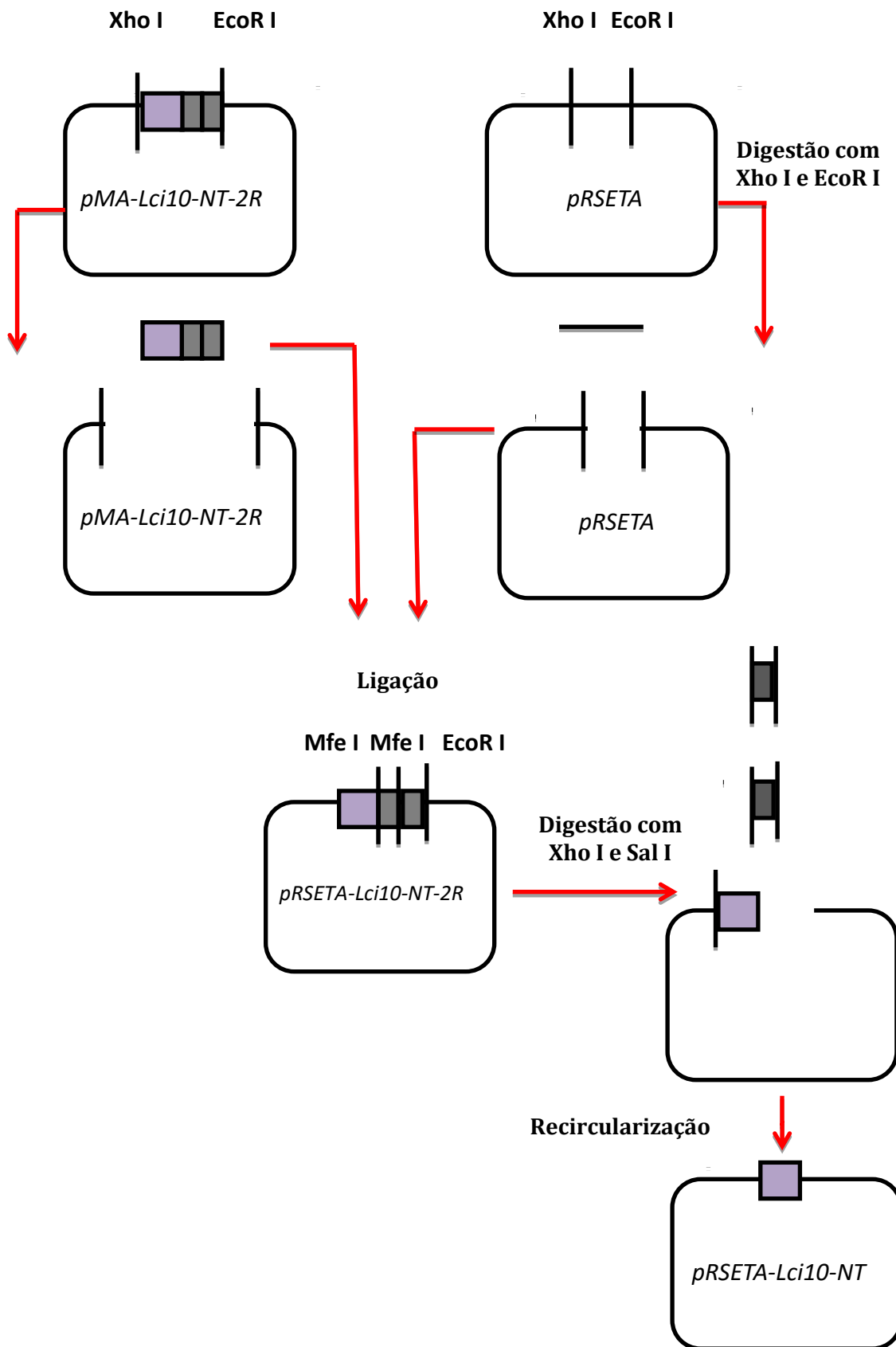
Anexo A - Estratégia de subclonagem de rLci2



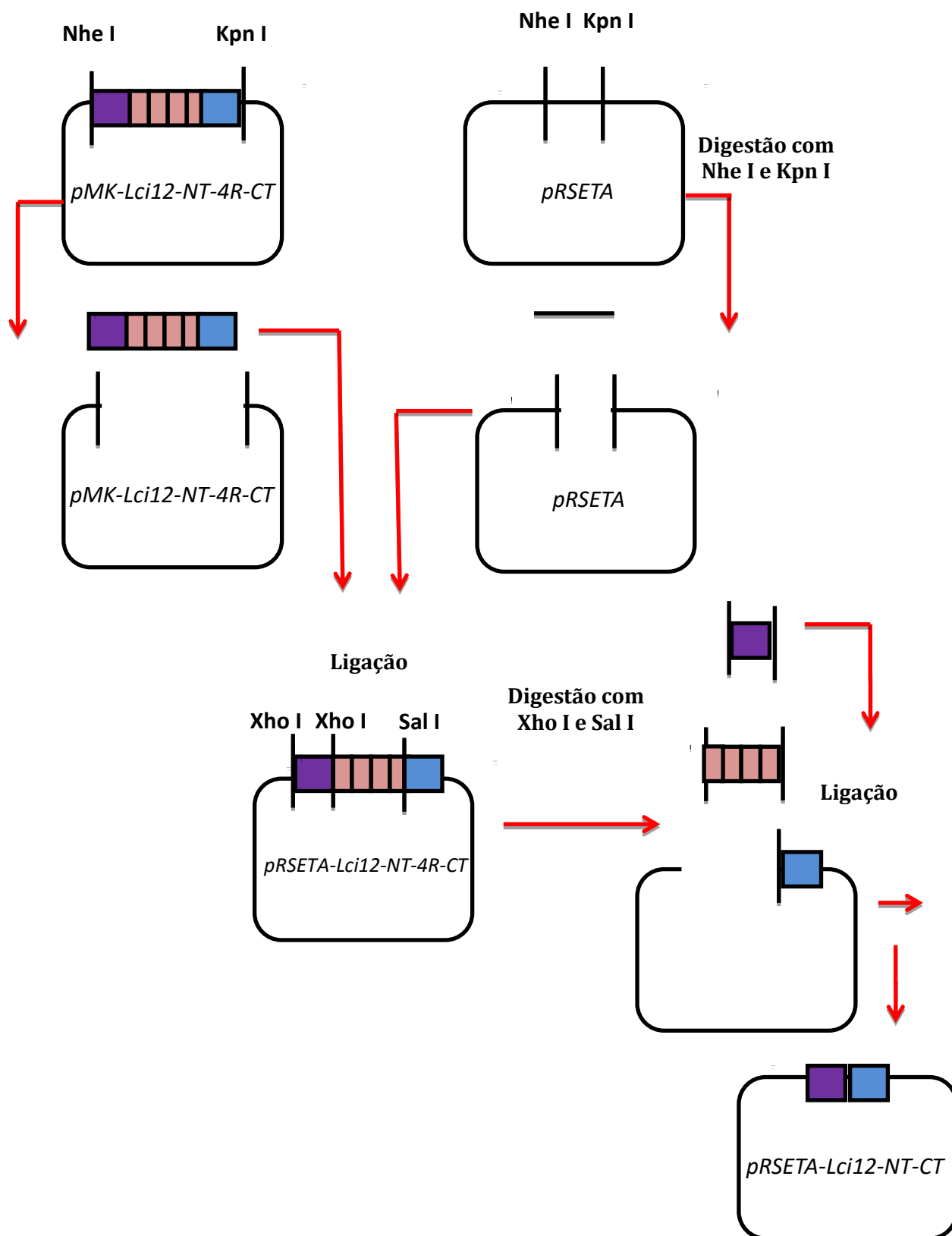
Anexo B - Estratégias de subclonagem de rLci3



Anexo C - Estratégias de subclonagem de rLci10



Anexo D - Estratégias de subclonagem de rLci12



ANEXO III

Anexo A – Sequência de nucleotídeos de *pRSETA-Lci2-NT-5R-CT*

GATCTCGATCCCGCGAAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTTCCCTCTAGAAAATAATTTTGT
 TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATG**GCTAGC**GATATCACC
 ATGGAA**CTCGAG**ATGCACCCTAGCACCGTGCGGAGGGAAGCTGAAAGAGTCAAGGTTAGCGTGCGAGTGAGGCC
 CTCAACGAACGAGAAAAACAACGCCCCAGAGGGGACTAAGGTCACCGTGGCTGCCAAGCAAGCAGCTGCCGTGGTC
 ACGGTGAAAGTGTGGGGCGCAGTAACAATAGCGGCGCAGCCGAAAGCATGGGGACCGCACGGAGGGTTGCTCAG
 GATTTCCAGTTTGACCACGTGTTCTGGAGCGTCGAGACTCCCGACGCTGCGGCGCTACGCCAGCTACTCAGGCT
 GACGTCTTTAGGACCATCGGCTATCCCCTGGTCCAACACGCCTTTGACGGCTTCAATAGTTGTCTTTTCGCCTAT
 GGGCAGACAGGATCAGGCAAAAACCTACACTATGATGGGAGCTGACGTTAGTGCCCTGAGCGGCGAGGGGAACGGC
 GTCACTCCAGAACTGCTCGCTCGAAATCTTCGCCAGGAAGGCCAGCGTGGAGGCTCAAGGGCACAGTCGCTGGATC
 GTTGAGCTTGGCTACGTTGAAGTGTACAACGAGAGAGTCAAGCGACCTGTTGGGAAAGAGGAAGAAAGGAGTCAAG
 GGGGGGGCGAGGAGGTGTACGTGGACGTGAGGGAAACCCCTAGCAGAGGCGTCTTTCTGGAGGGGCAAAGACTC
 GTGGAGGTGGGAAGCCTGGACGACGTTGTCAGGTTGATTGAGATCGGGAACGGCGTCAGGCACACAGCCTCTACA
 AAGATGAATGACCGAAGCTCCCGTAGCCACGCTATCATCATGTTGCTGCTCAGGGAGGAGCGGACAATGACTACT
 AAGTCAGGAGAAACAATCAGGACCGCAGGGAAGTCCAGCAGGATGAATCTGGTGGACCTCGCCGGCAGCGAAAGG
 GTGGCTCAGTCCAGGTGGAGGGGCAACAGTTCAAGGAGGCCACACATATCAACTTGAGCCTGACAACCCCTGGGC
 AGAGTGATCGACGTGTTGGCTGATATGGCCACGAAGGGAGCCAAGGCTCAGTATTCAGTTGCTCCCTTCGGGAT
 AGTAAACTTACGTTCACTTCTGAAAGATTCACTTGGAGGGAATAGCAAGACCTTCATGATTGCCACCGTTAGCCCT
 TCAGCCCTGAACTACGAGGAGACCTTGAGCACACTGAGATACGCCAGCCGTCACGTCGATCGTGAACGTTGCT
 CAGGTCAACGAAGACCCACGAGCTAGGAGGATTCGTGAACTCGAAGAGCAGATGGAAGATATGAGGCAGGCCATG
 GCTGGCGGAGACCCTGCCTACGTGAGCGAACTGAAGAAGAACTGGCACTGCTGGAGTCAGAGGCACAAAAGAGA
 GCAGCAGACCTCCAGGCTTGGAACGGGAGAGGGAGCACAAATCAGGTCAGGAAAGGCTGTTGAGAGCAACAGAA
 GCCGAGAAATCTGAGCTTGAAGTCCAGGGCAGCCGCCCTGCAGGAGGAGATGACCGCCACCCGAAGGCAGGCCGAT
 AAGATCAAGCACTGAACCTCAGGCTGAAGGAGGAGCAGGCAGCGAAAGAGCGTGAACCTGTTGAAAGAGATGGCC
 AAGAAGGACTGCTCCCTGAGCAAGGTGAGGCGCAGAAAGACGCTGAGATCGCAAGCAGAGGGGAGAAGCTGGAG
 TCCACCGTGGCACAGCTCGAACCGGAGCAGAGAGAGAGGGAGGTGGCACTTGACGCCCTTGACAGCCACCAACGC
 AAGTTGCAAGAAGCCTTGGAAAAGTAGCGAGCGGACTGCAGCCGAAAGGGATCAGCTGTTGCAGCAGCTCACTGAA
 CTCCAGAGCGAGCGGACCCAACTGAGCCAGGTGGTTACTGATAGGGAGCGACTGACCAGGGACCTGCAACGGATT
 CAGTACGAGTACGGAGAGACAGAGCTGGCAAGGGACGTGGCCCTGTGTGCCGCCAGGAGATGGAAGCTCGCTAT
 CACGCAGCAGTGTTCACCTGCAAACTGCTGGAGCTGGCCACTGAGTGGGAAGATGCCCTGAGGGAGAGAGCA
 CTGGCCGAGCGTGACGAAGCAGCTGCTGCCGAACTGGATGCTGCTGCCAGCACGTCCAGAACGCTCGGGAGTCA
 GCCTGTGAGAGACTGACAAGT**CTCGAG**CTTGAAGAGAACTGAGGGGAACTGAAGCCAGAGCTGCCGAACTCGCC
 GCCAGGCTGAAGGCCATTGCTGCCATGAAAGCAAGCATGGTGCAGGAAAGGGAGTCCGCACGCGACGCACTGGAA
 GAAAAGCTGAGGGGCAGCGAGGTGAGGGCCGAGAGCTCGCAGCCAGACTCAAAGCCGAGTGGCAGCCAAAAGC
 AGCGCAGAACAGGATAGAGAAAACACGAGAGCCACCCTGGAACAGAGACTGAGGGAGAGTGAAGAAAGGGCCGCA
 GAGCTGGCCAGTCAGCTGGAAGCAGCCGACCCGCAAGAGCAGCGCAGAGCAGGACAGGGAAAACACACGAGCA
 GCCCTGGAGGAAAAGCTGAGGGGATCAGAGGAGAGGGCTGCAGAGCTGGGCACCCGAGTCAAGGCCAGCAGCGCC
 GCAAAGGCCCTTGGCAGCAGGAACGCGATAGGATTAGGGCTGCTTTGGAAGAGAACTGAGGGATAGCGAGGCC
 AGAGCTGCCGAACTGACCACCAAGCTGGAGGCCACTGTGGCCGCCAAATCAAGTGGCAGCAAGAGAGAGAGAAC
 ATCAAAGTGGCA**GTGAGC**CTGGAGGAGGAGCTGGTGGACGCACGAGCCAACTGGCTGGCATGGAAGCCAGCCTG
 AAAGAAAGCAAGCTGGAGTTTGAAGGGAGGGTGGGCCAACTGGAGGGAGAGTGGGAGAACTCAGGAACGACAAA
 GTGCGATACGCCAAGAAGGTTCCAGTCTCTGGAGTATCAGATGCGTATTGACGAGGCCAGGCTCAAAGCAAGGAGG
 GATGCTGTGCACAGGAAAGAAGAAATCTGATA**ACTAGC**ATGGAATTCGAAGCTTGATCCGGCTGCTAACAAGC
 CCGAAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGT
 CTTGAGGGGTTTTTTTGGCTGAAAAGGAGGAACATATCCGGATCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGC
 CCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTG
 GTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTT
 CTCGCCAGTTTCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTCCGATTTAGTGCTTTA
 CGGCACCTCGACCCAAAAAATTTGATTAGGGTATGGTTACAGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTT
 CGCCCTTTGACGTTGGAGTCCAGTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATC
 TCGGTCTATTCTTTGATTTATAAGGATTTTGGCCATTTGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAA
 AAATTTAACGCGAATTTTAAACAAAATATTAACGCTTACAATTTAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAA
 CCCCTATTTGTTTTATTTTTCTAAATACATTTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTC
 AATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCCCTTATTCCCTTTTTTTCGGCATTTT
 GCCTTCCTGTTTTTGTCAACCCAGAAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGG
 GTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGA

GCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCCTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGCA
 TACACTATTCTCAGAAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAA
 GAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAACAACCTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGAC
 CGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGA
 ATGAAGCCATAACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACATTTAA
 CTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAAGTTGCAGGACCAC
 TTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTA
 TCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTA
 TGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACCTGTCAGACCAAGTTT
 ACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATA
 ATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGAT
 CTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCCCGCTACCAGCGGTGGTTT
 GTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTG
 TTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACCTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAA
 TCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACC GG
 ATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAC
 TGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAA
 GCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTG
 GGTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCA
 GCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGCTGGCCTTTTGTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTG
 ATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACCCGAACGACCGAGCGCAGCG
 AGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATTCAATTAAT
 GCAG

Sítio de NheI - GCTAGC

Sítio de KpnI - GGTACC

Sítio de XhoI - CTCGAG

Sítio de SalI - CTCGAC

Extremidade amino terminal

Segmentos repetitivos

Extremidade carboxila terminal

Anexo B - Sequência de aminoácidos de *rLci2-NT-5R-CT*

MRGS **HHHHHH**GMASDITMELEMHPSTVRREAERVKVSVRVRPLNERENNAPEGTKVTVAAKQAAAVVTVKVLGGS
 NNSGAAESMGTARRVAQDFQFDHVFWSVETPDACGATPATQADVFTIGYPLVQHAFDGFNSCLFAYGQTGSGKT
 YTMMGADVSAISGEGNGVTPRICLEIFARKASVEAQGHSRWIVELGYVEVYNERVSDLLGKRKKGVKGGGEEVYV
 DVREHPSRGVFLEGQRLVEVGSLLDDVVRLIEIGNVVRHTASTKMNDRSSRSHAIIMLLLREERTMTTKSGETIRT
 AGKSSRMNLVDLAGSERVAQSQVEGQQFKEATHINLSLTTLGRVIDVLADMATKGAKAQYSVAPFRDSKLTFFILK
 DSLGGNSKTFMIATVSPSALNYEETLSTLRYASRARDIVNVAQVNEEDPRARRIRELEEQMEDMRQAMAGGDPAYV
 SELKKKLALLESEAQKRAADLQALEREREHNQVQERLLRATEAEKSELESRAAALQEEMTATRRQADKMQALNLR
 LKEEQARKERELLKEMAKKDAALSKVRRRKDAEIASEREKLESTVAQLEREQREREVALDALQTHQRKLQEALLES
 SERTAAERDQLLQQLTELQSERQLSQVVTDRERLTRDLQRIQYEGETELARDVALCAAQEMEARYHAAVFHLQ
 TLLELATEWEDALRERALAERDEAAAAELDAAASTSQNARESACERLTSLELEEKLRGTEARAAELAARLKAIAA
 MKASMVQERESARDALEEKLRGSEVRAAE LAARLKA AVAAKSSAEQDRENT RATLEQRLRESEERAAELASQLEA
 AAAAKSSAEQDRENT RAAL EEKLRGSEERAAELGTRVKASSAAKALAEQERDRIRAAL EEKLRDSEARAAELTTK
 LEATVAAKSSAEQERENIKVAVDLEEEELVDARAKLAGMEASLKESKLEFEGRVGELEGECEKLRNDKVRYAKKVQ
 SLEYQMRIDEARLKARRDAVHRKEEF **---**

M - Códon de iniciação

HHHHHH - Cauda de histidina

--- - Códon de parada

Anexo C - Sequência de nucleotídeos de *pRSETA-Lci2-NT-CT*

GATCTCGATCCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGT
 TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGCTAGCGATATCACC
 ATGGAACTCGAGATGCACCCCTAGCACCCTGCGGGAGGGAAGCTGAAAGAGTCAAGGTTAGCGTGCAGTGAAGCCC
 CTCAACGAACGAGAAAAACAACGCCCCAGAGGGGACTAAGGTCAACCGTGGCTGCCAAGCAAGCAGCTGCCGTGGT
 ACGGTGAAAGTGTGGGGCGCAGTAAACAATAGCGGGCAGCCGAAAGCATGGGGACCGCACGGAGGGTTGCTCAG
 GATTTCCAGTTTACCACGTGTTCTGGAGCGTCGAGACTCCCGACGCCGCGGGCTACGCCAGCTACTCAGGCT
 GACGTCTTAGGACCATCGGCTATCCCTGGTCCAACACGCCCTTGGACGGCTTCAATAGTTGTCTTTTCGCCTAT
 GGGCAGACAGGATCAGGCAAAACCTACACTATGATGGGAGCTGACGTTAGTGCCCTGAGCGGCAGGGGAACGGC
 GTCACTCCCAGAATCTGCCCTCGAAATCTTCGCCAGGAAGGCCAGCGTGGAGGCTCAAGGGCACAGTCCGCTGGATC
 GTTGAGCTTGGCTACGTTGAAGGTACAAACGAGAGAGTACAGCGACCTGTTGGGAAAGAGGAAGAAAGGAGTCAAG
 GGGGGGGGCGAGGAGGTGTACGTGGACGTGAGGGAAACCCCTAGCAGAGGCGTCTTTCTGGAGGGGCAAAGACTC
 GTGGAGGTGGGAAGCCTGGACGACGTTGTCAGGTTGATTGAGATCGGGAACGGCGTCAGGCACACAGCCTCTACA
 AAGATGAATGACCGAAGCTCCCGTAGCCACGCTATCATCATGTTGCTGCTCAGGGAGGAGCGGACAATGACTACT
 AAGTCAGGAGAAACAATCAGGACCGCAGGGAAGTCCAGCAGGATGAATCTGGTGGACCTCGCCGGCAGCGAAAGG
 GTGGCTCAGTCCAGGTGGAGGGGCAACAGTTCAAGGAGGCCACACATATCAACTTGAGCCTGACAACCCCTGGG
 AGAGTATCGAGCTGTTGGCTGATATGGCCACGAAGGGAGCCAAGGCTCAGTATTCAGTTGCCCTTTCCGGAT
 AGTAAACTACGTTACTTCTGAAAGATTCACCTGGAGGGAAATAGCAAGACCTTCATGATTGCCACCCCTAGCCCT
 TCAGCCCTGAACTACGAGGAGACCTTGAGCACACTGAGATACGCCAGCCGTCACGTCGATCGTGAACGTTGCT
 CAGGTCAACGAAGACCCACGAGCTAGGAGGATTCGTGAACTCGAAGAGCAGATGGAAGATATGAGGCAGGCCATG
 GCTGGCGGAGACCCCTGCCCTACGTGAGCGAACTGAAGAAGAACTGGCACCTGCTGGAGTCAGAGGCACAAAAGAGA
 GCAGCAGACCTCCAGGCCCTTGGAACGGGAGAGGGAGCACAACTCAGGTCCAGGAAAGGCTGTTGAGAGCAACAGAA
 GCCGAGAAATCTGAGCTTGAAGTCCAGGGCAGCCGCCCTGCAGGAGGAGATGACCGCCACCCGAAGGCAGGCCGAT
 AAGATGCAAGCACTGAACCTCAGGCTGAAGGAGGAGCAGGCACGGAAAGAGCGTGAACCTGTTGAAAGAGATGGCC
 AAGAAGGACGCTGCCCTGAGCAAGGTGAGGCGCAGAAAGGACGCTGAGATCGCAAGCGAGAGGGAGAAGCTGGAG
 TCCACCGTGGCACAGCTCGAACCGGAGCAGAGAGAGAGGGAGGTGGCACTTGACGCCCTGCAGACCCACCAACGC
 AAGTTGCAAGAAGCCTTGGAAAGTAGCGAGCGGACTGCAGCCGAAAGGGATCAGCTGTTGCAGCAGCTCACTGAA
 CTCCAGAGCGAGCGGACCCAACTGAGCCAGGTGGTTACTGATAGGGAGCGACTGACCAGGGACCTGCAACGGATT
 CAGTACGAGTACGGAGAGACAGAGCTGGCAAGGGACGTGGCCCTGTGTGCCGCCCAGGAGATGGAAGCTCGCTAT
 CACGCAGCAGTGTTCACCTGCAAACTGCTGGAGCTGGCCACTGAGTGGGAAGATGCCCTGAGGGAGAGAGCA
 CTGGCCGAGCGTGCAGAACGACTGCTGCCGAACTGGATGCTGCTGCCAGCAGCTCCAGAACGCTCGGGAGTCA
 GCCTGTGAGAGACTGACAAGTCTCGAGGCTCGACTGGAGGAGGAGCTGGTGGACGCACGAGCCAAACTGGCTGGC
 ATGGAAAGCCAGCCTGAAAAGAAAGCAAGCTGGAGTTTGAAGGGAGGGTGGGCGAACTGGAGGGAGAGTGGCAGAAA
 CTCAGGAACGACAAAGTGCATACGCCAAGAAGGTCCAGTCTCTGGAGTATCAGATGCCGTTTACGAGGGCCAGG
 CTCAAAGACGAGGGGATGCTGTGCACAGGAAAGAATACTGATAAAGCTACATGGAATTCGAAGCTTATGATCT

AGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAG
AAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGC
TACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGC
AGATACCAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACAT
ACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAA
GACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAA
CGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGG
ACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATC
TTTATAGTCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCC
TATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGCTGGCCTTTTGTCTCACATGTTCTTTC
CTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAA
CGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTT
GGCCGATTCATTAATGCAG

Sítio de NheI - GCTAGC

Sítio de KpnI - GCTACG

Sítio de XhoI - CTCGAG

Sítio de SalI - GTCGAC

Extremidade amino terminal

Extremidade carboxila terminal

Anexo D - Sequência de aminoácidos de rLci2-NT-CT

MRGS **HHHHHH**GMASDITMELEMHPSTVRRERAEKVKSVRVRPLNERENNAPEGTKVTVAAKQAAAVVTVKVLGGS
 NNSGAAESMGTARRVAQDFQFDHVFWSVETPDACGATPATQADVFRITIGYPLVQHAFDGFNSCLFAYGQTGSGKT
 YTMGADVSAISGEGNGVTPRICLEIFARKASVEAQGHSRWIVELGYVEVYNERVSDLLGKRKKGVKGGGEEVYV
 DVREHPSRGVFLEGQRLVEVGSLLDDVVRLEIEIGNVVRHTASTKMNDRSSRSHAIIMLLLREERTMTTKSGETIRT
 AGKSSRMNLVDLAGSERVAQSQVEGQQFKEATHINLSLTTLGRVIDVLADMATKGAKAQYSVAPFRDSKLTFILK
 DSLGGNSKTFMIATVSPSALNYEETLSTLRYASRARDIVNVAQVNEPRARRIRELEEQMEDMRQAMAGGDPAYV
 SELKKKLALLESEAKRAADLQALEREREHNQVQERLLRATEAEKSELESRAAALQEEMTATRRQADKMQALNLR
 LKEEQARKERELLKEMAKKDAALSKVRRRKDAEIASEREKLESTVAQLEREQREREVALDALQTHQRKLQEALLES
 SERTAAERDQLLQQLTELQSERQLSQQVTDRELRDLQRIQYQYGETELARDVALCAAQEMEARYHAAVFHLQ
 TLLELATEWEDALRERALAERDEAAAAELDAAASTSQNARESACERLTSLEVDLEEEELVDARAKLAGMEASLKE
 KLEFEGRVGELEGECEKLRNDKVRVYAKKVQSLEYQMRIDEARLKARRDAVHRKEEF **---**

M - Códon de iniciação

HHHHHH - Cauda de histidina

--- Códon de parada

Anexo E - Sequência de nucleotídeos de *pRSETA-Lci3-NT-2R-CT*

GATCTCGATCCCGCGAAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGGT
 TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATG**GCTAGC**GATATCACC
 ATGGAG**CTCGAG**ATGTCTTCTGTCTAACATCAATCTGCCTTTCCTCAACTTCAAGCTGGCCAGGTGGTGGCC
 TACGACTACCTCCACGCCGTAAGACTTGGCAGTGGACACTGGGGACCGTGCAGAGATCAAGGATTACACAGCA
 GTGGTGCAGCAGTGGGACTGCACACGGGAGACATCGACACACTGCGGAGTATCCTGCTCAAGGAGGTGGACACT
 GAGAACGGGAGGATGAAGAACTATCACGATATGCTTGCCATCGCAAGGAGAAGCTGGCCAGCATTAGGCGTAGC
 AATGAAGACAGGGTGGCCACGTGCGTGGCCACTTCGACAAAAGCAAGGGAGAAAAGTGGAACTGATTGACGAAGTG
 GACCTGAGGAAAAGTCACTGCTCAAGCCGCTCCAAGCCCTGTGGCTGTGGCCGCTCCTGAAAGCCGTGTGGGCTGTG
 GCCAAGTGCAGCCCCACCGCCGTGCGAGTTCTACGAGTGGGCTGACGTCCAGCTGGAGTATCGGAAGCCCCGCCGCC
 CTGGACGAGATCGCTAAGACCGACGTGCTGGCAAAGCTCTATCCCAGCGCTGAGAGCCTGCAGCAGTCCCTGGAG
 CAGGACCCTAAGCTCAACTACAAAAGCCGCTGCCAGGGATAGTCCCCTCGTTGCCCTCCCTGCACGCTTGGGTGATT
 ACAGCCCTGGCTATCAGCAGGCTTACAACCTGCTGGCTCACGACAAAAGAATCCAGGAACAGAATGACGCCATT
 GCAGCAGCAATTCCCGGAATGAAAGCCTGTAGGGCAAAGATCGCCAGCTGAAGGACGAGCTGTCTAGCAAAGAC
 ACAGCAGCCCTCCAGGACGTTACTAGTACTAGGACAAAGCTGCTGGTACTATCCCTCTGAGCGCCGTG
 ATTAGTCTGTCAACGTTGACACAGGCGTGAAAGGCTGCGTCTTGACAAAAGGACGAGGTGGAGCAGATCCTGTTT
 GAAGCCAAGGCCACCAGGTTCCAACCTCAAGTCTAGGATGAATAGCATTGCCCTGCCGTTACGTGGAAGCAGCCGCT
 GAGCTGCACACCCTGAGCCTCTACACCGCTGAATTGGAAAAGAAGAGGCTGTACCTGCAGGAACACTACTTCTCT
 TCTATCATCCGGTCCGGCGAAGCTGAGGCCAAGTGGGCACGGACCAGATAACCCAAAAGGAGATCGATAGGCTC
 AACGCACTGGTGGCTGAGCTCCAAAAGCACGACGAGAGGTGGGAACCCGATTACGAGGCAGTACGCTTGCCACC
 AGCCACGTCAAGAAGTATCCCGGAGCCGAGTGGGCTATCTGATCGCTGAGAGGTTGAGGAGGTGAGAGCTGCC
 TTCGCTCTGACACTGCTCTTGCCGTGCACGTGGACCCCAACTTCGTGCAGCACATCAAGTTTACCCAGAGTGC
 GACCAGCTGTGCGTGGCTGCGAAATCACACACCCTGCCAAGATGACCGGAACCGAGGTGGACGAGAGGATTAGT
 CAGATGCCTACACGACTGATGAATTACATCTACAAGAATAGAGACGCTCCAAAGACCGGACTGGACCGAGCAGTT
 GCCGACATCTGCAATGCACTGGGGATCGACGACCACAAATTCGCTGGCTTGGGCTTTGACGAGTTCGTGACCCAG
 CTGGCTGGCTTCGACTACCTGGGCGACAAAAGATGCCCTACGAAAGCGAGATCGGAGATCTTCTGATGCTGCTGGAC
 AAGATCAACAACGAGAAATCGCAGCCTCCAGTACACGCTGGAGAAGAGTGTGAAAGGTTCAAGAAACAGGCCGCT
 GTTCTGCAGCGAGATCAAGACGCTCTTACGCTGAGAAAAGCTGACCTGGCTGACGAGATCGATAGGCTGCAAAAC
 CTGGTGGAGAAGCTGAAAAGACCTGGCAGACACTCAAGGAGCCAGCTGGAACACTACCACATGCAGCACCAGCAA
 GCTCAGCAGCTGCGTGTCTCACAGAAACCTGAGTCCCATCCCCCAACCGCAGAAGAGCCACTGTACGCTGTTACC
 ATCGACGAGTCAACGCTCAAAAGGCCCTGTGTGACAAAAGAAAAGCAGAGGGCCGACGCCCTGCAGAAACAATC
 GACGACAAAGACTGGCTGTAATCAGCTGCAAAAGCCAGCTGAGGGAAGTTAGGTGCAGGAACAACGACTTGGAT
 CAGCAGCTGCAGCTGAGCGTGAACCTGAGCGAGAAGCAGAAGCAGATCCTCACTGCCCTTCCACCAGAAGAGAAGA
 AGCGCCACGACGCAAGGGCCGACGAACCCGAACTGGCAGCAGCCGACGGCGTGTCAACCCGAAACGCCAGTGCC
 AGAAGTAGGGGACAGACCTCCCGCCACATTACAACCTGCTGCCGAGCCTTTTCGACCCCGTACTATCGCCGACAGC
 CCTCTTTACGCCGTTACTACTGGACGAGTACAAAGCAAAACAGACGGCCCTGAATAGTGCCAAGGAGGAAGTGCAA
 AGGCTGGTGGG**CTCGAG**GAGCTGCAGAAAAGCCAGGAGGACGGCGAACGTCAAAGGCAGACAATAGACAGCTG
 GCCTCAGACAACGAGAGACTGGCCACCAGCTGGAAAGAGCTCAGGAGGAAGCAGAGCGCTGGCCGGAGACCTG
 GAGAAAAGCAGAAGAAGAGGCTGAGCGACTTGCAGGCGACTGGAGAAGGCCAGGAAGAGGCAGAAACACTGGCT
 GGGGAGCTCCAAAAGGCCAGGAGGACGGGAACGTCAAAGGCAGACAATCGGCAGCTGGCTCAGACAACGAA
 AGGCTGGCCACTGAGCTGGAGAGAGCCAGGAAGAGGCTGAAAGGCTGGCAGGCGACTGGAGAAAAGCTGAGGAG
 GAGGCAGAAAAGACTGGCAGGCGACCTGGAAAAAGCCAAAGAGGAAGCTGAGACGCTGGCTGGC**GTCGAC**GAGCTG
 GCTGACAAGGACCCAGAATTGGCCGCTTTAGGGAAAAGCGCAGGGCCGCTCACGGAGCCAGAGCAGACGAACCC
 GAGCTGGCTGCTGCCGACGGGATTAGCACACGCAATGCCAGGGCCGGAAGCCGTGGACGTCCAGCCGCACAGATC
 AATCCCCTGCTGAAGCCGTGGATCCCGTGACTATCGCAGCTGAGCCACTGTACGCCGTGACCCCTGACGAATAC
 AAGGCCAAAACAGACCGCACTGGAAAAAGCGAGTTGAAGTGGCTGCGCAGCCGAAGAGACTGTGAAAGAGAAACTG
 AGGGAGAACAGCGACCTGATGGTGGAGCTGGAAAAGGTGCGTGACCAGGCTTACGAGATGGATAGGAGGAGGCAA
 GAAGACGGAGCCGCATGGAAGGGGAGCTGCTGGTTGTGCTGATGGAGCTCAAGAAAACCAAGGGAATCAACGAC
 GCCCTGCTGGCTGTGCTTAGGGACAAAGAGTGTGAGGTGAAAAGAGCTTCGATACCACAACGAGTTGTGGGTTGAC
 CCAACGGGAGACAAGAAGCAGGTGGTGCAGAGGCACACTAAGATCTTTGACGGCAATTGGGAGAGGATTGTGCCGA
 GAACGACCCGAAGGCTGTTCGACGCTTTGTGATCGATAGCAGTAACGCCCTGCCACGCTCCCTGGGGACAACATC
 AAACAGGTGTCTTTTGACCACGACGAATTTCTGATA**GCTAGC**ATGGAATTGCAAGCTTGATCCGGCTGCTAACAA
 AGCCCGAAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCTCTAAACG
 GGTCTTGAGGGGTTTTTTTGTGAAAGGAGGAACATATATCCGGATCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACC
 CGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGT
 GTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCCTACTTGGCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCC
 TTTCTCGCCACGTTGCGCGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCT
 TTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGTGGTTACGTTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTT

TTTGCCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCT
 ATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAA
 CAAAAATTTAACGCGAATTTTAAACAAAATATTAACGCTTACAATTTAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCG
 GAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGC
 TTCAATAATATTGAAAAAGGAGAGTATGAGTATTC AACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTTCGGGCAT
 TTTGCCTTCCTGTTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAG
 TGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGA
 TGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCCGC
 GCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAG
 TAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAG
 GACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGC
 TGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCAGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTAT
 TAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCC GGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGAC
 CACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCG
 GTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCC GTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCCAA
 CTATGGATGAACGAAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTCACTGATTAAGCATGGGTAACGTGCAGACCAAG
 TTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTG
 ATAATCTCATGACCAAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAG
 GATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCCCGCTACCAGCGGTGG
 TTTGTTTCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATA
 CTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGC
 TAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACC GGTTGGACTCAAGACGATAGTTAC
 CGGATAAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCG
 AACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCC GAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGG
 TAAGCGGCAGGGTCCGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTG
 TCGGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACG
 CCAGCAACGCGGCCCTTTTTACGGTTCCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTTCTGCGTTATCCC
 CTGATTCTGTGGATAAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCA
 GCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTTCATT
 AATGCAG

Sítio de NheI - GCTAGC

Sítio de KpnI - GCTACG

Sítio de XhoI - CTCGAG

Sítio de SallI - GTCGAC

Extremidade amino terminal

Segmentos repetitivos

Extremidade carboxila terminal

Anexo F - Sequência de aminoácidos de rLci3-NT-2R-CT

MRGS **HHHHHH**GMASDITMELEMSFSLSNINPAFPQLQAGQVVAYDYLHAAKTWQWTLGTVREIKDYTAVVQQWGLH
 TGDIDTLRSILLKEVDTENGRMKNYHDMMLAIAREKLASIRRSNEDRVSHVRGHFDKAREKVELIDEVDLRKVTAQ
 AAPSPVAVAVLKAVWAVAKCDPTAVEFYEWADVQLEYRKPAAALDEIAKTDVLAKLYPSAESLQQSLEQDPKLNK
 AAARDSPVVASLHAWVITALAYQQAYNLLAHDKRIQEQNDAIAAAIAGMKACRAKIAKLDKDELSSKDTAALPGQV
 TSFTRTSVLVTIPLSAVISPVNVDTGVKGCVLTKDEVEQILFEAKATRFQLKSRMNSIACRYVEAAAELHTLSLY
 TAELEKKRLYLQEHYFSSIIRSGEAEAKWARTEDTQKEIDRLNALVAELQKHDERWEPEYEAHSVATSHVKKYPG
 AEWAYLIAERFEEVRAAFASDTALAVHVDPNFVQHIFKFTPECDQLCVRCEITHPAKMTGTEVDERISQMPTRLMN
 YIYKNRDAPKTGLDRAVADICNALGIDDHKFAGLGFDEFVTQLAGFDYLGDKDAYESEIGDLLMLLDKINNENRS
 LQYTTLEKSAERFKKQAAVLQRDQDALTLRNADLADEIDRLQNLVEKLDLADTQGAQLEHYHMQHQQAQQLRAHR
 NLSPIPPPTAEPLYAVTIDELNAQKALCDKEKQRADALQKQLDDKELALNQLSLSLREVRRCRNNDLDDQLLSAE
 LSEKQKQILTAFHQRRSAHDARADEPELAAADGVSTRNASARSRGRPPAHITTAEPFDPVTIAADPLYAVTLD
 EYKAKQTALNSAKEEVQRLVGLLELQKAQEDGERQKADNRQLASDNERLATELERAQEEAERLAGDLEKAEAAA
 RLAGDLEKAEAAETLAGELQKAQEDGERQKADNRQLASDNERLATELERAQEEAERLAGDLEKAEAAAERLAGD
 LEKAEAAETLAGVDELADKDPELAAAFREKRRAAHGARADEPELAAADGISTRNARAGSRGRPAAQINPAAEAVD
 PVTIAAEPLYAVTLDEYKAKQTALENAVEVACAAEETVKEKLENSDLMVELEKVRDQAYEMDRRRQEDGAAMEG
 ELLVLMELKKLKGINLALLAVLRDKECEVKELRYHNELWVDPTGDKKQVVTRHTKIFDGNWERIVRERPEGLFA
 AFVIDSSNACHVPGDNIKQVSFDHDEF **---**

M - Códon de iniciação

HHHHHH - Cauda de histidina

--- - Códon de parada

Anexo G - Sequência de nucleotídeos de *pRSETA-Lci3-NT-CT*

GATCTCGATCCCGCGAAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGT
 TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATG**GCTAGC**GATATCACC
 ATGGAG**CTCGAG**ATGTCTTCTGTCTAACATCAATCCTGCCTTTCCTCAACTTCAAGCTGGCCAGGTGGTGGCC
 TACGACTACCTCCACGCCGTAAGACTTGGCAGTGGACACTGGGGACCGTGCAGAGATCAAGGATTACACAGCA
 GTGGTGCAGCAGTGGGACTGCACACGGGAGACATCGACACACTGCGGAGTATCCTGCTCAAGGAGGTGGACACT
 GAGAACGGGAGGATGAAGAACTATCACGATATGCTTGCCATCGCAAGGGAGAAGCTGGCCAGCATTAGGCGTAGC
 AATGAAGACAGGGTGGCCACGTGCGTGGCCACTTCGACAAAGCAAGGGAGAAAGTGGAACTGATTGACGAAGTG
 GACCTGAGGAAAAGTCACTGCTCAAGCCGCTCCAAGCCCTGTGGCTGTGGCCGCTCCTGAAAGCCGCTGTGGGCTGTG
 GCCAAGTGCAGCCCCACCGCCGTCGAGTTCTACGAGTGGGCTGACGTCCAGCTGGAGTATCGGAAGCCCCGCCGCC
 CTGGACGAGATCGCTAAGACCGACGTGCTGGCAAAGCTCTATCCCAGCGCTGAGAGCCTGCAGCAGTCCCTGGAG
 CAGGACCCTAAGCTCAACTACAAAGCCGCTGCCAGGGATAGTCCCCTCGTTGCCCTCCCTGCACGCTTGGGTGATT
 ACAGCCCTGGCTATCAGCAGGCTTACAACCTGCTGGCTCACGACAAAAGAATCCAGGAACAGAATGACGCCATT
 GCAGCAGCAATTGCCGAATGAAAGCCTGTAGGGCAAAGATCGCCAAAGCTGAAGGACGAGCTGTCTAGCAAAGAC
 ACAGACCCCTCCAGGCGAGTACTAGCTTCACTAGGACAAGCGTGTCTGGTACTATCCCTGAGCGCCGTG
 ATTAGTCTGTCAACGTTGACACAGGCGTGAAGGCTGCGTCTTGACAAAGGACGAGGTGGAGCAGATCCTGTTT
 GAAGCCAAGGCCACCAGGTTCCAACCTCAAGTCTAGGATGAATAGCATTGCCCTGCCGTTACGTGGAAGCAGCCGCT
 GAGCTGCACACCCTGAGCCTCTACACCGCTGAATTGGAAAAGAAGAGGCTGTACCTGCAGGAACACTACTTCTCT
 TCTATCATCCGGTCCGGCGAAGCTGAGGCCAAGTGGGCACGGACCGAAGATACCCAAAAGGAGATCGATAGGCTC
 AACGCACTGGTGGCTGAGCTCCAAAAGCACGACGAGAGGTGGGAACCCGATTACGAGGCAGTACGCTTGCACC
 AGCCAGTCAAGAAGTATCCCGGAGCCGAGTGGGCTATCTGATCGCTGAGAGGTTGAGGAGGTGAGAGCTGCC
 TTCGCTCTGACACTGCTCTTGCCGTGCACGTGGACCCCAACTTCGTGCAGCACATCAAGTTTACCCAGAGTGC
 GACCAGCTGTGCGTGCCTGCGAAATCACACACCCTGCCAAGATGACCGGAACCGAGGTGGACGAGAGGATTAGT
 CAGATGCCTACGACTGATGAATTACATCTACAAGAATAGAGACGCTCCAAAGACCGGACTGGACCGAGCAGTT
 GCCGACATCTGCAATGCACTGGGGATCGACGACCACAAATTCGCTGGCTTGGGCTTTGACGAGTTCGTGACCCAG
 CTGGCTGGCTTCGACTACCTGGGCGACAAAGATGCCCTACGAAAGCGAGATCGGAGATCTTCTGATGCTGCTGGAC
 AAGATCAACAACGAGAAATCGCAGCCTCCAGTACACGCTGGAGAAGAGTGTGAAAGGTTCAAGAAACAGGCCGCT
 GTTCTGCAGCGAGATCAAGACGCTCTTACGCTGAGAAAACGCTGACCTGGCTGACGAGATCGATAGGCTGCAAAAC
 CTGGTGGAGAAGCTGAAAGACCTGGCAGACACTCAAGGAGCCCAGCTGGAACACTACCACATGCAGCACCAGCAA
 GCTCAGCAGCTGCGTGTCTCACAGAAACCTGAGTCCCATCCCCCAACCGCAGAAGAGCCACTGTACGCTGTTACC
 ATCGACGAGTCAACGCTCAAAGGCCCTGTGTGACAAAGAAAAGCAGAGGGCCGACCCCTGCAGAAACAATC
 GACGACAAAGACTGGCTGTAATCAGCTGCAAAAGCCAGCTGAGGGAAGTTAGGTGCAGGAACAACGACTTGGAT
 CAGCAGCTGCAGCTGAGCGTGAACCTGAGCGAGAAGCAGAAGCAGATCCTCACTGCCCTTCCACCAGAAGAGAAGA
 AGCGCCACGACGCAAGGGCCGACGAACCCGAACTGGCAGCAGCCGACGCGTGTCAACCCGAAACGCCAGTGCC
 AGAAGTAGGGGACAGACCTCCCGCCACATTACAACCTGCTGCCGAGCCTTTTCGACCCCGTACTATCGCCGACAG
 CCTCTTTACGCCGTTACTACTGGACGAGTACAAAGCAAACAGACGGCCCTGAATAGTGCCAAGGAGGAAGTGCAA
 AGGCTGGTGGGC**CTGAGGCTCGAC**GAGCTGGCTGACAAGGACCCAGAATTGGCCGCTTTAGGGAAAAGCGCAGG
 GCCGCTCACGGAGCCAGAGCAGACGAACCCGAGCTGGCTGCTGCCGACGGGATTAGCACACGCAATGCCAGGGCC
 GGAAGCCGTGGACGTCCAGCCGCACAGATCAATCCCGCTGCTGAAGCCGTGGATCCCCTGACTATCGCAGCTGAG
 CCACTGTACGCCGTGACCCTCGACGAATACAAGGCCAAACAGACCCGCACTGGAAAACGCAGTTGAAGTGGCCTGC
 GCAGCCGAAGAGACTGTGAAAGAGAACTGAGGGAGAACAGCGACCTGATGGTGGAGCTGGAAAAGGTGCGTGAC
 CAGGCTTACGAGATGGATAGGAGGAGGCAAGAAGACGGAGCCGATGGAAGGGGAGCTGCTGGTTGTGCTGATG
 GAGCTCAAGAAACTCAAGGGAATCAACGACGCCCTGCTGGCTGTGCTTAGGGACAAAGAGTGTGAGGTGAAAGAG
 CTTTCGATACCACAACGAGTTGTGGGTTGACCCAAAGGGAGACAAGAAGCAGGTGGTGACGAGGCACACTAAGATC
 TTTGACGGCAATTGGGAGAGGATTGTGCGAGAACGACCCGAAGGGCTGTTGCGAGCCTTTGTGATCGATAGCAGT
 AACGCCCTGCCAGTCCCTGGGGACAACATCAAACAGGTGTCTTTTACCACGACGAATTTCTGATAA**GGTAC**ATG
 GAATTCGAAGCTTGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCCTGAGCAATA
 ACTAGCATAACCCCTTGGGGCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTGTGTAAGGAGGAACATATCCGGATC
 TGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCG
 CCCTGTAGCGCGCATTAAAGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCCGTACACTTGCAGCGCCCTA
 GCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTCCCTTCCCTTTCGCCACGTTCCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGG
 GGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCA
 CGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTC
 TTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTTCTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCG
 GCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACCGCAATTTTAAACAAAATATTAACGCTTACAATT
 TAGGTGGCACTTTTCGGGGAAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTATTTTTCTAAATACATTTCAATATGTATC
 CGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTTCAACATTTCC
 GTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTTCGGGCATTTTGCCTTCCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAA

AAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGA
 GTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTA
 TTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCA
 CAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCCTGCCATAACCATGAGTGATAAACA
 CGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATG
 TAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTG
 TAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAG
 ACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATA
 AATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCG
 TAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCAC
 TGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTAAT
 TTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAAATCCCTAACCGTGGTTTTTCGTTCCACT
 GAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGC
 AAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGGTTTGGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAA
 CTGGCTTACAGCAGAGCGCAGATAACCAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGA
 ACTCTGTAGCACCCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTC
 TTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACAC
 AGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTC
 CCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAG
 GGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTTGTGCGGTTTTGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCT
 CGTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTT
 TTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCTTTGAGTGAGCTGATA
 CCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAAGTGCAGGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAC
 CGCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATTCATTAATGACG

Sítio de NheI - GCTAGC

Sítio de KpnI - GGTAAC

Sítio de XhoI - CTCGAG

Sítio de SallI - CTCGAC

Extremidade amino terminal

Segmentos repetitivos

Extremidade carboxila terminal

Anexo H - Sequência de aminoácidos de rLci3-NT-CT

MRGS **HHHHHH**GMASDITMELEMSFSLSNINPAFPQLQAGQVVAYDYLHAAKTWQWTLGTVREIKDYTAVVQQWGLH
 TGDIDTLRSILLKEVDTENGRMKNYHDMMLAIAREKLASIRRSNEDRVSHVRGHFDKAREKVELIDEVDLRKVTAQ
 AAPSPVAVAVLKAVWAVAKCDPTAVEFYEWADVQLEYRKPAAALDEIAKTDVLAKLYPSAESLQQSLEQDPKLNK
 AAARDSPVVASLHAWVITALAYQQAYNLLAHDKRIQEQNDAIAAAIAGMKACRAKIAKLDKDELSSKDTAALPGQV
 TSFTRTSVLVTIPLSAVISPVNVDTGVKGCVLTKDEVEQILFEAKATRFQLKSRMNSIACRYVEAAAELHTLSLY
 TAELEKKRLLYLQEHYFSSIRSGEAEAKWARTEDTQKEIDRLNALVAELQKHDERWEPEYEAHSVATSHVKKYPG
 AEWAYLIAERFEEVRAAFASDTALAVHVDPNFVQHIFKFTPECDQLCVRCEITHPAKMTGTEVDERISQMPTRLMN
 YIYKNRDAPKTGLDRAVADICNALGIDDHKFAGLGFDEFVTQLAGFDYLGDKDAYESEIGDLLMLLDKINNENRS
 LQYTLEKSAERFKKQAAVLQRDQDALTLRNADLADEIDRLQNLVEKLDLADTQGAQLEHYHMQHQQAAQQLRAHR
 NLSPIPPATAEEPLYAVTIDELNAQKALCDKEKQRADALQKQLDDKELALNQLSLSLEVRRCRNNDLDDQLLSAE
 LSEKQKQILTAFHQRRSAHDARADEPELAAADGVSTRNASARSRGRPPAHITTAEPFDPVTIAADPLYAVTLD
 EYKAKQTALNSAKEEVQRLVGLVDELADKDPELAFAFREKRRAAHGARADEPELAAADGISTRNARAGSRGRPAA
 QINPAAEAVDPVTIAAEPLYAVTLDEYKAKQTALENAVEVACAAEETVKEKLENSDLMVELEKVRDQAYEMDRR
 RQEDGAAMEGELLVVLMEKLLKLGINDALLAVLRDKECEVKELRYHNELWVDPGTGDKKQVVTRHTKIFDGNWERI
 VRERPEGLFAAFVIDSSNACHVPGDNIKQVSFDHDEF **---**

- M** - Códon de iniciação
- HHHHHH** - Cauda de histidina
- - Códon de parada

Anexo I - Sequência de nucleotídeos de *pRSETA-Lci10-NT-2R*

GATCTCGATCCCAGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGT
 TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGT
 GGACAGCAAATGGGTGCGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCGATGGGGATCCGAGCTCGACATGGCACAC
 CTGCCACTGGAGGGCTCAGTGGTGTGCTACGAGTTCTTGGACGCCAAGAGGAAGTGGCTGTGGGGCGTGGGAGCT
 GTGACTCATAGTGACGACAGGGTCTGTGTGATCAGCCAGTGGATGGGAGCACCTGTGGATAAGGCCATGACTGCA
 AACTGGAATCAGAGGCCCGCAGTAGCAAGGCTGAGGCCAAGACCCACCAGGATAGATTGCTCGCCATCCGAGAG
 AGGATTGAAAGCCAGTCTGTGGAAGTAGCAAGGAGGAAAAGGAGCGGACGAGCGAGGAGCTTAGCGAATGTCTG
 GTGCTGATCGGCAAAACACAGGAATAGGTCCAGGAGCCTGCTCGCCGACTTGGAAATCATCAAGGGACCCAGCACA
 GTCCAAGTCAAGTGCCAGCAGTTCCTCCCGCAAGCTCCAGCATCGCTATCTTGCAGCAGTCAATTCTGAGGGTT
 ATCAGTCACGTGACGACACCAAGCTTGGTCTGTCTAGCGAAGAGGTGGAGAGTATTGAGAAGGCCGTGACCCAC
 ACGCACAGTCAGCTGAATAGCGAACTGCACAAGCTGAGGGCTACCGTTGAGGCCACCAGAAATCGAGTCAAACGAG
 CTCAGAGATCAGATTAGGAACCTGGAGGAGCAGCTGAAGCGAGTGAAGAACATGACCTGTGAGCTGAGGGGGCTGG
 GACGGCGGAGAGTGAAGCGCTTCCCTGAGAAGCTGAGGGAACATGACCTGTGAGCTGAGGGGGCTGG
 GATTCAAGCAGCCCTGGTGTGATGACCGAGCACATCAAGTCCCTGGGATGACGGCGTACTTTGCTTTCAT
 CACAAACCCGAGGAAACTAAGAGCGTCTTCGCCGCTGAAGCAGCCTTCGCTTGTGCTGCCCTATTTCAGTGTGTG
 ACAAACCCCAAGATGACAACCCACGGCAAGCACTTGAAGCGCCGAGTTCAGCGTGAAGCCACCCAGAAACAGTTACA
 ACAAAGGAAATCGACCAGAGGCTGGCCTCCTACGCCCTTCCCGAGCATGCACCTGCTGCACGAAGAGCCACTCGGA
 GTTAAAGACTGGGCTCGACAGAGCTATTGAAGGCCGGAACACGCCCTGGGGATTCCCGAAGGGAAACACGAAGGG
 CTGTACTTTGACGAGTTCATGGAGAACATGCCTGACACTACTTTTCAGCAATGACAAAGACGCCCTACGAGAGCGAA
 ATCGGAGACCTCCTGATGCTGTGACAAAACCTGAACAACGAGAATCGGAGCCTGCAATACACCCTGGACAAATCC
 GCCGCCGAGCTCAAGAGGCAGGTGAGCGAGGCTCAGAAAGATCAGCAGCAGTGAATACCGAGATCGCCAGGCTT
 AGGAACATCGTGAGTAACTCAAAGACCTGGCCGAGCAGCAGGAGACGGAGCTGGTGCCTCAAGGGTCCAGACA
 CAGAGGGCAGAGGAGGCAGATTCCACTACAACCTGGCTCCCTGCCAACGATTTCTCAAGACGCAGAGTACGCA
 GTCACTATGCAAGAATACAAAGATCAGAAAGAAGCCACCGATAACGCACAAAGGGCAGTGGTGAAGAGAAAGCT
 AAGGCCGAGCAAATGCACCACTTGTCAAAATGCACGAACAACAATCAGCCAGAAATGCCAAACGCCCTGAGATCT
 CTGCAGGACGCCCTTCGCAGCTGAGACACAGCAGAGCGGCTGAGAATTTTTCGCAGCTGGAGTGCAGACTGATCGAC
 GTGCTCCTGCAGTTCAGGCTTCTCAAGCCCTGACTCAGGCCTTCACCACATCAATAGTCAACAGCAGGCTGAA
 CTGTTTAGCTCAATTGTTTAGAGCACGGAGGAACGCAGCTCTGGAGGCTAGGGACGCTGATGGCACACTTCCAGTG
 CCCGCCAGACCCGCTCCCTGCCGGAGAAGCAGCTGAAAGAGCCCTGGAGCCTCAACAGATTGCCGACGAACCCCTG
 TATGCCGTGACCCCTGGAGGAGCTGGAACAGGCACGAGAAGACGCAGCCAGGGGCGTGGCAGCTATTGAGGATAAC
 GCCGCCGAGCTGGAGTCCGAGCTCCTGGACGTGTGGCAGAACTCAAGGCCGTTAAGGGGGAGAATGCTGCCCTG
 AGAGCCGTGTGCGAGATGAAGGATGCTGCCGTTGCCGACCTGGAAGAGCAGCAGCTGCGTGCACAAATAGTGAC
 AAAGCAAAACCTCAGACCCTCTAGGCACACCAAGGTCTTTGAGGGGAAGAGTGGGGAGCCGTTGGTGAAGAAC
 AAACCTCACGCCCTGCACGACGCCCTTTGTACAGACGTGTGCGCAGCCTGTAGGGTGTGCAGAGATGACTTGAGC
 GAGATCGCCTTCGCACTGGGCTCCCTCCAAGCCAGCGTTAGCGTGACCCACAATAGTGACATCAGCTGTGACGAC
 ATCGCAAAACTGGTTGAGGAGTATCACTACCCAAACGTGTGGGCTCTGTACGCTAAGAGACTCGCACCCAAAGGAC
 GGACTCGACGAAGCTAAGGACGCCATCAGCAGCTTGCAGCTTGTCTGGCTGCAAAGGAGGAAGATGCTGCAAGG
 GTGGCCGAGAAACTTACGAAGAACGTGCTGAAGCCGAGCAGTGGCCAAGGAGGTGCGAGCTCAATTTCAGG
 GCACGGAGGAACGCAGCTCTGGAGGCCAGGACGCCGACGGCAGCTGCCCGTTCCCTGCCAGGCCCGTGGCAGCC
 GGAGAGGCAGCTGAGCGAGCCCTGGAGCCTCAACAGATTGCCGACGAGCCCTGTACGCAGTACCCCTGGAGGAG
 TACTTGGGGAAAGACGCCCGAGTTGAGCAGCTGGCAGCTGAGCTGGAAGAACAGAGAGCCGAAGCCGAGAGGCTG
 GCCAAGGAGGTGGCCGCCCAATTCGAAGCTTGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGC
 TGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAAACCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTTGTGAAAGG
 AGGAACTATATCCGGATCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTG
 AATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCT
 AACTTGCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCGCCGCTTTCCC
 CGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGTCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTT
 GATTAGGGTGTGTTTACGTTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACG
 TTCTTTAATAGTGGACTTGTTCAAACTGGAACAACACTCAACCCATCTCGGCTTATTTCTTTTGTATTTATAA
 GGGATTTTCCGATTTTCGCCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCAATTTTAAACAAA
 ATATTAACGCTTACAATTTAGGTGGCACTTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTATTTTTCTAAA
 TACATTTCAAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTA
 TGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTTCGGGATTTTTCCTTCTGTTTGTCTACCCAG
 AAACGCTGGTGAAGTAAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACA
 GCGGTAAGATCCTTGAAGTTTTTCGCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTCTGCTATGTG
 GCGGGTATTATCCGTATTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGG
 TTGAGTACTACCAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAA

CCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGC
 ACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGC
 GTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTT
 CCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTG
 GCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATG
 GTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCG
 CTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATT
 TAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTAAC
 GTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGC
 GCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAA
 CTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAG
 GCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCA
 GTGGCGATAAGTCGTGCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCAGGATAAGGCGCAGCGGTTCGGGCTGAA
 CGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTAT
 GAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGC
 GCACGAGGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGC
 GTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCC
 TGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCG
 CCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAG
 AGCGCCAATACGCAAACCGCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAG

Sítio de XhoI - CTCGAG

Sítio de EcoRI - GAATTC

Sítio de MfeI - CAATTG

Porção amino terminal

Segmentos repetitivos

Anexo J - Sequência de aminoácidos de rLci10-NT-2R

MRGS **HHHHHH**GMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDRWGSELEMAHLPLEGSVVCYEFLLDAKRKWLWGVGAVTHSDDRV
 CVISQWMGAPVDKAMTAKLESEAASSKAEAKTHQDRLLAIRERIESQSCGTSKEEKERTSEELSECLVLIGKHRN
 RSRLLADLEI IKGPSTVQVKCQQFTPASSSIAILRSSILRVISHVTTPSLVLSSEEVESEIEKAVTHTHSQLNSE
 LHKLRATVEATEIESNELRDQIRNLEEQLKRVKTTTFEPVRI SDGGESGSFAFPEKLRHDLLSLRGAWDSSTALVM
 TEHTIKFPWDDGDTLLHHKPEETKSVFAAEAAAFACCVPIQCVTNPKMTTHGKHL SAEFSVSHPETVTTKEIDQRL
 ASYAFPSMHL LHEEPLGVKTGLDRAIEGLEHALGIPEGKHEGLYFDEFMENMPD TTF SNDKDAYESEIGDLLMLL
 DKLNNENRSLQYTLDKSAAELKRQVSEAQKDHDLNTEIARLRNIVSKLKD LAEQQETELVRSRVQTRAE EEARF
 HYNLAPPANDSQDAEYAVTMQEYKDQKEATDNAQRALVEEKAKAEQMHHLLKMHEQQSAQNAKRLRSLQDAFAAE
 TQQTAE N FCALECE LIDVLLQFKASQALTQALHHINSQQQAE LFSQLFRARRNAALEARDADGTL PVPARPV PAG
 EAAERALEPQQIADEPLYAVTLEELEQAREDAARGVAAIEDNAAALESEL LDVLAELKAVKGENAALRAVCEMKD
 AAVADLEKHDVRANNSDKAKPQTTSRHTKVFEGEEWGAVVETKPHALHDAFVTDVCAACRVCRDDLSEIAFALGS
 LQASVSVTHNSDISCDDIAKLVEEYHYPNVWALYAKRLAPKDGLEAKDAISDLQLALAAKEEDAARVAEKLHEE
 RAEAEERLAKEVAAQLFRARRNAALEARDADGTL PVPARPV PAGEAAERALEPQQIADEPLYAVTLEEYLGKDAAV
 EQLAAELEEQR AEAEERLAKEVAAEFEA **■**

M - Códon de iniciação

HHHHHH - Cauda de histidina

■ - Códon de parada

Anexo K - Sequência de nucleotídeos de *pRSETA-Lci10-NT*

GATCTCGATCCCGCGAAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGT
 TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGT
 GGACAGCAAATGGGTGCGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCGATGGGGATCCGAGCTCGACATGGCCACAC
 CTGCCACTGGAGGGCTCAGTGGTGTGCTACGAGTTCTTGGACGCCAAGAGGAAGTGGCTGTGGGGCGTGGGAGCT
 GTGACTCATAGTGACGACAGGGTCTGTGTGATCAGCCAGTGGATGGGAGCACCTGTGGATAAGGCCATGACTGCA
 AACTGGAATCAGAGGCCCGCAGTAGCAAGGCTGAGGCCAAGACCCACCAGGATAGATTGCTCGCCATCCGAGAG
 AGGATTGAAAAGCCAGTCTGTGGAAGTAGCAAGGAGGAAAAGGAGCGGACGAGCGAGGAGCTTAGCGAATGTCTG
 GTGCTGATCGGCAAAACACAGGAATAGGTCCAGGAGCCTGCTCGCCGACTTGGAAATCATCAAGGGACCCAGCACA
 GTCCAAGTCAAGTGCCAGCAGTTCCTCCCGCAAGCTCCAGCATCGCTATCTTGCAGCTCAATTCTGAGGGTT
 ATCAGTCACGTGACGACACCAAGCTTGGTCTGTCTAGCGAAGAGGTGGAGAGTATTGAGAAGGCCGTGACCCAC
 ACGCACAGTCAGCTGAATAGCGAACTGCACAAGCTGAGGGCTACCGTTGAGGCCACCAGAAATCGAGTCAAACGAG
 CTCAGAGATCAGATTAGGAACCTGGAGGAGCAGCTGAAGCGAGTGAAGAACATGACCTGTGAGCTGAGGGGGCTGG
 GACGGCGGAGAGTGAAGCGCTTCCCTGAGAAGCTGAGGGAACATGACCTGTGAGCTGAGGGGGCTGG
 GATTCAAGCAGCCCTGGTGTGATGACCGAGCACATCAAGTTCCCTGGGATGACGGCGTACTTTGCTTCAT
 CACAAACCCGAGGAAACTAAGAGCGTCTTCGCCGCTGAAGCAGCCTTCGCTTGTGCTGCCCTATTCAGTGTGTG
 ACAAACCCCAAGATGACAACCCACGGCAAGCACTTGAAGCGCCGAGTTAGCGTGAAGCCACCCAGAAACAGTTACA
 ACAAAGGAAATCGACCAGAGGCTGGCCTCCTACGCCCTTCCCGAGCATGCACCTGCTGCACGAAGAGCCACTCGGA
 GTTAAAGACTGGGCTCGACAGAGCTATTGAAGGCCGGAACACGCCCTGGGGATTCCCGAAGGGAAACACGAAGGG
 CTGTACTTTGACGAGTTCATGGAGAACATGCCTGACACTACTTTTACGCAATGACAAAGACGCCCTACGAGAGCGAA
 ATCGGAGACCTCCTGATGCTGTGACAAACTGAACAACGAGAATCGGAGCCTGCAATACACCCTGGACAAATCC
 GCCGCCGAGCTCAAGAGGCAGGTGAGCGAGGCTCAGAAAGATCAGCAGCAGTGAATACCGAGATCGCCAGGCTT
 AGGAACATCGTGAGTAACTCAAAGACCTGGCCGAGCAGCAGGAGACGGAGCTGGTGCCTCAAGGGTCCAGACA
 CAGAGGGCAGAGGAGGCAGATTCCACTACAACCTGGCTCCCTTCCCAACGATTTCTCAAGACGCAGAGTACGCA
 GTCACTATGCAAGAATACAAAGATCAGAAAGAAGCCACCGATAACGCACAAAGGGCAGTGGTGAAGAGAAAGCT
 AAGGCCGAGCAAATGCACCCTTGTCAAAAATGCACGAACAACAATCAGCCAGAAATGCCAAACGCCCTGAGATCT
 CTGCAGGACGCCCTTCGACAGTGAAGACACAGCAGACGGCTGAGAATTTTGCAGCTGGAGTGCAGACTGATCGAC
 GTGCTCCTGCAGTTCAGGCTTCTCAAGCCCTGACTCAGGCCTTACCACATCAATAGTCAACAGCAGGCTGAA
 CTGTTTAGCTCAATTGCAATTGCAATTGCAAGCTTGTATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGC
 TGCTGCCACCCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCTCTAAACGGGTCTTGAAGGGTTTTTTGTGAA
 AGGAGGAACTATATCCGGATCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCAGTCCGCTTCCCAACAGTTCGCGCAG
 CTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGCGCATTAAGCGCGGGTGTGGTGTACGCGCAGCGTACC
 GCTACACTTCCAGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCGCCGGCTTT
 CCCCCTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTTAGGGTTCCGATTTAGTGTCTTACGGCACCTCGACCCCAAAAA
 CTTGATTAGGGTGTGTTTACGCTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCC
 ACGTTCCTTAAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACGGAACAACACTCAACCCATCTCGGTCTATTTCTTTGATTTA
 TAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCTATTTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAA
 AAAATATTAACGCTTACAATTTAGGTGGCACTTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTATTTTCT
 AAATACATTAACAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGA
 GTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCTTATTCCTTTTTTGCAGCATTTTGCCTTCTGTTTTTGTCTCACC
 CAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAAGTGGATCTCA
 ACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAAGTTTTTCCAATGATGAGCAGTTTTTAAAGTTCTGCTAT
 GTGGCGGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACT
 TGGTTGAGTACTCACCAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATATGACAGTGTGCCA
 TAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTT
 TGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGTGCTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACG
 AGCGTGACACCAGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAG
 CTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTCCGG
 CTGGTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGTTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAG
 ATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAAGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGA
 TCGCTGAGATAGGTGCTTCACTGATTAAGCAATGGTAACTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTG
 ATTTAAAACTTCATTTTTTAATTTAAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTT
 AACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAAGATCCTTTTTTTC
 TGCAGGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCCAGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTTGCCGGATCAAGAGCTAC
 CAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAAGCAGAGCGCAGATAACCAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGT
 TAGGCCACCCTTCAAGAATCTGTAGCACCCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTG
 CCAGTGGCGATAAGTGTGCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCAGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCT
 GAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAGTGAAGATACCTACAGCGTGAAG

TATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAG
AGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCGTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTG
AGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACCGGGCCTTTTTACGGT
TCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTA
CCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGG
AAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAG

Sítio de XhoI - **CTCGAG**

Sítio de EcoRI - **GAATTC**

Sítio de MfeI - **CAATTG**

Porção amino terminal

Anexo L - Sequência de aminoácidos de rLci10-NT

MRGS **HHHHHH**GMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDRWGSELEMAHLPLEGSVVCYEFLLDAKRKWLWGVGAVTHSDDRV
CVISQWMGAPVDKAMTAKLESEAASSKAEAKTHQDRLLAIRERIESQSCGTSKEEKERTSEELSECLVLIGKHRN
RSRSLADLEIIKGPSTVQVKCQQFTPASSSIAILRSSILRVISHVTTPSLVLSSEEVESEIEKAVTHTHSQLNSE
LHKL RATVEATEIESNELRDQIRNLEEQLKRVKTTTFEPVIRISDGGESGSAPPEKLRHDL LSLRGAWDSSTALVM
TEHTIKFPWDDGDTLLHHKPEETKSVFAAEAAAFACCVPIQCVTNPKMTTHGKHL SAEFSVSHPETVTTKEIDQRL
ASYAFPSMHL LHEEPLGVKTGLDRAIEGLEHALGIPEGKHEGLYFDEFMENMPD TTF SNDKDAYESEIGDLLMLL
DKLNNENRSLQYTLDKSAAELKRQVSEAQKDH DALNTEIARLRNIVSKL KDLAEQQE TELVRSRVQTQRAEEARF
HYNLAPPANDSQDAEYAVTMQEYKDQKEATDNAQRALVEEKAKAEQMHHLLKMHEQQSAQNAKRLRSLQDAFAAE
TQQTAENFCALECELIDVLLQFKASQALTQALHHINSQQQAELFSQLQLEFEA **■**

M - Códon de iniciação

HHHHHH - Cauda de histidina

■ - Códon de parada

Anexo M - Sequência de nucleotídeos de *pRSETA-Lci12-NT-4R-CT*

GATCTCGATCCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGT
 TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCGGGTTCATCATCATCATCATCATGGTATGCTAGCGATATCACC
 ATGGAACTCGAGATGAGCACCAGACAACGACATTTGAGAGGCAGATCATGATGGAGATGGAGGCAGAGATCAGCAGG
 TCACAGGGAAACAGGCGTGACCCCTACACCAATCCCCCCCCCTTCGAGCTGAGCTTCATCGAGGATGACCCTATG
 GAGGCAGCCAGGAAGGCAGAAAGTGACAGGATCCAGAGAGAAATCGAGGAGAGGCTGAGGAGGAAACAACAGCAG
 AAGCAGCGAGACAGCCTGGAGCTGAGTCTAACTGCCCGCTAACGAGGGAGAGATGAGTGCCGTCTACGACAGC
 CTGCAACAGCCCCAAAACGCCAGCTGGCCAGTGGGAGCTCACGATAGGCACGTGGTGAGGGCAAGCCTGAGCTCC
 GAGAGCGAGAATAGAGAGAAAGCTGAAGAGGCCAGCCGACTGAGGGACGACGAGGCTGCCATGACACGGAGGGAA
 ACTGACGAAGAGGCCAGGATCGATATGGAAGTCCAGGTGAGGAGAAGTGCCGAGATTCAGGCCTGCGTGAGCTC
 GAGGCCGAGGAACAGGCCAGGAGGGAGGCTGAAGAGCAGGCCAGACGCGTCCGCGAGGAACAGGCCAGGAGGGAG
 GCAGAGGAGCAAGCCAGGAGAGAGCTCGACCAGGCCGGAGGCCCTGGAGGAGGTGTTGCGAGAGGCCAGGGCTGTC
 GTGATGGGCGAGTTCTCCGAGAAGCTGAAGCAACACAGTGCCTGTGGCTGCCTTCGTGAGTGACACAGACGAGAAA
 CCCGTGAATAGCGCCTCAGCAACTCACAGAGGGGACGCCAGGTGGCAGAACGAGTACACTGAACAAGGGGAACT
 GGAGCAGACGCCGAGGAAGAGCATGGCGTGCAACAGCACGATAGCAGGTGCTGCCGCTACCGAACGAGCAGTCCA
 AGCGTGAGTGACAGAGATATGAGATCAGAACGTTCTACTAACAGCAAAGACTCAGCCAGCGAAACAGTGAGCAGG
 TATAGCCTGAGCACCCTTGAGGCCATTAGGAACGACAACGGGATCCCTGTCCCGTACCAGGAGGAGGAGGTGTACTAC
 GTCCCCAGGTGACCAAGGAAGCCCCATTCGAGAGCTTTGAAGAGGCCCTTGAGTGCCGAACAGCAACAGCGG
 CTGACTGAGGACCCATCCGGAGGAGCTGCATTTAGGTTTACAGGTACGGAACCATCAGGGAGAGCGGCAAGTGC
 CTGTTCCCAACCCGGGAGGTACGGGGGAGGTCCCCGCACACGGAAAGGTGCAGCTGGGCTTCTTCAGCGCTAAG
 CAAACAATCATTTGCCCTGCAGAGGCCCTTAGGAAGCCAAACGCCGACCGAGAACGACCCTGCGAGCCAGGCGAA
 CGAAGCCTGTCAACCTCAAGTGTACTTTGAGAGCGAAGTGCTGAGCGACCATACGCTGACCCTGGACGACGAA
 GACTATCCCATAACGCCCTACCGAACGACTCCTGACCAAGGCCAGCTGATGAGAGGGGACAACGCCATGGTG
 AGGAAAAGCTGTTAGCCAGATCAGCTATGGGGACCAATTCAGGTGTGGGAAAGAGCCAGCAGAATAGCACCCT
 GCCGACGAGGCTGCCACCGAGAGCACTGCCGCCAATCTGTGGGTGAGCGACATGACACCCGGAAGCCTGTGCCT
 GCCATGAGGACGTTTACCGCGGATTCGTCTACTGTATCAAGGCAACAAAGATCAGCAATAGGGTGATCGAACTG
 CACGGAGCCAGCACAGACCCTTTGGTGATCGCCGACGCCCTTACTCATGGACGGAAGACAGAAAGTGAAGTG
 AGCGAGACCTTCTACTTCGATAGCGAATTTGGACATCTTCTACCCTCAGAAGGAGAGGAGTGAGCTGGCTAAGAAG
 AATCAGGTTCGTGGCATTCGTGCCAAATGAGTTTAAAGGCACACTGCATCTCGTCATGAGGGTGTACCGTCCCTGT
 TCGGAGGAGTATGATACTTACGTGGACCTTTACTCTAGGGCAGATAGGTACAAACAGATTCACGTGGCCCTATG
 AAGCAGGAGACCCTGCTGTTGACTCAGGTGAGCGACGTGCTGGAGGAACTGGGCTGGAATAGCGTTCCCCTGCAA
 GACGAGGCAAAACCACCTGCTGCCAGGGTGGCCGTGGACAGACTGTATAGGAAAGCCTTCTCAAATGAGGACGTG
 TTCAAAGTGATGAAAGATGAGAGGTGGAGAGGGCGCACAGAAAGCCCTGCCGTGGATATGGTGTCTCAATCAGC
 GACCTCAGCAGGCATGAGGTGCGCTTCCCTTCTGATCATCCCGAAACTCCCCCTGAGGAAAACGAAAGGTT
 AGCCTGCTGGATCCCAGCCTGCCTGGCGCTAGGCCTGTGATCTACAGGTACTCACCCTGCATCCCTATCCCTG
 AATAGCGGCTATTTACGACCTACAACAACGTGTACTACTTTTCTGTGAGCAGGCTGAAAGTGATGTACGCCGGC
 TTCGTGAGGAGTATCCCAGCAAGCCACCATACTACGTGTTCCAACGTGTGTGAAAGACAAGGATGACGGACTT
 AGCGAGGAAGGGCAATCAGATGCATCTACGGGAGAGGCCCTGTCAAACCTGAGCATGGAGACCACCGCCTGGAGC
 TCTTCTGTGCACAATAGCAATGACATGGTGTCTGATGAGTTCAAGCTGCAAGAATTTCTGATAAAGTACCATG
 GAATTCGAAGCTTGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATA
 ACTAGCATAAACCCCTTGGGGCTCTAAACGGGTCTTGAGGGTTTTTTTGTGAAAGGAGGAACTATATCCGGATC
 TGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCG
 CCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTA
 GCGCCCGCTCCTTTGCTTTCTTCCCTTCTTTCTCGCCAGGTTGCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGG
 GGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGTCTTACGGCACCTCGACCCAAAAAATTTGATTAGGGTGATGGTTCA
 CGTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTC
 TTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTTCTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTG
 GCCTATTTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAAACAAAATATTAACGCTTACAATT
 TAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATC
 CGCTCATGAGACAATAACCCGTATAAATGCTTCAATAAATTTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAAATTTCC
 GTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTTCGGCATTTTTGCTTCCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAA
 AAGATGCTCAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAATCGAATCAGGCTCAACAGCGGTAGATCTTGAGA
 GTTTTCGCCCCGAAGACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTCTGCTATGTGCGCGGTATTATCCCCGTA
 TTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGTACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCA
 CAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTG
 CGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATG
 TAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTG
 TAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACGGCAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAG

ACTGGATGGAGGCGGATAAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATA
AATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCCTATCG
TAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCAC
TGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAAT
TTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACT
GAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGC
AAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAA
CTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATAACAAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGA
CTGTAGCACCGCCTACATACTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTC
TTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACAC
AGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTC
CCGAAGGGAGAAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAG
GGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTTTCGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCT
CGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTT
TTGCTCACATGTTCTTTCTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATA
CCGCTCGCCGCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAAC
CGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAG

Sítio de NheI - GCTAGC

Sítio de KpnI - GGTACC

Sítio de XhoI - CTCGAG

Sítio de Sall - GTCGAC

Extremidade amino terminal

Segmentos repetitivos

Extremidade carboxila terminal

Anexo N - Sequência de aminoácidos de rLci12-NT-4R-CT

MRGS **HHHHHH**GMASDITMELEMSTDNDIERQIMMEMEAEISRSQGNRRDPYTNPPPFELSFIEDDPMEAARKAEV
 DRIQREIEERLRRKQQQKQRDSLELSPNCPANEGEMSAVYDSLQQPQNASWPVGAHDRHVVRASLSSESENREKA
 EEASRLRDDEAAMTRRETDEEARIDMEVQVRRSAEIQALRELEAEEQARREAEQARRVAEEQARREAEQARRE
 VDQAGGLEEVLRARAVVMGEFSEKLGHSAAVAFVSDTDEKPVNSASATHRGDARWQNEYTEQGGTGADAEHEH
 GVQQHDSRCCRYRTSSPSVSDRDMRSERSTNSKDSASETVSRYSLSTLEAIRNDNGILSRTEEEVYYVPRVTKEA
 PFESFEEALS AELKAHGLTEDAIRRSCIEVHRYGTIRESGKCLFPPREVTGEVPAHGKVQLGFFSAKQTIIALQR
 PLRKPNDREPERCEPGERSLSTLKYFESEVLSDHTLTVDDYDYPHNAPTERLLTKAQLMRGDNAMVRKAVSQIS
 YGDP IQVWERAAQONSTAADAAATESTAAANLWSDIDTRKPVPMRTFTGGFVYCIKATKISNRVIELHGASTDPL
 VIAAALYSWTERQKVKVSETFYFDSELDIFYPQKERSELAQKNQVAFVPNEFKGTLHLVMRVYRPCCEEYDTYV
 DLYSRADRYKQIHVAPMKQETLLLTQVSDVLEELGWNSVPLQDEANHLLPRVAVDRLYRKAFSNEDVFKVMKDER
 WRGAQKALPVDVMSISDLSRHEVAFPSDHPETPPEENESKVSLLDPDLPGARPVIYRSPCCIPILNSGYFTTY
 NNYYFVSRLKVMYAGFVRSIPASHHTYVFQLCVKDKDDGLSEGAIRCIYGRGLSNLSMETTAWSSSVHNSND
 MVLSDEFKLGQEF **---**

M - Códon de iniciação
HHHHHH - Cauda de histidina
--- - Códon de parada

Anexo O - Sequência de nucleotídeos de *pRSETA-Lci12-NT-CT*

GATCTCGATCCCGCAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGT
 TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATG**GCTAGC**GATATCACC
 ATGGAA**CTCGAC**ATGAGCACCAGACAACGACATTGAGAGGCAGATCATGATGGAGATGGAGGCAGAGATCAGCAGG
 TCACAGGGAAACAGGCGTGACCCCTACACCAATCCCCCCCCCTCGAGCTGAGCTTCATCGAGGATGACCCCTATG
 GAGGCAGCCAGGAAGGCAGAAGTGGACAGGATCCAGAGAGAAATCGAGGAGAGGCTGAGGAGGAAACAACAGCAG
 AAGCAGCGAGACAGCCTGGAGCTGAGTCTAACTGCCCGCTAACGAGGGAGAGATGAGTGCCGCTCTACGACAGC
 CTGCAACAGCCCCAAAACGCCAGCTGGCCAGTGGGAGCTCACGATAGGCACGTTGGTGAGGGCAAGCCTGAGCTCC
 GAGAGCGAGAATAGAGAGAAAAGCTGAAGAGGCCAGCCGACTGAGGGACGACGAGGCTGCCATGACACGGAGGGAA
 ACTGACGAAGAGGCCAGGATCGATATGGAAGTCCAGGTGAGGAGAAGTGCCGAGATTCAGGCAC**TGCGTGAGCTC**
GAGGTCGACCAGGCCGGAGGCTGGAGGAGGTGTTGCGAGAGGCCAGGGCTGTCTGTATGGGCGAGTTCTCCGAG
 AAGCTGAAGCAACACAGTGTCTGTGGCTGCCCTCGTGAGTGACACAGACGAGAAAACCCGTGAATAGCGCCTCAGCA
 ACTCACAGAGGGGACGCCAGGTGGCAGAACGAGTACACTGAACAAGGGGGAAC**TGGAGCAGACGCCGAGGAAGAG**
 CATGGCGTGCAACAGCAGATAGCAGGTGCTGCCGCTACCGAACGAGCAGTCCAAGCGTGAGTGACAGAGATATG
 AGATCAGAACGTTCTACTAACAGCAAAGACTCAGCCAGGAAACAGTGAGCAGGTATAGCCTGAGCACCCCTGAG
 GCCATTAGGAACGACAACGGGATCCCTGTCCCGTACCGAGGAGGAGGTGTACTACGTCCCCAGGGTGACCAAGGAA
 GCCCCATTTCGAGAGCTTTGAAGAGGCCTTGAGTGCCGAAC**TGAAAGCACACGGGCTGACTGAGGACGCCATCCGG**
 AGGAGCTGCATTGAGGTTACAGGTACGGAAACCATCAGGGAGAGCGGCAAGTGCCTGTTCCACCCCGGGAGGTC
 ACGGGCGAGGTCCCCGCACACGGAAAAGTGCAGCTGGGCTTCTTCAGCGCTAAGCAAACAATCATTGCCCTGCAG
 AGGCCCTTAGGAAGCCAAAACGCCAGCCGAGAACGACCCTGCGAGCCAGGCGAACGAAGCCTGTCAACCCTCAAG
 TGTTACTTTGAGAGCGAAGTGTGAGCGACCATACGCTGACCGTGGACGACGAAGACTATCCCCATAACGCCCT
 ACCGAACGACTCCTGACCAAGGCCAGCTGATGAGAGGGGACAACGCCATGGTGAGGAAAGCTGTTAGCCAGATC
 AGCTATGGGGACCAATTCAGGTGTGGGAAAGAGCCAGCAGAATAGCACCGCTGCCGACGAGGCTGCCACCGAG
 AGCACTGCCGCAATCTGTGGTGTGAGCGACATTGACACCCGGAAGCCTGTGCCTGCCATGAGGACGTTTACCGGC
 GGATTTCGTCTACTGTATCAAGGCAACAAAGATCAGCAATAGGGTGATCGAACTGCACGGAGCCAGCACAGACCCT
 TTGGTGATCGCCGAGCCCTTTACTCATGGACGGAAAGACAGAAAGTGAAGTGTAGCGGAGACCTTCTACTTCGAT
 AGCGAATTGGACATCTTCTACCCTCAGAAGGAGAGGAGTGAGCTGGCTAAGAAGAATCAGGTCTGGCATTTCGTG
 CCAAATGAGTTTAAAGGCACACTGCATCTCGTTCATGAGGGTGTACCGTCCCTGTTGCGAGGAGTATGATACTTAC
 GTGGACCTTTACTCTAGGGCAGATAGGTACAAACAGATTACAGTGGCCCCATGAAGCAGGAGACCCTGTCTGTG
 ACTCAGGTGAGCGACGTGCTGGAGGAAC**TGGGCTGGAATAGCGTTC**CCCCTGCAAGACGAGGCAAACCACCTGTG
 CCCAGGGTGGCCGTGGACAGACTGTATAGGAAAGCCTTCTCAAATGAGGACGTGTTCAAAGTGTAAAGATGAG
 AGGTGGAGAGGCGACAGAAAGCCCTGCCTGTGGATATGGTGTCTCAATCAGCGACCTCAGCAGGCATGAGGTC
 GCCTTCCCTTCTGCATCCCCGAAACTCCCCCTGAGGAAACGAAAGGTTAGCCTGTGGATCCCCGACCTG
 CCTGGCGCTAGGCCTGTGATCTACAGGTACTCACCCCTGTGCATCCCTATCCTGAATAGCGGCTATTTACGACC
 TACAACAACGTGTACTACTTTTCTGTGAGCAGGCTGAAAGTGTATGTACGCCGGCTTCGTGAGGAGTATCCCAGCA
 AGCCACCATACTACGTGTTCCAACCTGTGTGTGAAAGACAAGGATGACGGACTTAGCGAGGAAGGGGCAATCAGA
 TGCATCTACGGGAGAGGCTGTCAAACCTGAGCATGGAGACCACCGCCTGGAGCTTCTGTGCACAATAGCAAT
 GACATGGTGTCTGATGAGTTC**CAAGCTGCAAGAA**TTCTGATAA**AGTAC**ATGGAATTCGAAGCTTGATCCGGC
 TGCTAACAAAGCCCGAAGGAAGCTGAGTTGGCTGTGCCACCCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGC
 CTCTAAACGGGTCTTGAGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAAC**TATATCCGGATCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCC**
 CGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGC
 GCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTC
 TTCCCTTCCCTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGA
 TTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAA**ACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGA**
 TAGACGGTTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTC**CAAACCTGGAACAACA**
 CTCAACCCTATCTCGGTCTATCTTTT**GATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCCGGCTATTTGGTTAAAAAATGAG**
 CTGATTTAAACAAAAATTTAACCGGAATTTTAAACAAAATATTAACGCTTACAATTTAGGTGGCACTTTTCCGGGAA
 ATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCT
 GATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTTCCCTTT
 TTGGCGCATTTTGCCTTCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGG
 GTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTT
 TTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAAC
 TCGGTGCGCCGATACACTATTTCTCAGAA**TGACTTGGTTGAGTACTCACCAAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATG**
 GCATGACAGTAAGAGAATATG**CAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCA**ACTTACTTCTGACAA
 CGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTA**ACTCGCCTTGATCGTTGGG**
 AACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCGTGTAGCAATGGCAACAACGTTGC
 GCAAAC**TATTA**ACTGGCGAACTACTTACTTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAG
 TTGCAGGACCACTTCTGCCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTG

GGTCTCGGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGA
GTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGT
CAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGA
TCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAA
AGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTAC
CAGCGGTGGTTTTGTTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACGGCTTCAGCAGAGCGCAGA
TACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACCTTCAAGAACTCTGTAGCACCAGCTACATACC
TCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGAC
GATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGA
CCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACA
GGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTT
ATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTAT
GGAAAAACGCCAGCAACGCGCCTTTTTACGGTTCCCTGGCCTTTTGTGCTGGCCTTTTGTGCTCACATGTTCTTTCTG
CGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGA
CCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGC
CGATTCATTAATGCAG

Sítio de NheI - GCTAGC

Sítio de KpnI - GGTAAC

Sítio de XhoI - CTCGAG

Sítio de Sall - GTCGAC

Extremidade amino terminal

Extremidade carboxila terminal

Anexo P - Sequência de aminoácidos de rLci12-NT-CT

MRGS **HHHHHH**GMASDITMELEMSTDNDIERQIMMEMEAEISRSQGNRRDPYTNPPPFELSFIEDDPMEAARKAEV
 DRIQREIEERLRRKQQQKQRDSLELSPNCPANEGEMSAVYDSLQQPNASWPVGAHDRHVVRASLSSESENREKA
 EEASRLRDDEAAMTRRETDEEARIDMEVQVRRSAEIQALRELEVDQAGGLEEVLRARAVVMGEFSEKQKQHSV
 AAFVSDTDEKPVNSASATHRGDARWQNEYTEQGGTGADAEHGVQGHDSRCCRYRTSSPSVSDRDMRSESTNS
 KDSASETVSRYSLSTLEAIRNDNGILSRTEEEVYVPRVTKEAPFESFEEALSDELKAHGLTEDAIRRSCIEVHR
 YGTIRESGKCLFPPREVTGEVPAHGKVLGFFSAKQTIIALQRPLRKNADRERPCEPGERSLSTLKYFSEVLE
 SDHTLTVDDYDYPHNAPTERLLTKAQLMRGDNAMVRKAVSQISYGDPIQVWERAAQNSTAADEAATESTAAANLWV
 SDIDTRKVPVAMRTFTGGFVYCIKATKISNRVIELHGASTDPLVIAAALYSWTERQKVKVSETFYFDSELDIFYP
 QKERSELAKKQVVAFPNEFKGTLHLVMRVYRPCCEEYDLYVDLYSRADRYKQIHVAPMKQETLLLTQVSDVLE
 ELGWNSVPLQDEANHLLPRVAVDRLYRKAFSNEVFKVMKDERWRGAQKALPVDVMSISDLSRHEVAFPSDHP
 TPPEENESKVSLLDPDLPGARPVYRYSPCCIPILNSGYFTTYNNVYFVSVSRKVMYAGFVRSIPASHHTYVFQ
 LCVKDKDDGLSEEGAIRCIYGRGLSNLSMETTAWSSSVHNSNDMVLSEDFKLQEF **---**

M - Códon de iniciação

HHHHHH - Cauda de histidina

--- - Códon de parada

