

UNIVERSIDADE DE UBERABA
GUILHERME CAETANO GARCIA

DESENVOLVIMENTO DE TESTE IMUNOENZIMÁTICO ELISA PARA DIAGNÓSTICO
DA TRIPANOSOMÍASE BOVINA UTILIZANDO PROTEÍNA RECOMBINANTE DE
Trypanosoma vivax

UBERABA, MG

2016

GUILHERME CAETANO GARCIA

DESENVOLVIMENTO DE TESTE IMUNOENZIMÁTICO ELISA PARA DIAGNÓSTICO
DA TRIPANOSOMÍASE BOVINA UTILIZANDO PROTEÍNA RECOMBINANTE DE
Trypanosoma vivax

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos, do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade de Uberaba.

Orientadora: Profa. Dra. Joely Ferreira Figueiredo Bittar.

UBERABA, MG

2016

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

G165d Garcia, Guilherme Caetano.
Desenvolvimento de teste imunoenzimático Elisa para diagnóstico da tripanosomíase bovina utilizando proteína recombinante de *Trypanosoma vivax* / Guilherme Caetano Garcia. – Uberaba, 2016.
61 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Medicina Veterinária, concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação, 2016.

Orientadora: Profa. Dra. Joely Ferreira Figueiredo Bittar.

1. *Trypanosoma vivax*. 2. Proteína. 3. Teste imunoenzimático. 4. Diagnóstico. I. Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Medicina Veterinária, concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação. II. Título.

CDD 614.533

GUILHERME CAETANO GARCIA

DESENVOLVIMENTO DE TESTE IMUNOENZIMÁTICO ELISA PARA DIAGNÓSTICO
DA TRIPANOSOMÍASE BOVINA UTILIZANDO PROTEÍNA RECOMBINANTE DE

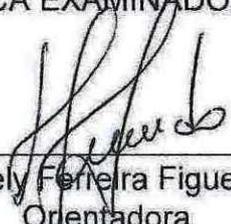
Trypanosoma vivax

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba.

Área de concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos

Aprovada em: 01/07/2016.

BANCA EXAMINADORA:



Prof.ª. Dr.ª. Joely Ferreira Figueiredo Bittar
Orientadora
Universidade de Uberaba



Prof. Dr. Eustáquio Resende Bittar
Universidade de Uberaba



Prof. Dr. Daniel Menezes Souza
Universidade Federal de Minas Gerais

“Senhor,

Fazei-me instrumento de vossa paz.

Onde houver ódio, que eu leve o amor.

Onde houver ofensas, que eu leve o perdão.

Onde houver discórdia, que eu leve união.

Onde houver dúvidas, que eu leve a fé.

Onde houver erros, que eu leve a verdade.

Onde houver desespero, que eu leve a esperança.

Onde houver tristezas, que eu leve a alegria.

Onde houver trevas, que eu leve a luz.

Mestre, fazei que eu procure mais:

consolar que ser consolado,

compreender que ser compreendido,

amar que ser amado.

Pois é dando que se recebe,

é perdoando que se é perdoado,

e é morrendo que se vive para a vida eterna.”

S. Francisco de Assis

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por todas as vitórias e por me dar a certeza de nunca estar só, e Nossa Senhora da Medalha pela intercessão de mãe, sempre constante.

Aos meus amados pais, Antonio José Garcia e Sueli Maria Caetano Garcia, por tudo que fazem por mim. Sem vocês, nada disso seria possível. Se hoje me torno mestre, é fruto da educação virtuosa que vocês me deram. O mundo seria muito melhor se houvessem mais pessoas como vocês. Minha eterna gratidão e amor.

À minha irmã Carolina Caetano Garcia e meu cunhado Savio Gonçalves dos Santos, pelos bons momentos e ensinamentos.

Agradeço também a toda a minha família pelo apoio, amor, incentivo e pelas palavras sempre gentis, e de modo singular à madrinha Marília Andréia Vaz, Hugo Leandro Pereira Vaz e Mayara Vaz, que se tornaram minha segunda família em Belo Horizonte, dando a mim todo o suporte, apoio e força que precisava durante minhas estadas e realização dos experimentos.

Aos professores que apoiaram a minha escalada até aqui. De modo particularmente especial à professora Dra. Joely Ferreira Figueiredo Bittar, que mais que orientadora, tornou-se uma amiga, mostrando-me diariamente como ser o tipo de profissional que queria me tornar, preocupando-se não apenas em formar e orientar um aluno pós-graduando, mas me estimulando a buscar o melhor também como pessoa. Não existem palavras para expressar tamanha gratidão a tudo que fez por mim. Agradeço também ao professor Dr. Eustáquio Resende Bittar pela exemplar conduta de líder, especialmente em relação aos que obstruem. Desejo mais profissionais como vocês para a nossa profissão e para a comunidade acadêmica.

Ao professor Dr. Daniel Menezes Souza, pela grande ajuda durante a realização do trabalho, também à sua equipe que não mediu esforços: Ana Maria Carvalho, Daniela Pagliara, Fernanda Fonseca, Letícia Lage, Lourena Costa, Marcella Rezende, Mariana Costa e Vívian Tamietti, contribuindo com a realização dos experimentos e proporcionando bons momentos de convivência dentro do laboratório.

Agradeço também aos doutores Olindo Assis Martins Filho, Márcio Sobreira Silva Araújo, Matheus Fernandes Costa e Silva e Thiago Antonio de Oliveira Mendes, pela contribuição de grande valia neste trabalho.

Agradeço à Universidade de Uberaba, onde também sou formado, e ao programa de Mestrado em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos, pela significativa oportunidade de crescimento.

Aos amigos que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho, também aos meus colegas mestrandos e mestres: Camila Cristina, Carlos Henrique Cavallari, Dênia Monteiro, Francielle de Sousa, Luiz Fernando Vaz, Raphaela Ribeiro, Renata Teixeira, Marco Aurélio Lima, Maritssa Caetano, Patrícia Peralta, Taís Maciel Afonso e a todos os colaboradores do Hospital Veterinário de Uberaba, por toda ajuda durante o mestrado.

Aos alunos de Iniciação Científica: Daniela Paiva, Fernanda Faria, Guilherme Sousa, Lucas Petsolt, Luciano Konrad, Maria Laura Teixeira, Natália Pinheiro e Otoniel Rodrigues.

À CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa, que foi de grande ajuda durante o percurso do mestrado.

Enfim, a todos que colaboraram com a minha caminhada até aqui, pelo convívio, pelos ensinamentos, pela ajuda, pelas palavras, e por acreditarem. Do fundo do coração, meu muito obrigado.

RESUMO

A tripanosomíase é causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma vivax* e acomete ungulados domésticos e selvagens. Estima-se que animais infectados contribuam com uma perda anual de 160 milhões de dólares, devido a redução na produção de leite e carne, perda de escore corporal, dificuldades na reprodução, abortos e em muitos casos, morte. O patógeno causa sintomatologia clínica que pode ser similar a outras patologias que acometem bovinos, portanto o diagnóstico deve ser preciso e não erroneamente diagnosticado como uma doença com sintomatologia similar. O objetivo do presente trabalho foi obter proteína recombinante do *Trypanosoma vivax* e padronizar um teste ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay), para diagnóstico da tripanosomíase bovina com maior sensibilidade e especificidade. Uma proteína foi selecionada por meio de análise por bioinformática, produzida de forma recombinante, expressa, purificada e utilizada na padronização do ELISA. Inicialmente, diferentes concentrações de proteína recombinante (1, 10, 100 e 1000 nanogramas) foram testadas, bem como diferentes diluições de *pool* de soros positivos de animais experimentalmente infectados e negativos (1:100, 1:250 e 1:500) e diferentes diluições de conjugado anti-IgG marcado com peroxidase (1:5000, 1:10000 e 1:20000). Após a padronização, foi realizado o teste utilizando-se amostras de bovinos infectados experimentalmente por *T. vivax* nos dias 0, 21, 24, 27 e 30 pós-infecção experimental. A maior diferença de densidade ótica entre animais positivos e negativos foi observada utilizando-se 1000 nanogramas de proteína recombinante, soro na diluição de 1:100 e conjugado na diluição de 1:5000. Após analisar as densidades óticas, foi realizada a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) e estabelecido um ponto de corte de 0,04. O teste apresentou acurácia de 98,6%, sensibilidade de 94,4% e especificidade de 100%. Valor preditivo positivo e valor preditivo negativo foram 100% e 93,3%, respectivamente. A razão de verossimilhança negativa e positiva foram de 0,06 e $+\infty$, respectivamente. A padronização se mostrou adequada com a quantidade utilizada de proteína recombinante de 1000 nanogramas, diluição de soros de 1:100 e diluição de conjugado de 1:5000. Sensibilidade e especificidade obtidos com soro de animais infectados experimentalmente são promissores e destacam o potencial da proteína recombinante para diagnóstico preciso da tripanosomíase bovina.

Palavras-chaves: *Trypanosoma vivax*, proteína recombinante, diagnóstico

ABSTRACT

Tripanosomiasis is caused by the hemoflagellate protozoan *Trypanosoma vivax* and affects domestic and wild ungulates. It is estimated that infected animals can contribute to an estimated annual loss of 160 million dollars, due to decrease in milk and meat production, loss of body condition, difficulties in reproduction, abortion, and in many cases death. The pathogen causes clinical symptoms that can be similar to other pathologies that affect bovines, therefore, the diagnosis must be precise and not misdiagnosed to a disease with similar symptoms. The objective of this present study was to obtain recombinant protein from *Trypanosoma vivax* and standardize an ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay), for the diagnosis of bovine tripanosomiasis with higher sensitivity and specificity. A protein was selected via bioinformatics analysis, recombinantly produced, expressed, purified and used in ELISA padronization. Initially, different concentrations of recombinant protein (1, 10, 100 and 1000 nanograms) were tested, as well as different dilutions of sera pool of positive animals experimentally infected and negative (1:100, 1:250 e 1:500), and different dilutions of conjugate anti-IgG marked with peroxidase (1:5000, 1:10000 and 1:20000). After padronization, the test was performed using samples from bovines experimentally infected with *T. vivax* on days 0, 21, 24, 27 and 30 after experimental infection. The highest difference of optical density among positive and negative animals was observed using 1000 nanograms of recombinant protein, sera dilution of 1:100 and conjugate dilution of 1:5000. After optical density analysis, a Receiver Operating Characteristic (ROC) curve was done and a cut-off of 0,04 was established. The test showed accuracy of 98,6%, sensibility of 94,4% and specificity of 100%. Predicted positive and negative values were respectively 100% e 93,3%. Negative and positive likelihood ratio were respectively 0,06 e $+\infty$. Standardization showed adequate with the used amount of recombinant protein of 1000 nanograms, sera dilution of 1:100 and conjugate dilution of 1:5000. Sensitivity and specificity results obtained using sera of experimentally infected animals were promising and show the potential of the recombinant protein for the precise diagnose of bovine tripanosomiasis.

Key-words: *Trypanosoma vivax*, recombinant protein, diagnosis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Formas tripomastigotas de <i>T. vivax</i> detectadas pelo exame de <i>Buffy coat</i> . Aumento de 100x.....	16
Figura 2: Ciclo biológico do <i>T. vivax</i> na mosca Tsé-tsé e nos ruminantes na África.....	17
Figura 3: Mapa do vetor PGE®T.....	30
Figura 4: Mapa do vetor pET28a-TEV.....	31
Figura 5: Distribuição de proteínas de <i>T. vivax</i> com potenciais epítomos lineares de célula B, de superfície/secretadas e expressas em tripomastigotas.....	36
Figura 6: Proteína hipotética específica de <i>T. vivax</i> (TvY486_0012280) com epítomos lineares de célula B e com potencial aplicação para o imunodiagnóstico.....	36
Figura 7: Análise dos produtos de PCR gerados na etapa de clonagem.....	37
Figura 8: Expressão e purificação da proteína recombinante separada por gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5%.....	38
Figura 9: Perfil de absorvância do <i>pool</i> de soros de animais aos 30 dias pós-infecção frente a diferentes concentrações de proteína recombinante TvY486_0012280, diferentes diluições de soro e diferentes diluições do conjugado.....	39
Figura 10: Curva ROC da padronização de ELISA testando a proteína recombinante de <i>T. vivax</i> TvY486_0012280 para diagnóstico da tripanosomíase bovina.....	40
Figura 11: Valores de densidade ótica dos animais ao dia 0 e dias 21, 24, 27 e 30 pós-infecção.....	40
Figura 12: Desempenho do teste ELISA para <i>T. vivax</i> utilizando a proteína recombinante TvY486_0012280.....	41
Figura 13: Razão de verossimilhança entre animais positivos e negativos.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores obtidos com a proteína recombinante purificada TvY486_0012280 para padronização de ELISA.....	42
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

BCT	-	<i>Buffy Coat Technique</i>
BSA	-	<i>Bovine Serum Albumin</i>
DNA	-	Ácido Desoxirribonucléico
DO	-	Densidade Ótica
DPI	-	Dias Pós-Infecção
E	-	Especificidade
ELISA	-	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FN	-	Falso Negativo
FP	-	Falso Positivo
GC	-	Grupo Controle
GI	-	Grupo Infectado
IC	-	Intervalo de Confiança
IPTG	-	Isopropil β -D-1-thiogalactopiranosídeo
IR	-	Índice de Reatividade
KDa	-	Kilo Daltons
kg	-	Quilogramas
LVC	-	Leishmaniose visceral canina
MHCT	-	<i>Microhaematocrit Centrifugation technique</i>
M	-	Molar
mL	-	Mililitros
mM	-	Milimolar
ng	-	Nanogramas
NMWL	-	<i>Nominal Molecular Weight Limit</i>
PBS	-	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PG	-	Picogramas
RIFI	-	Reação de Imunofluorescência indireta
RNA	-	Ácido Ribonucléico
ROC	-	Receiver Operating Characteristic
RPM	-	Rotações por minuto
RVP	-	Razão de Verossimilhança Positiva
RVN	-	Razão de Verossimilhança Negativa
S	-	Sensibilidade
SDS-PAGE	-	<i>Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide gel electrophoresis</i>

TEMED	-	<i>Tetramethylethylenediamine</i>
VN	-	Verdadeiros Negativos
VP	-	Verdadeiros Positivos
VPN	-	Valor Preditivo Negativo
VPP	-	Valor Preditivo Positivo
μL	-	Microlitros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 PARASITO <i>Trypanosoma vivax</i>	16
2.2 A DOENÇA: TRIPANOSOMÍASE BOVINA	18
2.3. DIAGNÓSTICO.....	19
2.3.1 Testes Diretos.....	19
2.3.2 Testes Sorológicos.....	21
2.3.3 Testes Moleculares	22
2.4 PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	23
3. OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVO GERAL.....	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 PRODUÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE DE <i>T. vivax</i>	27
4.1.1 Obtenção dos dados de proteínas do parasito <i>T. vivax</i>	27
4.1.2 Predição de epítomos lineares de célula B.....	27
4.1.3 Predição de proteínas de superfície/secretadas.....	28
4.1.4 Identificação de proteínas altamente expresas em formas tripomastigotas sanguíneas.....	28
4.1.5 Extração de DNA e desenho dos iniciadores (primers)	28
4.1.6 Amplificação e purificação da região codificadora.....	29
4.1.7 Clonagem dos genes purificados no vetor pET28a-TEV.....	29
4.2 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	32
4.3 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	32
4.4 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE.....	33
4.5 ENSAIO E DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	33
4.6 BANCO DE SOROS	33
4.7 PADRONIZAÇÃO DO TESTE IMUNOENZIMÁTICO ELISA.....	34
5. RESULTADOS	36
5.1 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ANTIGÊNICAS, PREDIÇÃO DE EPÍTOMOS E SELEÇÃO DE ALVOS.....	36
5.2 CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE (TvY486_0012280) EM <i>E. coli</i> BL-21 ARCTIC EXPRESS	

(DE3).....	37
5.3 EXPRESSÃO DE PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE <i>T. vivax</i> (TvY486_0012280) EM <i>E. coli</i> BL-21 ARCTIC EXPRESS (DE3) E PURIFICAÇÃO EM COLUNA CROMATOGRÁFICA His-Tag SEGUIDO DE GEL FILTRAÇÃO EM COLUNA TM-200.....	38
5.4 PADRONIZAÇÃO DO TESTE IMUNOENZIMÁTICO ELISA.....	38
6. DISCUSSÃO.....	43
7. CONCLUSÕES.....	47
8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXO A – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL (UNIUBE).....	56
ANEXO B – COMPROVANTE DE DEPÓSITO DE PATENTE.....	57

1 INTRODUÇÃO

A tripanosomíase é uma enfermidade causada pelo *Trypanosoma (Duttonella) vivax* (Ziemann, 1905), um protozoário hemoflagelado de grande importância e responsável pela doença em espécies de ungulados silvestres e domésticos, principalmente bovinos na África e América Latina (OSÓRIO et al., 2008). Na América Latina, a transmissão ocorre por vetores mecânicos como dípteros sugadores de sangue das famílias Tabanidae (*Tabanus spp.*), Stomoxidinae (*Stomoxys spp.*) e Hippoboscidae (*Hippobosca spp.*), além de transmissão por fômites como agulhas (HOARE, 1972; SERRA-FREIRE e REZENDE, 1988; GARDINER, 1989; SILVA et al., 2002; PAIVA, 2009).

Estudos envolvendo o *T. vivax* têm sido de grande interesse para o Brasil, devido ao impacto negativo que o parasito tem provocado sobre a pecuária, gerando grandes perdas econômicas devido à morte de cerca de três milhões de bovinos anualmente tanto nos países africanos quanto nos países da América do Sul (SEKONI, 1994). Em animais subclínicos, o impacto econômico também é significativo devido à diminuição da produção de carne, leite e derivados, resultando em perda de aproximadamente cinco milhões de dólares/ano (OSÓRIO et al., 2008; CUGLOVICCI et al., 2010).

A doença pode ocasionar em ruminantes infecções agudas, as quais podem resultar em alterações hematológicas severas como leucopenia e anemia, além de sinais clínicos como lacrimejamento, perda de escore corporal, fraqueza progressiva, conjuntivite, febre, letargia, queda na produção de leite e carne, agalaxia e alterações na reprodução como abortos, repetições de cio, nascimentos de crias fracas, anestro temporário ou permanente, e eventualmente morte (GUERREIRO, 2005; OSÓRIO et al., 2008; BEZERRA et al., 2008; CARVALHO et al., 2008; SILVA et al., 2009).

O diagnóstico consiste em exames diretos empregando as técnicas de microhematócrito (WOO, 1970), *buffy coat* (MURRAY, 1977) com confirmação da presença das formas tripomastigotas de *T. vivax* em esfregaços sanguíneos ou por meio de técnicas moleculares (PCR) para a detecção de DNA de *T. vivax* (VENTURA et al., 2001; DESQUESNES; DÁVILA, 2002), além de exames indiretos como testes sorológicos (ELISA, RIFI) para pesquisa de anticorpos anti-*T. vivax* (MADRUGA et al., 2006, AQUINO et al., 2010).

Como a ocorrência da doença crônica em bovinos no Brasil é considerada assintomática, a detecção de tripomastigotas pelos métodos parasitológicos citados anteriormente é dificultada (VENTURA et al., 2001). Por isso, a triagem sorológica e a titulação de anticorpos fornecem informações úteis e complementares aos métodos

parasitológicos, além de avaliar com maior sensibilidade o estado dos rebanhos e os efeitos da infecção sobre a saúde animal, a produtividade e o risco de doença (MATTIOLI; FAYE; JAITNER, 2001). Dentre as dificuldades nos testes sorológicos está a obtenção dos antígenos utilizados por exemplo na RIFI, visto que quase sempre, são antígenos brutos obtidos a partir de sangue de ovinos experimentalmente infectados, o que promove baixa especificidade dos testes devido a reações cruzadas com debris de hemácias, plaquetas e leucócitos presentes (EISLER et al., 1998, REBESKI et al., 1999, SILVA et al., 2002, MAGONA et al., 2003, PILLAY et al., 2013). Desta forma, a busca de novos antígenos do parasito, como por exemplo, proteínas recombinantes, para serem utilizadas como antígeno em testes diagnósticos mais específicos e sensíveis, faz-se necessário.

Neste contexto, o presente trabalho objetivou utilizar a proteína recombinante de *T. vivax* identificada por meio de análise de bioinformática com potencial para uso em teste diagnóstico sorológico, como antígeno na padronização de um novo teste imunoenzimático do tipo ELISA. O desenvolvimento de um teste imunoenzimático de fácil execução, e principalmente com elevada acurácia, irá contribuir na melhoria do diagnóstico da tripanosomíase bovina e conseqüentemente, no controle e prevenção da doença em áreas endêmicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PARASITO *Trypanosoma vivax*

O parasito *T. vivax*, descrito por Ziemann (1905), pertence à secção salivária, família Trypanosomatidae que inclui tripanosomatídeos transmitidos pela saliva de moscas contaminada com o parasito, (HOARE, 1972; STEPHEN, 1986) e ao subgênero *Dutonella*, pois faz a transmissão do tipo inoculativa, ou seja, a transmissão ocorre pelas glândulas salivares dos vetores. Nos vertebrados multiplica-se assexuadamente por fissão binária de forma contínua como tripomastigotas (SILVA et al., 2002).

T. vivax trata-se de um protozoário pleomórfico, e as formas circulantes, tripomastigotas, possuem forma lancetada com corpo alongado e achatado com extremidades afiladas e um cinetoplasto grande pós-nuclear, que por ser maior comparado a outras espécies torna-se uma característica marcante deste protozoário, sendo importante para diagnóstico, facilitando a identificação em esfregaços de sangue periférico (HOARE, 1972). Como organelas principais e identificáveis ao microscópio há ainda o núcleo, corpo basal e flagelo livre, que está sempre presente (Figura 1) (DÁVILA et al., 1997; SILVA et al., 2002; OSÓRIO et al., 2008). Ainda segundo Silva et al., (2002), é característica da movimentação do parasito avançar-se pela extremidade anterior.

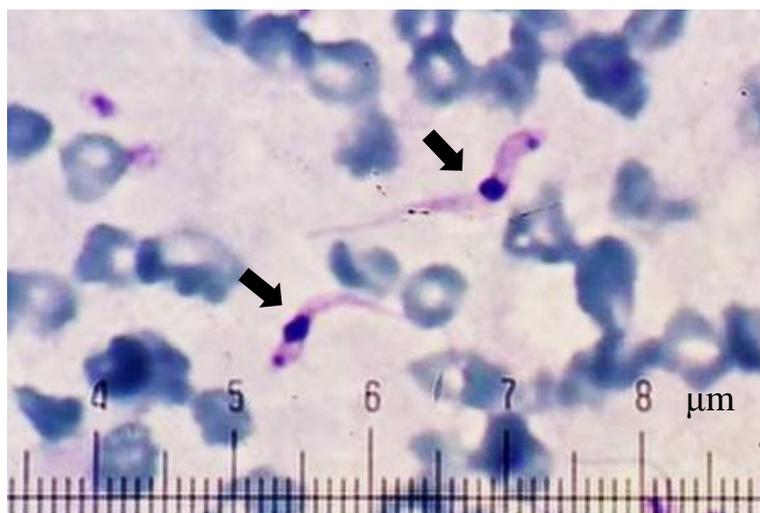


Figura 1: Formas tripomastigotas de *T. vivax* (setas), detectadas pelo exame parasitológico (*Buffy coat*). Aumento de 100x. Coloração: Panótico Rápido.

Fonte: Arquivo pessoal, (2016).

Foi introduzido nas Américas possivelmente durante o século XIX (LEVINE, 1973), sendo o primeiro relato no Brasil nos anos 70 em búfalos do estado do Pará (SHAW; LAINSON, 1972). A incidência de *T. vivax* no Brasil aumenta, corroborada pela falta de conhecimento da enfermidade pelos proprietários e profissionais da área, além da falta de controle e escassez de serviços de diagnóstico especializado (SILVA et al., 2004).

O ciclo biológico do *T. vivax* envolve um hospedeiro invertebrado (vetor), a mosca do gênero *Glossina spp.* (Figura 2), ou vetor mecânico, e um hospedeiro vertebrado que geralmente são os mamíferos ungulados (OSÓRIO et al., 2008). A espécie *Glossina spp.*, conhecida como mosca tsé-tsé estão restritas somente na África tropical e são responsáveis pela forma cíclica de transmissão (MATTIOLI; WILSON, 1996).

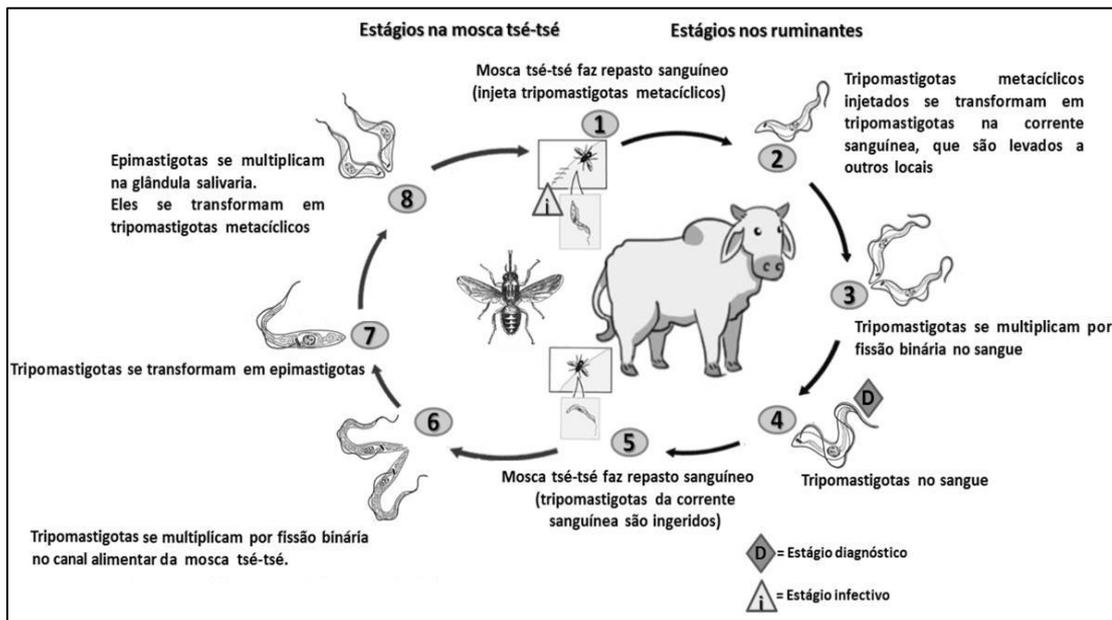


Figura 2: Ciclo biológico do *T. vivax* na mosca Tsé-tsé e nos ruminantes na África.

Fonte: Baral, 2010 adaptado por Bassi, 2014.

A transmissão mecânica na África também pode ocorrer por outros dípteros sugadores de sangue (HOARE, 1972; OSÓRIO et al., 2008), sendo associada à presença de *T. vivax* em regiões onde não existe a mosca tsé-tsé. Por outro lado, na América Latina a transmissão é estritamente mecânica, ou seja, os parasitos são transmitidos por hospedeiros invertebrados, principalmente por moscas hematófagas dos gêneros *Tabanus spp.* (mutuca) e *Stomoxys spp.* (mosca dos estábulos), sem que ocorra desenvolvimento cíclico nestes insetos (SILVA et al., 2002; DESQUESNES, 2004). A transmissão mecânica envolve ainda uso de fômites contaminados com sangue contendo o parasito, principalmente agulhas, usadas muitas vezes para aplicação de medicamentos em vários animais, sem que haja troca. Destaca-se a

aplicação de ocitocina em bovinos de aptidão leiteira anteriormente à ordenha para facilitar a descida de leite (HOARE, 1972; GARDINER, 1989; SILVA et al., 2002; CUGLOVICCI et al., 2010).

É importante ressaltar que os tripanosomas têm mecanismos para evadir a resposta imune do hospedeiro. Uma das características antigênicas dos tripanosomas é a presença das glicoproteínas de superfície (VSGs), que cobrem praticamente toda a membrana e é o antígeno de superfície predominante, que sofre mudanças antigênicas contínuas. Esta variação é um dos mecanismos adaptativos exibidos pelos tripanosomas, que provavelmente protege os parasitos da morte mediada pelo complemento e promove escape dos tripanosomas da resposta imune do hospedeiro (BARAL, 2010).

O parasito tem a capacidade de alterar a expressão de uma VSG para outra, resultando em mutação antigênica, o que faz com que a resposta de anticorpos do hospedeiro contra os tripanosomas seja evitada ou nula em alguns casos. As VSGs são novamente reconhecidas pela resposta imune, e tal mecanismo de escape acaba por provocar oscilações de alta e baixa parasitemia, sendo considerado o principal mecanismo que impede a eliminação do parasito, estabelecendo uma infecção crônica (BARAL, 2010). Além disso, estes parasitos são capazes de internalizar os anticorpos que se ligaram à sua superfície (HILL et al., 2005).

2.2 A DOENÇA: TRIPANOSOMÍASE BOVINA

Trabalhos realizados no Brasil mostraram que a tripanosomíase bovina já é presente nas regiões Sul (SILVA et al., 2009), Sudeste (CARVALHO et al., 2008; CUGLOVICI et al., 2010; CADIOLI et al., 2012), Centro-oeste (SILVA et al., 1999; SILVA et al., 2004), Nordeste (BATISTA et al., 2008; PIMENTEL et al., 2012) e Norte (LINHARES et al., 2006).

Pode ocasionar infecções agudas e crônicas, culminando em alterações hematológicas severas, perda de condição corporal, queda da produtividade (OZÓRIO et al., 2008, SILVA et al., 2009), alterações na reprodução. Sinais clínicos como lacrimejamento, anemia, perda de peso, fraqueza progressiva (SILVA et al., 2009), conjuntivite (GUERREIRO, 2005), febre, letargia, diminuição da produção de leite, agalaxia e morte (CARVALHO et al., 2008; FRANGE, 2013).

Os hospedeiros vertebrados mais comuns nas tripanosomíases causadas por *T. vivax* são os bovinos, bubalinos, ovinos e caprinos (GARDINER, 1989). A infecção por *T. vivax* pode ser classificada em superaguda, aguda ou crônica. A infecção superaguda caracteriza-se por parasitemia alta e persistente, levando o animal a óbito rapidamente dentro de três

semanas após infecção. Já a infecção aguda caracteriza-se por elevada parasitemia associada à diminuição dos parâmetros eritrocitários, levando à anemia, podendo durar entre duas semanas a dois meses após infecção. Na fase crônica, em animais que não morrem, os parâmetros eritrocitários tendem a aumentar (ou até voltar aos parâmetros fisiológicos) em torno de seis a oito semanas, porém ainda observa-se recorrência da parasitemia em baixas concentrações podendo se estender por vários meses ou anos (TAYLOR; AUTHIÉ, 2004).

Estudo retrospectivo feito por Garcia e colaboradores (2016) constatou que a presença da tripanosomíase ocorre mais em fêmeas comparado a machos, assim como em raças leiteiras, fato explicado devido ao maior contato desses animais com agulhas compartilhadas antes da ordenha. Como a relação ordenhador-animal é próxima, a queda na produção desses animais é notada com maior facilidade.

2.3 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico definitivo consiste em exames diretos: técnica microhematócrito (WOO, 1970), *buffy coat* (MURRAY, 1977) com confirmação da presença das formas tripomastigotas de *T. vivax* em esfregaços sanguíneos, em exames indiretos como testes sorológicos (ELISA, RIFI) para observação da presença de títulos de anticorpos anti-*T. vivax* (MADRUGA et al., 2006, AQUINO et al., 2010), ou por meio de técnicas moleculares (PCR) para a detecção de DNA/RNA de *T. vivax* (VENTURA et al., 2001, DESQUESNES; DÁVILA, 2002).

2.3.1 Testes Diretos

Entre os testes parasitológicos, ou diretos, a técnica do microhematócrito (MHCT), proposta por Woo (1970) é uma das amplamente utilizadas entre os métodos parasitológicos, sendo um teste de fácil execução, consistindo em observar em microscópio óptico, ao aumento de 10 vezes a motilidade das formas tripomastigotas entre a camada de leucócitos e a de plasma, dentro do próprio microtubo hematócrito. Esta técnica permite a detecção de tripanosomas de seis a dez dias pós-infecção. Porém, pesquisa de *T. vivax* pela técnica de *Buffy coat* (BCT), que consiste em colocar a camada leucocitária do microtubo hematócrito em esfregaço sanguíneo (MURRAY, 1977), possui vantagens sobre outras técnicas convencionais utilizados para o diagnóstico da tripanosomíase (DESQUESNES; TRESSE, 1996; MATTIOLI; FAYE; JAITNER, 2001; DELAFOSSE et al., 2006). De acordo com

Murray (1977), esta técnica detectou 50% mais casos de infecção por tripanosoma quando comparadas com a técnica MCHT.

Outra vantagem é a facilidade e rapidez do reconhecimento dos tripanosomas, tornando os exames mais práticos, especialmente quando se avalia um grande número de amostras (MURRAY, 1977). Além disso, ainda permite a identificação de outras espécies de *Trypanosoma* spp. quando utilizadas técnicas de biometria em conjunto (MAGONA; WALUBENGO; ODIMIN, 2008). A desvantagem desta metodologia é que as amostras devem ser analisadas rapidamente, até 8 horas após a colheita, pois após esse tempo a quantidade de tripomastigotas detectáveis na amostra reduz (GÓMEZ-PIÑERES; TAVARES-MARQUES; REYNA-BELLO, 2009).

A ocorrência de doença crônica e assintomática em bovinos no Brasil dificulta a detecção de *T. vivax* pelos métodos parasitológicos, uma vez que as formas tripomastigotas não ficam na circulação (VENTURA et al., 2001). Por isso, a triagem sorológica e a titulação de anticorpos podem ser úteis, fornecendo informações importantes e complementares às obtidas pelos métodos parasitológicos, além de avaliar com mais sensibilidade o estado dos rebanhos infectados por *T. vivax* e considerar os efeitos da infecção sobre a saúde animal e produtividade (MATTIOLI; FAYE; JAITNER, 2001).

Como também ocorrem flutuações da parasitemia, o encontro de parasitos em esfregaços sanguíneos em fases crônicas da doença se torna difícil (MURRAY, 1977). No entanto, ambas as técnicas apresentadas anteriormente têm baixa sensibilidade quando aplicada durante a fase crônica da doença, e a sensibilidade diminui consideravelmente quando a parasitemia é inferior a 200 tripomastigotas/mL de sangue (DESQUESNES; TRESSE, 1996).

A técnica de *Buffy-Coat* (BCT) é um teste bastante útil para avaliar a parasitemia em estudos experimentais pela infecção por *T. vivax* em bovinos (ADAMU et al., 2007) e para estudos epidemiológicos. Batista et al., (2012) avaliaram 158 vacas leiteiras e diagnosticadas por BCT em animais de três fazendas, com prevalências de 13,3% a 46,6%, sendo associada diretamente com as alterações clínicas como febre e diminuição do volume globular, indicando animais em fase aguda da doença. Magona e colaboradores (2008), realizaram estudos epidemiológicos utilizando as técnicas BCT e MHCT em conjunto, para avaliar a positividade do rebanho e identificar as tripomastigotas, pois na África haviam encontrado tripomastigotas de *T. congolense* nas amostras de sangue.

2.3.2 Testes Sorológicos

As técnicas sorológicas mais utilizadas para a detecção de anticorpos anti-*T. vivax*, atualmente são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA). Ambos os testes podem ser utilizados para o diagnóstico de infecção e são úteis para investigações epidemiológicas, especialmente para a determinação da distribuição de *T. vivax* (MADRUGA et al., 2006).

Luckins (1977), avaliou o potencial de um ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando a cepa TREU1223 de *T. vivax*, para o diagnóstico de tripanosomíase bovina. Os antígenos utilizados nos experimentos apresentados neste documento foram capazes de diagnosticar animais com tripanosomíase, mas foram incapazes de distinguir se a infecção era causada por *T. brucei*, *T. congolense* ou *T. vivax*.

Trabalho realizado por Madruga et al., (2006), descreve um ensaio de ELISA utilizando um antígeno bruto, da cepa GCTvPPO1-CO a partir de um isolado *T. vivax* brasileiro, obtidos através de técnicas de centrifugação e purificação. O teste realizado, apresentou alta sensibilidade, porém apresentou reação cruzada com animais infectados com *T. evansi*. As reações cruzadas eram esperadas neste caso, já que antígenos brutos de tripanosomas possuem pouca especificidade quanto aos seus subgêneros.

Embora a presença de anticorpos não signifique necessariamente uma infecção ativa, uma vez que essas moléculas persistem após a recuperação, as correlações positivas entre os resultados parasitológicos por BCT e a presença sorológica de anticorpos anti-*trypanosoma vivax*, tal como avaliado pelos diferentes sistemas de testes sorológicos, têm sido relatadas até os 90 dias pós infecção (MATTIOLI; FAYE; JAITNER, 2001; DELAFOSSE et al., 2006; BASSI, 2014).

Dellafosse et al., (2006) estudaram a prevalência em uma região da África sem a presença do vetor cíclico, e pelo teste de ELISA, observaram que 42,3% dos bovinos eram positivos para anticorpos anti-*T. vivax*, mesmo com BCT menor que 2%. A elevada prevalência mesmo na ausência de tsé-tsé ocorreu devido à transmissão mecânica pela presença de tabanídeos, e o clima favorável para o aumento da população de tais vetores, verificando-se alta mortalidade devido à infecção. Também notou-se que o hematócrito nos animais positivos era significativamente menor que nos não infectados. Foi observado ainda que as infecções persistentes podem também ocorrer como resultado da utilização indiscriminada de drogas tripanocidas ou com a subdosagem frequente em animais infectados, levando a resistência do parasita ao medicamento.

Segundo estudos realizados por Cadioli et al., (2012), 98,36% (599/609) das amostras de soro colhidas de vacas em uma fazenda em Lins-SP, apresentaram títulos positivos para IgG anti-*T. vivax* pelo teste de ELISA e menos de 1% foi positivo para o MHCT. Grande parte dos animais apresentaram sinais clínicos, ocorrendo 31 óbitos. A alta frequência de anticorpos ocorreu devido à transmissão do hemoparasito por vetores mecânicos, mesmo com o rebanho em bom estado nutricional. Os animais susceptíveis apresentavam doença grave e de alta mortalidade.

Em contrapartida, trabalho realizado por Cuglovici et al., (2010) realizou um levantamento epidemiológico na região de Igarapé-MG, utilizando testes parasitológicos (MHCT), molecular como reação em cadeia da polimerase (PCR) e sorológico (RIFI). No teste de RIFI para observar a soroprevalência verificou que, no período de setembro de 2007 a fevereiro de 2009, houve aumento na soropositividade de 7,4% para 48%, indicando novos casos no rebanho. Observou-se ainda que de fevereiro a outubro de 2008 a titulação de anticorpos IgG anti-*T. vivax* aumentou, sugerindo aumento do caso de infecção ativa. Entretanto, a maioria dos animais, no final do experimento, apresentaram títulos de anticorpos mais baixos e MHCT negativo, indicando que os mesmos estavam na fase crônica da infecção.

A triagem sorológica e a titulação de anticorpos de animais infectados fornecem informações úteis complementares ao obtido pelos métodos parasitológicos diretos, além de avaliar o estado de rebanhos infectados por *T. vivax* e os efeitos da infecção sobre a saúde animal, a produtividade, dentre outros (MATTIOLI; FAYE; JAITNER, 2001). Os testes sorológicos RIFI para anticorpos circulantes vêm sendo utilizados, mostrando boa sensibilidade (AQUINO et al., 2010).

Porém, um dos obstáculos dos testes sorológicos se refere aos antígenos utilizados, visto que são em sua maior parte antígenos brutos obtidos a partir de sangue de ovinos experimentalmente infectados, o que promove baixa especificidade dos testes sorológicos (EISLER, et al., 1998, REBESKI et al., 1999, SILVA et al., 2002, MAGONA et al., 2003, PILLAY et al., 2013). Portanto, pode-se observar que o desenvolvimento de testes diagnósticos mais específicos se faz necessário.

2.3.3 Testes Moleculares

Os métodos sorológicos são úteis em estudos epidemiológicos, porém, estes usualmente não distinguem o curso da infecção, devido à avidez de IgG em infecções recentes ou progressos nas tripanosomíases, e a sua detecção pela PCR, abre novas perspectivas neste

campo (VENTURA et al., 2001). A PCR teve uma considerável contribuição na identificação, caracterização e diagnóstico molecular de tripanosomas em diversos níveis taxonômicos com precisão e confiabilidade (DESQUESNES; DÁVILA, 2002). Para a identificação do *T. vivax*, são utilizados *primers* direcionados no gene do *mini-exon (spliced leader)* e na região intergênica, com amplificação produto de 210pb (VENTURA et al., 2001).

Embora tenham excelentes resultados, os testes por PCR não são satisfatórios quando há baixa ou nenhuma parasitemia, além do uso em larga escala seja difícil a campo, uma vez exige alto custo em laboratórios equipados, pessoal treinado e reagentes adequados (DÁVILA et al., 2003; OSÓRIO et al., 2008).

2.4 PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Um grande empecilho no que diz respeito ao diagnóstico de diversas doenças está na presença de reações cruzadas, pois nem sempre é possível ter alta especificidade e sensibilidade simultaneamente. Nesse contexto, o uso de proteínas recombinantes pode ser uma alternativa no diagnóstico de doenças endêmicas em testes, como por exemplo, o método ELISA (TEIXEIRA; VEXENAT, 1996).

O emprego de antígenos quimicamente definidos e específicos do parasito, como antígenos recombinantes tem sido proposto como uma alternativa aos antígenos naturais para várias doenças, pois, possuem vantagens no seu uso, uma vez que as proteínas isoladas têm significativo grau de homogeneidade, minimizam reações cruzadas com antígenos presentes em parasitos responsáveis por outras doenças infecciosas (PILLAY et al., 2013).

Desde sua descoberta, a produção de proteínas recombinantes revolucionou a ciência permitindo a obtenção de proteínas purificadas em maior escala, o que facilitou seu uso em processos industriais ou na fabricação de bens comerciais (ROSANO, CECARELLI, 2014).

Apesar dos desafios encontrados, como obtenção de dados da proteína, identificação de proteínas de interesse, dentre outros, estratégias eficientes na produção de proteínas recombinantes têm progredido. Proteínas recombinantes em maiores quantidades e de qualidade são importantes para o avanço tecnológico, além da obtenção de um produto final confiável e que também seja de baixo custo (PALOMARES; ESTRADA-MONDACA; RAMÍREZ, 2004). Algumas das vantagens da produção de proteínas em microorganismos procariontes incluem crescimento rápido do microorganismo e com isso, alta produção de proteínas desejadas (FONSECA, 2013).

A produção de proteínas recombinantes envolve a tecnologia do DNA recombinante. Consiste em escolher um determinado gene de interesse, codificador da proteína de escolha,

clivá-lo e inserí-lo, com o auxílio de DNA ligase em um vetor, geralmente um plasmídeo, molécula dupla de DNA geralmente presente em bactérias, formando assim uma molécula de DNA recombinante. A molécula de DNA recombinante é então inserida em uma bactéria, que irá expressar a proteína desejada. A expressão de proteínas através da tecnologia do DNA recombinante, permite produzir proteínas recombinantes em larga escala. Várias bactérias, fungos e leveduras podem ser utilizados para a produção de proteínas recombinantes. A bactéria gram-negativa *Escherichia coli* foi a primeira a ser utilizada, ainda sendo largamente escolhida para tal propósito, sendo fácil de ser mantida em meios de cultura acessíveis e hábeis a produzir maiores quantidades de proteínas (PALOMARES; ESTRADA-MONDACA; RAMÍREZ, 2004; FERNANDEZ-ROBLEDO; VASTA, 2010; TERPE, 2006; ROSANO; CECARELLI, 2014).

Em trabalhos que visam o diagnóstico de doenças causadas por protozoários, tais como leishmaniose, doença de Chagas e tripanosomíase, o uso de proteínas recombinantes é de grande valia, podendo mostrar bons resultados. Grande parte dos genes dos protozoários permanece desconhecida. Com isso, há o impedimento do conhecimento de parte dos seus produtos, peça fundamental para que sejam desenvolvidos testes diagnósticos e mesmo vacinas (FERNANDEZ-ROBLEDO; VASTA, 2010; ROSANO, CECARELLI, 2014).

Trabalho realizado por Fonseca (2013) testou duas proteínas recombinantes para uso em diagnóstico da leishmaniose visceral canina em teste ELISA, obtendo com uma das proteínas especificidade de 90% e em outra sensibilidade de 100% quando testadas com soros caninos. Ao testar soros de pacientes positivos para doença de Chagas, utilizando ensaio enzimático com proteínas recombinantes, Pastini et al., (1994) obteve bom diagnóstico de doença de Chagas, havendo apenas reação cruzada com soros de pacientes que tinham Leishmaniose visceral, e mostrando concordância com outros tipos de testes, o que indicou boa purificação, servindo de auxílio para diagnóstico confirmatório de Chagas. Por outro lado, Lanna (2015), ao testar proteínas de *Trypanosoma cruzi* para diagnóstico da doença de Chagas observou que apesar de ter selecionado proteínas não presentes no proteoma de espécies de *Leishmania spp.*, houve reatividade cruzada, provavelmente causada por peptídeos ortólogos entre os dois microorganismos, presentes na proteína, o que enaltece a importância de alvos mais específicos que mantenham alta sensibilidade e especificidade.

A predição e caracterização de epítomos de células B, é um importante processo no que diz respeito a produção de vacinas, desenvolvimento de testes diagnósticos e produção de anticorpos. Com a crescente demanda para descoberta de epítomos, uma alternativa tem sido a predição por técnicas computacionais, que oferecem rapidez, bom custo e eficácia na predição

de epítomos de células B com foco na investigação da interação antígeno-anticorpo (EL-MANZALAWY; HONAVAR, 2010).

Estudos com predição de epítomos de célula B têm mostrado bons resultados e potencial para uso diagnóstico, por exemplo, em doença de Chagas (MENDES et al., 2013). Estudos com proteínas recombinantes utilizando peptídeo contendo epítomo de célula B feito por Menezes-Souza e colaboradores (2015) mostraram boa sensibilidade, especificidade e acurácia para diagnóstico da Leishmaniose visceral humana, mostrando-se bom para diagnóstico da doença, além de dispensar a manipulação do parasita, procedimento requerido em outros métodos de diagnóstico e que oferecem risco de infecção.

Não existem trabalhos na literatura descrevendo o uso de proteínas recombinantes para diagnóstico da tripanosomíase bovina. Por este motivo, a identificação de alvos e validação de suas respectivas proteínas recombinantes para utilização no diagnóstico da tripanosomíase bovina, é de grande valia, aumentando a sensibilidade e a especificidade no diagnóstico de animais infectados e assintomáticos e procurando desenvolver testes que sejam rápidos e de baixo custo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Obter proteína recombinante do parasito *T. vivax* e desenvolver um teste imunodiagnóstico do tipo ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) para o diagnóstico da tripanosomíase bovina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter proteína de *T. vivax* previamente predita e selecionada por meio de imunoinformática, que apresentam em sua sequência de aminoácidos epítomos lineares de linfócitos B;
- Clonar, expressar e purificar a proteína recombinante de *T. vivax*;
- Padronizar o ensaio ELISA indireto;
- Avaliar o desempenho da ELISA empregando a proteína recombinante para identificar animais experimentalmente infectados na fase crônica da doença.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PRODUÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE DE *T. vivax*:

As etapas referentes a obtenção da proteína recombinante de *T. vivax* foram desenvolvidas no laboratório de bioinformática da UFMG pelo pesquisador Dr. Tiago Antônio de Oliveira Mendes e estão apresentadas nos itens 4.1.1 a 4.1.7. Após essas etapas a proteína foi expressa, purificada e utilizada na padronização do teste imunoenzimático ELISA.

4.1.1 Obtenção dos dados de proteínas do parasito *T. vivax*

Sequências de proteínas preditas com base no genoma previamente sequenciado da cepa Y486 de *T. vivax* contendo 11.885 proteínas foi obtida do banco de dados TritypDB versão 8.1 (ASLETT et al., 2010). Sequências de baixa qualidade, consideradas como sequências protéicas com menos de 100 aminoácidos, contendo códon de parada interno ou aminoácidos fora do padrão IUPAC foram removidas de ambos os conjuntos de dados (MENDES et al., 2013). Um total de 10.750 (90,45% do proteoma) foram considerados de alta qualidade.

4.1.2 Predição de epítomos lineares de célula B

Epítomos foram preditos para a proteína de *T. vivax* recuperada do banco de dados TritypDB versão 8.1 (ASLETT et al., 2010). Todos os epítomos foram identificados utilizando uma abordagem conservativa para minimizar a seleção de epítomos falso-positivos. Inicialmente, epítomos lineares de célula B foram preditos utilizando o programa BepiPred versão 1.0 (LARSEN; LUND; NIELSEN, 2006) com valor de corte acima de 1,3. Este programa atribui a cada aminoácido da sequência uma pontuação de predição que se correlaciona positivamente com a probabilidade daquele aminoácido participar de um epitopo linear de célula B. O valor de corte definido fornece 96% de especificidade e 13% de sensibilidade (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/output.php>). Regiões de desordem foram preditas utilizando o programa IUPred (DOSZTÁNYI; CSIZMÓK et al., 2005) utilizando ajustes padrões. Um total de 5590 (52% das proteínas de alta qualidade) apresentam pelo menos um potencial epítomo linear de célula B.

4.1.3 Predição de proteínas de superfície/secretadas

Foram utilizados três programas para identificar potenciais proteínas da espécie de *T. vivax* que são secretadas/excretada e/ou de superfície: SignalP 4.1 (PETERSEN et al., 2011), TMHMM 2.0 (SONNHAMMER et al., 1998) e GPI-SOM (FANKHAUSER; MÄSER, 2005), ambos com parâmetros padrões. SignalP é um programa que utiliza uma combinação de diferentes redes neurais artificiais para predizer presença do peptídeo sinal na região amino terminal e localização de sítio de clivagem do peptídeo sinal que medeia a translocação de uma proteína do citoplasma para a membrana retículo endoplasmático, principal mecanismo de exportação em eucariotos. O programa TMHMM identifica potenciais hélices transmembrana em sequências proteicas utilizando um modelo oculto de Markov. GPI-SOM utiliza abordagem de mapa auto-organizado de Kohonen (SOM) para predizer peptídeo sinal na região carboxi-terminal de ligação ao glicosil-fosfatidil-inositol (GPI).

4.1.4 Identificação de proteínas altamente expressas em formas tripomastigotas sanguíneas

Expressão de RNA mensageiro de formas tripomastigotas sanguíneas de *T. vivax* foram recuperadas de Greif et al., (2013). Os 10% dos genes codificadores de proteínas (1188) com maiores níveis de transcritos foram consideradas genes altamente expressos em formas tripomastigotas sanguíneas.

4.1.5 Extração de DNA e desenho dos iniciadores (primers)

Formas tripomastigotas sanguíneas de *Trypanosoma vivax* foram utilizadas para extração de DNA total para ser utilizado como template em reação de PCR para obter a região codificadora dos genes de interesse a serem clonados em vetores para expressão heteróloga das proteínas correspondentes. Nesta etapa, a extração de DNA total foi realizada utilizando 1×10^8 tripomastigotas e o kit “*Genomic DNA from tissue*” (Macherey-Nagel, Duren, Germany) de acordo com as recomendações do fabricante. Os iniciadores foram desenhados utilizando o software Gene Oligo Explorer (versão 1.5, 2010) e de forma a amplificar toda a região codificadora. Nestes iniciadores foram adicionados sítios para enzimas de restrição nas extremidades 5’ dos iniciadores para facilitar a transferência dos amplicons do vetor de clonagem pGEM®-T (Promega, Madison, USA) para os vetores de expressão pET28a-TEV.

4.1.6 Amplificação e purificação da região codificadora

A amplificação da região codificadora referente às sequências de proteínas expressas em *E. coli* foi realizada utilizando 100 nanogramas (ng) de DNA, 2 picogramas dos iniciadores (Primer F: 5'-GCTAGCATGTGCATCTACGTCAACTC-3'; Primer R: 5'-AAGCTTTCAGAAGGCGGAGGAAATAA-3') e a enzima “Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity” (Invitrogen, São Paulo, Brasil), perfazendo um volume final de 50 µL e utilizando os reagentes e as condições de termociclagem recomendados pelo fabricante. Em seguida, ao sistema de amplificação obtido, foi adicionado o tampão de amostra “6x DNA Loading Dye” (Thermo Scientific, Wilmington, EUA) e em seguida submetido à separação em gel de agarose 1% a 100-120 volts em tampão TAE 1X, contendo 0,3 µg/µL de brometo de etídio (Bio-Rad, Hercules, EUA). Após a separação em gel de agarose, as bandas de tamanho esperado foram excisadas, utilizando uma lâmina de bisturi e o bloco de agarose obtido foi submetido à purificação do DNA amplificado utilizando o kit “*Illustra™ GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit*” (GE Healthcare, Piscataway, EUA) para obtenção do DNA purificado. As amostras de DNA purificadas foram dosadas utilizando o equipamento “Nanodrop N2000” (Thermo Scientific, Waltham, EUA).

4.1.7 Clonagem dos genes purificados no vetor pET28a-TEV

Os amplicons purificados na etapa de amplificação e purificação foram inicialmente inseridos no vetor de clonagem “*p-GEM-T Vector Systems*” (Figura 3) (Promega, Madison, EUA). O plasmídeo utilizado continha uma 3`-Timina terminal em ambas as fitas de DNA plasmidial no qual se liga a 3`-Adenina do amplicon introduzida pela Taq polimerase durante a reação de PCR. Esse plasmídeo contém um gene de resistência à ampicilina e β-galactosidase, além de sítios para enzimas de restrição. Para cada reação de ligação, foi preparado um mix contendo 5 µL de “2X Rapid Ligation Buffer”, 1 µL de “p-GEM-T Easy Vector” e 1 µL de “T4 DNA Ligase” e adicionado em um tubo de 0,2 mL contendo 3 µL de produto de PCR purificado. Após ser homogeneizado, o tubo foi incubado à temperatura de 4°C por 16 horas para ocorrer a reação de ligação e posteriormente armazenado em freezer a -20°C.

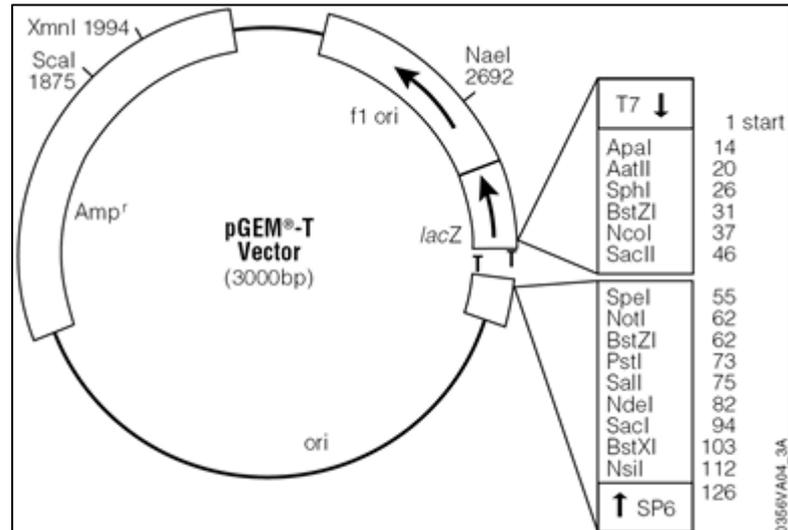


Figura 3: Mapa do vetor pGEM®T

Na etapa de transformação, 5 μ L do produto de ligação foi adicionado a 50 μ L de células competentes XL1-Blue (Phoneutria, Belo Horizonte, Brasil) previamente armazenadas a -80°C . Em seguida as amostras foram transferidas para cubetas de eletroporação MicroPulser (Bio-Rad, Hercules, EUA) de 0,1 cm, e submetidas a um pulso de 2,50 kV no equipamento de eletroporação MicroPulser (Bio-Rad, Hercules, EUA). Após a eletroporação, foram adicionados 250 μ L do meio de cultura 2xYT líquido, seguido por incubação durante uma hora a 37°C sob agitação em shaker a 200 rpm. Após este período, as amostras foram plaqueadas em meio sólido 2xYT-ágar 1,5% contendo 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina (EMS, São Paulo, Brasil), 1 mM de IPTG e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ X-gal (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e distribuídas uniformemente pela placa utilizando uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas overnight a 37°C e a visualização de colônias isoladas brancas indicou células recombinantes que apresentaram o plasmídeo com o amplicon inserido. Estas colônias foram submetidas à reação de PCR utilizando 2 picogramas (pg) de iniciadores específicos para a região M13 do vetor e a “Taq DNA Polimerase” (Phoneutria, Belo Horizonte, Brasil), para confirmar a presença do amplicon no sítio de clonagem, de acordo com recomendações do fabricante.

As colônias positivas foram então adicionadas a 3 mL de meio de cultura 2xYT líquido contendo 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina (EMS, São Paulo, Brasil) e incubadas *overnight* a 37°C sob agitação em shaker a 200 rpm. A partir desta cultura foi realizada a extração do DNA plasmidial utilizando o kit “Illustra Plasmid Mini Spin” (GE Healthcare, Piscataway, EUA). Os plasmídeos contendo os insertos, assim como o vetor de expressão pET28a-TEV (Figura 4) foram submetidos a dupla digestão com enzimas de restrição específicas (Thermo

Scientific, Waltham, EUA) de acordo com recomendações do fabricante. Em seguida, as amostras digeridas foram submetidas à separação em gel de agarose, purificadas e dosadas. Os insertos e o pET28a-TEV digeridos foram ligados utilizando a enzima “T4 DNA Ligase” (Thermo Scientific, Waltham, EUA) de acordo com recomendações do fabricante. Na etapa de transformação, 5 μ L do produto de ligação foi adicionado a 50 μ L de células competentes *E. coli* Arctic Express (DE3) (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA), previamente armazenadas a -80°C . Em seguida, as amostras foram transferidas para “MicroPulser Electroporation Cuvettes” (Bio-Rad, Hercules, EUA) de 0,1 cm, e submetidas a um pulso de 2,50 kV no equipamento “MicroPulser™ Electroporation Apparatus” (Bio-Rad, Hercules, EUA). Após a eletroporação, foram adicionados 200 μ L do meio de cultura 2xYT líquido a cubeta, transferido para tubos de 1,5 mL e incubado durante uma hora a 37°C sob agitação em shaker a 200 rpm. Após este período, as amostras foram plaqueadas em meio sólido 2xYT-ágar 1,5% contendo 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Kanamicina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) e 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Gentamicina (Neoquímica, Anápolis, Brasil). Estas colônias foram submetidas à reação de PCR utilizando 2 pg de iniciadores específicos para a região T7 do vetor e a “Taq DNA Polimerase” (Phoneutria, Belo Horizonte, Brasil) para confirmar a presença do amplicon no sítio de clonagem, de acordo com recomendações do fabricante. Os clones derivados da clonagem do gene foram sequenciados para confirmação da identidade do gene clonado e verificação da correta fase de leitura.

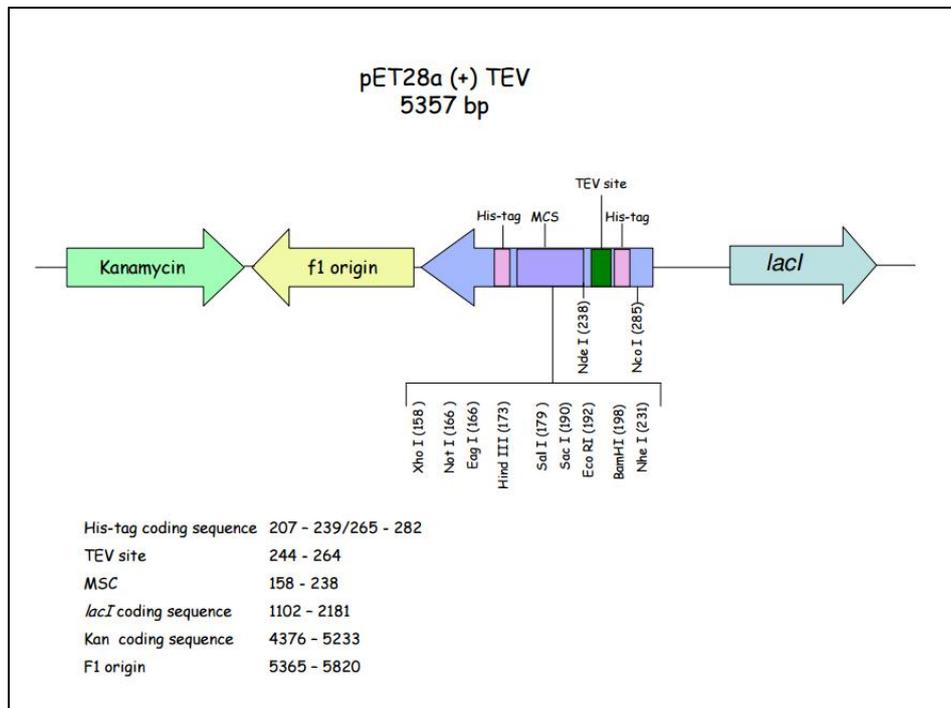


Figura 4: Mapa do vetor pET28a-TEV

4.2 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Para indução da expressão das proteínas recombinantes, colônias de bactérias isoladas em cada sistema de clonagem foram inoculadas em dois Erlenmeyers de 100 mL cada contendo 50 mL de meio de cultura 2xYT (Tryptona/Peptona + Extrato de Levedura + NaCl + Kanamicina 50 µg/mL e Gentamicina 20 µg/) e incubadas *overnight* a 37 °C sob agitação a 200 RPM em estufa. Em seguida, as 25 mL das culturas foram inoculadas em cada um dos quatro Erlenmeyer de 2000 mL contendo 500 mL de meio 2xYT e cultivadas até a densidade ótica (DO600) de 0,6-0,8 a 30 °C, sob agitação, a 200 RPM, por três horas. Após atingir a DO desejada, a expressão foi induzida com a adição de 0,1mM de Isopropil β-D-1-thiogalactopiranosídeo (IPTG) (Invitrogen, São Paulo, Brasil) por 24 horas a 12 °C sob agitação a 200 RPM. Após o período de indução, a cultura foi centrifugada por 7000 RPM, por 40 minutos a 4°C, na centrífuga “5804R” (Eppendorf[®], Hamburg, Alemanha) e o sobrenadante desprezado. Em seguida, os *pellets* foram armazenados a -80 °C. Alíquotas de 1 mL da cultura imediatamente antes da adição de IPTG, e após o período de indução da expressão, foram também coletados em microtubos e centrifugadas por 5 minutos a 8.000 RPM e armazenado a -20°C, para serem utilizadas como controle de expressão.

4.3 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

O *pellet* contendo a cultura após a etapa de expressão foi ressuspensionado em 100 mL de PBS (Na₂HPO₄ + NaHPO₄ + NaCl, pH 7,4) contendo 30 mM de Imizadol e lisozima 100 µg/mL (Sigma-Aldrich[®], Saint Louis, EUA) e incubado por 30 min em gelo. Em seguida, o extrato foi lisado no homogeneizador EmulsiFlex-C3 (Avestin[®], Mannheim, Alemanha) após cinco ciclos de homogeneização conforme recomendado pelo fabricante do equipamento. Em seguida a amostra foi centrifugada por 5000 RPM por 30 min a 4 °C, o sobrenadante coletado (fração solúvel) foi filtrado em filtro 0,45 µm, e as proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade no sistema “ÄKTAprime plus” (GE Healthcare[®], Piscataway, EUA). Nesta etapa a fração sobrenadante foi aplicada em uma coluna “HisTrap HP” de cinco mL (GE Healthcare[®], Piscataway, EUA). A coluna foi previamente lavada utilizando cinco vezes o seu volume com o tampão A (PBS contendo imidazol 30 mM). A eluição foi realizada através da adição do tampão B (PBS contendo imidazol 500 mM). Em seguida, as frações eluídas contendo a proteína recombinante foram concentradas na coluna Amicon[®] ultra 15

Centrifugal Filters 10,000 NMWL (Millipore[®], Darmstadt, Alemanha) e purificadas na coluna de gel filtração Superdex[™] 200 (GE Healthcare[®], Piscataway, EUA).

4.4 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE

Todas as frações obtidas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12.5%. As amostras obtidas nos ensaios de expressão e purificação foram submetidas à separação por eletroforese em gel de poliacrilamida, utilizando Bis-acrilamida 40%. O gel de separação 12,5% foi preparado utilizando tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,01%, persulfato de amônio 0,5% v/v e TEMED 0,05% v/v. O gel de concentração foi preparado de modo semelhante ao de separação, mas utilizando o tampão Tris-HCl 1,5 M pH 6,8. As amostras obtidas da indução e teste de solubilidade foram adicionadas tampão de amostra (SDS 10%, Tris-HCl 0,5 mM pH 6,8, azul de Bromofenol 1%, 2-β-mercaptoetanol 5% e glicerol 10%), pré-aquecidas a 100°C durante 10 minutos para desnaturação das proteínas e posteriormente aplicadas no gel para separação eletroforética. A eletroforese foi realizada em aparelho Mini Protean II Biorad[®], utilizando tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% e pH 8,3) sob à voltagem constante de 120 volts. Após a corrida, os géis foram corados por incubação por 12-16 horas com a solução de *Coomassie Blue* (Coomassie Brilliant Blue G-250 0,25%, metanol 50% e ácido acético 10%) a temperatura ambiente e em seguida descorados por uma hora em solução etanol 30% e ácido acético 10% a temperatura ambiente.

4.5 ENSAIO E DOSAGEM DE PROTEÍNAS

As amostras de proteína recombinante purificadas foram dosadas pelo método colorimétrico do Ácido Bicinconínico (BCA) utilizando o kit “BCA Protein Assay Reagent” (Thermo Scientific[®], Waltham, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante e a leitura realizada em aparelho Versamax (Molecular Devices[®], Sunnyvale, EUA) com comprimento de onda de 562 nm.

4.6 BANCO DE SOROS

As amostras de soros foram obtidas de um banco de soro mantido aliquoteado e armazenados a -20 °C pelo curso de Veterinária da Universidade de Uberaba (PAPE2013/17 e CVZ - APQ-01660-13 FAPEMIG). Os soros eram provenientes de 10 bovinos machos, com

idade entre 12 e 18 meses e peso variando entre 180 a 200 kg, negativos para *T. vivax* em quatro testes parasitológicos consecutivos (direto, MHCT e BCT), RIFI e PCR. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos, sendo grupo experimentalmente infectado (GI) por via sub cutânea e intra muscular com sangue de ovino contendo 2×10^6 tripomastigotas de *T. vivax*/mL de sangue (n=5) e o grupo não infectado (GC), inoculado por via subcutânea e intramuscular com 2 mL de solução fisiológica estéril (n=5), (protocolo de aprovação CEEA 001/2013 – Anexo A) (protocolo de aprovação CEEA 001/2013 – Anexo A).

Os soros utilizados para a padronização do teste ELISA eram dos animais pertencentes ao GI colhidos aos 0 (4 amostras), 21, 24, 27 e 30 (19 amostras), dias após infecção (DPI), e apresentavam títulos de anticorpos IgG anti *T. vivax* na RIFI respectivamente de: 0 (0 – 0) 160 – 1280 (576 ± 461), 80 a 640 ($464 \pm 255,5$), 160 a 2560 ($992 \pm 975,9$) e 80 a 10240 ($2480 \pm 4364,2$).

4.7 PADRONIZAÇÃO DO TESTE IMUNOENZIMÁTICO ELISA

Para a padronização do teste, foram utilizadas placas de ELISA 96 poços (Nalge Nunc Intl[®], Penfield, EUA), diferentes concentrações da proteína recombinante (1, 10, 100 e 1000ng), diluições de soros positivos (*pool* de amostras de soros dos animais infectados experimentalmente com elevado título de IgG na RIFI – 30^o DPI) e negativos (*pool* de amostras de soros dos animais não infectados (dia zero) (1:100, 1:250 e 1:500) e de conjugado anti-IgG marcado com peroxidase (Sigma-Aldrich[®], Saint Louis, EUA) (1:5000, 1:10000 e 1:20000).

Para a sensibilização da placa, 100uL/poco da proteína recombinante diluída em *coating buffer* (Na₂CO₃ 0,16%, NaHCO₃ 0,24% e pH 9,6) foram pipetados. Após incubação por 12-16 horas a 8°C, a placa foi lavada uma vez com solução de lavagem (PBS + tween 0,05%) e bloqueada com 200 µL/poço de PBS acrescido de 1,0% de BSA (Invitrogen, São Paulo, Brasil) durante uma hora a 37 °C. Posteriormente, a placa foi lavada uma vez com solução de lavagem, 100 µL do *pool* de soros positivos e negativos diluídos em PBS com 1% de BSA foram adicionados e incubados a 37°C por uma hora. Decorrido o tempo, a placa foi lavada três vezes com solução de lavagem e 100 µL do anticorpo anti-IgG bovino marcado com peroxidase e diluído em PBS-tween BSA 1% foram adicionados e incubados a 37 °C por uma hora. Após lavagem da placa por três vezes com a solução de lavagem adicionou-se 100 µL da solução reveladora (Ácido cítrico 0,1M, Na₂PO₄ 0,2 M, TMB 0,05% e H₂O₂ 0,1%). Em seguida a placa foi incubada a 37 °C ao abrigo de luz por 15 minutos. A reação foi

interrompida pela adição de 50 μ L de H_2SO_4 2M e a absorbância foi obtida em leitor de ELISA a 450 nm no leitor de ELISA Versamax (Molecular Devices[®], Sunnyvale, EUA).

Após a padronização da concentração da proteína recombinante, diluições do soro e conjugado, amostras de soros dos animais experimentais dos dias zero, 21, 24, 27 e 30 DPI foram testados individualmente, em duplicata, e os resultados expressos em densidade ótica. Para a determinação do ponto de corte (cut-off), utilizou-se a curva ROC (Receiver Operating Characteristic), uma ferramenta estatística que permite separar os positivos dos negativos. A área sob a curva (ASC) também foi obtida objetivando avaliar a acurácia do teste, sendo classificada em baixa (0,51-0,61), média (0,62-0,81) e alta (0,82-0,99). Essas análises foram realizadas com auxílio do programa MedCalc 14.8.1.

Os parâmetros sensibilidade, especificidade e valores preditivos foram estimados de acordo com Ferreira e Ávila (2001). A sensibilidade do teste foi dada pela porcentagem de positivos detectados pelo teste entre os indivíduos sabidamente doentes (verdadeiros positivos). A especificidade, pela porcentagem de negativos, entre indivíduos não doentes (verdadeiros negativos). O valor preditivo positivo (VPP) refere-se à probabilidade de ter a doença se o resultado for positivo, enquanto que o valor preditivo negativo (VPN) refere-se à probabilidade de não ter a doença quando o resultado for negativo (LIRA, 2005).

Foi calculada a razão de verossimilhança a fim de se observar a probabilidade de encontrar um animal negativo entre os doentes (RVN) e de encontrar um positivo entre os doentes (RVP), calculou-se a razão de verossimilhança negativa e positiva (FONSECA, 2013).

Esses parâmetros foram obtidos pelo programa computacional MedCalc e GraphPad Prism versão 5.0 (Prism Software[®], Irvine, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ANTIGÊNICAS, PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS E SELEÇÃO DE ALVOS

Inicialmente, 76 proteínas foram selecionadas por apresentarem pelo menos um epítipo linear de célula B predito, serem altamente expressas em tripomastigotas sanguíneas e potencialmente serem secretadas ou estarem na superfície do parasito (Figura 5).

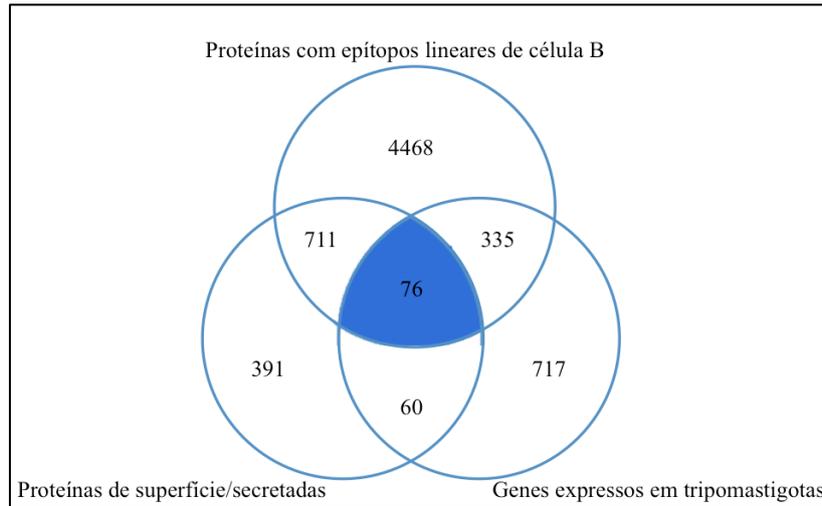


Figura 5: Distribuição de proteínas de *T. vivax* com potenciais epítipos lineares de célula B, de superfície/secretadas e expressas em tripomastigotas (área em azul).

Proteínas com similaridade acima de 70% de identidade e 70% de cobertura com diferentes tripanosomatídeos (*T. brucei*, *T. congolense*, *T. cruzi*, *T. evansi*, *T. grayi*, *L. braziliensis*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. major*, *L. tarentolae*, *L. mexicana* e *L. tarentolae*) e diferentes patógenos de importância veterinária (*A. marginale*, *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. bovis* e *B. abortus*) foram eliminadas para minimizar reação cruzada no teste sorológico. Inicialmente, optou-se por selecionar uma proteína (TvY486_0012280) com potencial aplicação em testes imunodiagnóstico para ser clonada e expressa como pode ser observado na Figura 6.

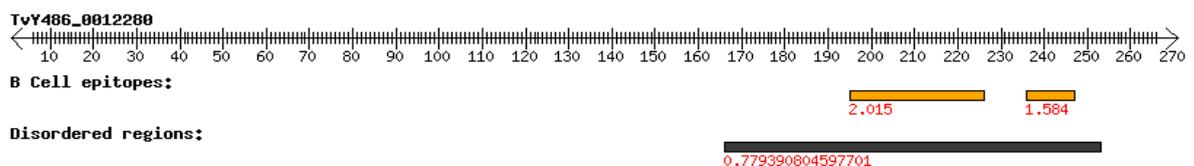


Figura 6: Proteína hipotética específica de *T. vivax* (TvY486_0012280) com epítipos lineares de célula B. A régua com setas duplas representam as coordenadas de cada proteína com o identificador do gene codificador

acima. Barras amarelas representam epítomos lineares de célula B preditos com valor de predição representados em vermelho. Barras pretas representam regiões não estruturadas da proteína que suportam a presença de regiões com epítomos lineares acessíveis a anticorpos e os valores de predição são representados em vermelho.

5.2 CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE (TvY486_0012280) EM *E. coli* BL-21 ARCTIC EXPRESS (DE3)

O gene foi inicialmente amplificado (Figura 7) utilizando a enzima Taq High-Fidelity e os resultados das etapas de ligação destes amplicons aos vetores utilizados no estudo serão apresentados. Na Figura 7 também estão demonstrados os amplicons gerados da reação de PCR (813 PB) de colônia obtidas por meio da transformação das bactérias XL-1 Blue com o sistema de ligação do vetor de clonagem “p-GEM-T Easy Vector Systems” e os amplicons gerados da reação de PCR, utilizando primer T7 e colônias de bactérias BL-21 Star obtidas por meio da transformação com o sistema de ligação do vetor de expressão pET28a-TEV.

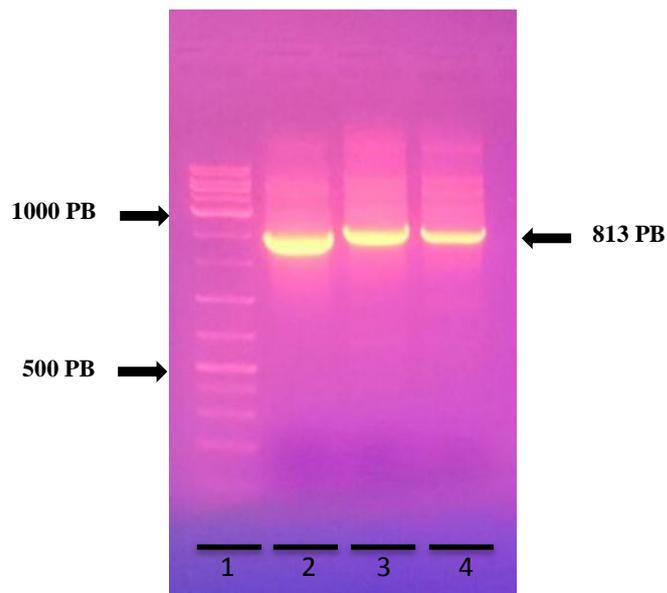


Figura 7: Análise dos produtos de PCR gerados na etapa de clonagem. Na canaleta 1, encontra-se o padrão de peso molecular, sendo evidenciados os pesos de 500 e 1000 pares de base (PB). Demais canaletas são referentes a amplificação do gene com a enzima High-Fidelity (2), utilizando primer M13 no vetor de clonagem pGEM-T Easy (3) e utilizando primer T7 no vetor de expressão pET28a-TEV (4).

5.3 – EXPRESSÃO DE PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE *T. vivax* (TvY486_0012280) EM *E. coli* BL-21 ARCTIC EXPRESS (DE3) E PURIFICAÇÃO EM COLUNA CROMATOGRÁFICA His-Tag SEGUIDO DE GEL FILTRAÇÃO EM COLUNA TM-200

A expressão da proteína recombinante dos produtos gerados antes e após indução com IPTG, e após a purificação por coluna de afinidade pode ser visualizada na figura 8. A produção em laboratório, gerou 1.844,06ng proteína recombinante TvY486_0012280.

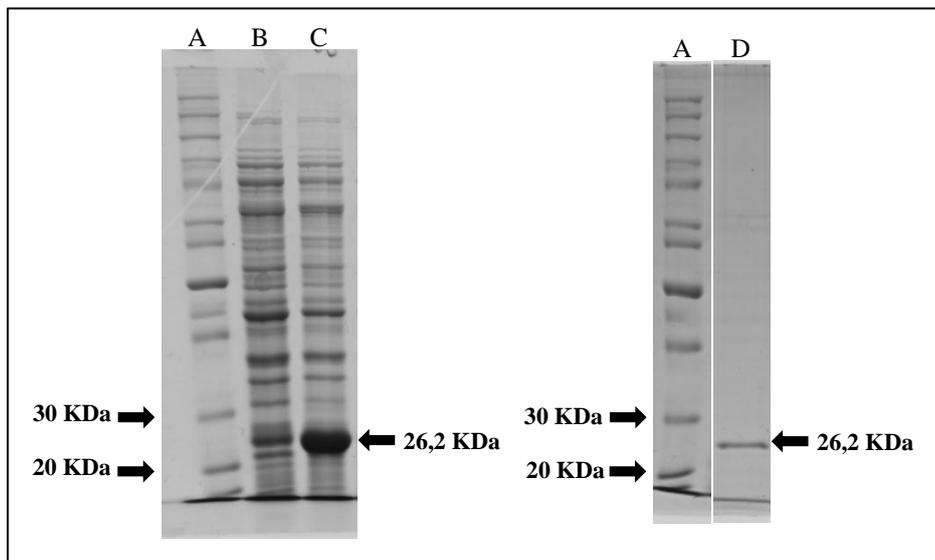


Figura 8: Expressão e purificação da proteína recombinante separada por gel de poli-acrilamida SDS-PAGE 12,5%. (A) Padrão de peso molecular, lisado da cultura antes (B) e após (C) indução com IPTG e proteína recombinante purificada TvY486_0012280 (KDa) (D) por gel filtração.

5.4 PADRONIZAÇÃO DO TESTE IMUNOENZIMÁTICO ELISA

A figura 9 representa a média dos valores de DO obtida nas diferentes concentrações de antígeno e diluições de *pool* de soros e conjugado. Pode-se notar maior diferença na absorbância entre animais positivos e negativos com 1000ng da proteína recombinante (Figura 9A), soro controle positivo e controle negativo na diluição 1:100 (Figura 9B) e conjugado na diluição 1:5000 (Figura 9C).

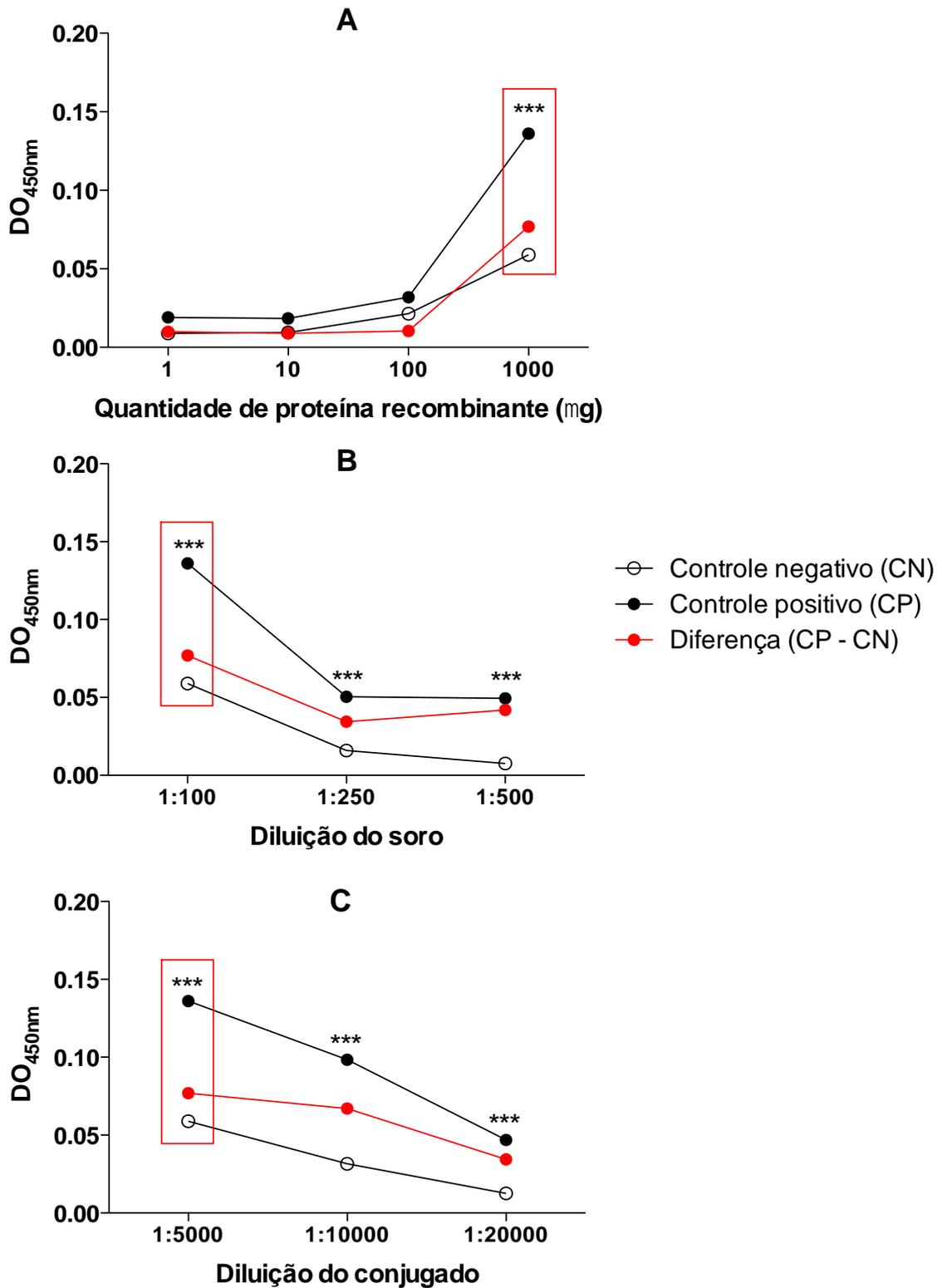


Figura 9: (A) Perfil de absorbância do *pool* de soros de animais aos 30 dias pós-infecção frente a diferentes concentrações de proteína recombinante TvY486_0012280; (B) Perfil de absorbância do *pool* de soros de animais aos 30 dias pós-infecção em diferentes diluições; (C) Perfil de absorbância do *pool* de soros de animais aos 30 dias pós-infecção frente a diferentes diluições do conjugado.

A curva ROC (Figura 10) obtida das a partir das DO das amostras individuais permitiu separar animais positivos dos negativos a partir da DO de 0,04 (ponto de corte) com elevada acurácia do teste (ASC: 0,986).

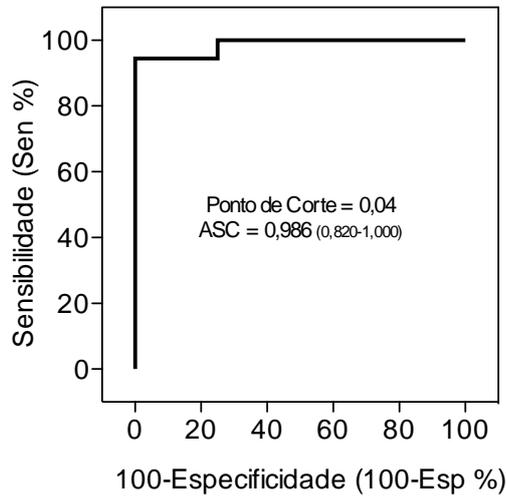


Figura 10: Curva ROC da padronização de ELISA testando a proteína recombinante de *T. vivax* TvY486_0012280 para diagnóstico da tripanosomíase bovina.

Os valores de DO individuais dos animais ao dia 0 variaram de 0,0223-0,0338 ($0,0279 \pm 0,0057$) e dos animais dos dias 21, 24, 27 e 30 pós-infecção variaram respectivamente de 0,0323 - 0,0888 ($0,270 \pm 0,026$), 0,0563 - 0,1678 ($0,461 \pm 0,044$), 0,0608 - 0,1178 ($0,380 \pm 0,024$) e 0,0618 - 0,1058 ($0,420 \pm 0,019$) (Figura 11). Com base no ponto de corte obtido, pôde-se avaliar o desempenho do teste, sendo a sensibilidade de 94,4% (72,6–99,1), especificidade de 100% (40,2–100) (Figura 12) e os valores VPP e VPN, respectivamente, de 100% e de 99,3%.

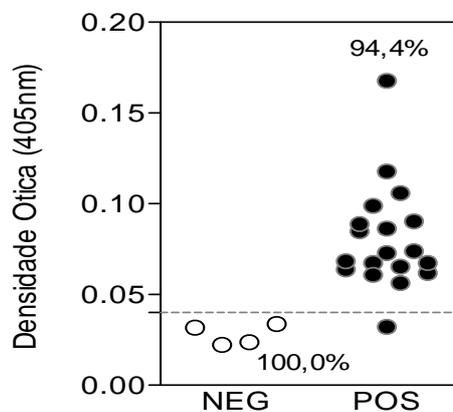


Figura 11: Valores de densidade ótica dos animais ao dia 0 (n=4) e dias 21 (n=4), 24 (n=5), 27 (n=5) e 30 (n=5) pós-infecção.

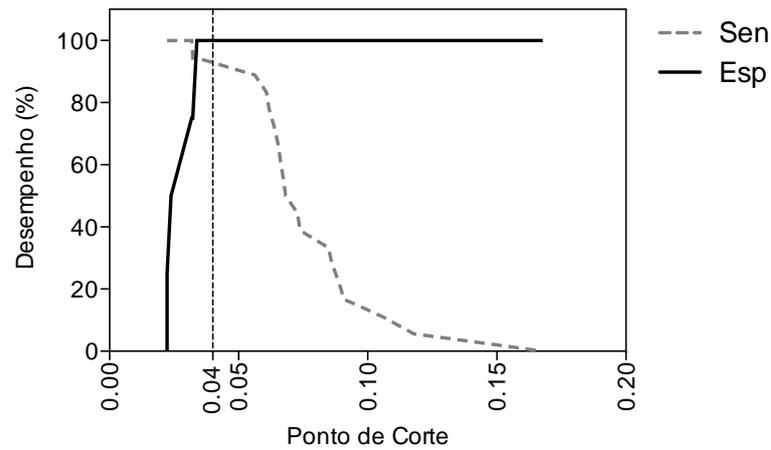


Figura 12: Desempenho do teste ELISA para *T. vivax* utilizando a proteína recombinante TvY486_0012280.

Na análise de verossimilhança pôde-se notar os valores de razão de verossimilhança negativa de 0,06 e de razão de verossimilhança positiva de $+\infty$ (Figura 13). Observa-se que com o ponto de corte escolhido, a chance de obtenção de um resultado falso-negativo é praticamente zero.

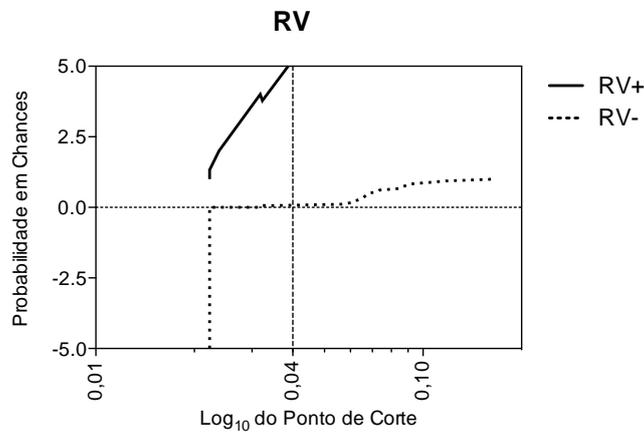


Figura 13: Razão de verossimilhança entre animais positivos e negativos

Os dados obtidos no presente trabalho estão descritos na tabela 1, e mostram uma performance satisfatória do teste de ELISA.

Tabela 1: Desempenho do teste imunoenzimático ELISA com a proteína recombinante purificada TvY486_0012280.

Parâmetro	Resultado
Acurácia	98,6%
Sensibilidade	94,4%
Especificidade	100%
Valor Preditivo Positivo	100%
Valor Preditivo Negativo	99,3%
Razão de Verossimilhança positiva	$+\infty$
Razão de Verossimilhança negativa	0,06

A patente depositada, referente a fase de padronização de ELISA para diagnóstico da tripanosomíase bovina está descrita no anexo B.

6. DISCUSSÃO

O diagnóstico para as mais diversas doenças que acometem os animais domésticos sempre foi um desafio para a medicina veterinária. Seja no diagnóstico precoce da enfermidade, seja na especificidade e sensibilidade do teste. No caso da tripanosomíase bovina, os métodos diagnósticos parasitológico e sorológico desenvolvidos até o presente momento apresentam entraves. O teste parasitológico permite detectar tripomastigota de *T. vivax* na fase aguda da doença, mas em fases crônicas esse teste apresenta baixa sensibilidade (MURRAY, 1977). Enquanto que no teste sorológico, a identificação de IgG em fase aguda não é possível (SAMPAIO, 2013).

Frangé (2013) ao relatar um surto de tripanosomíase, discorre sobre a dificuldade de encontrar animais que tenham o parasito circulante, mostrando baixa sensibilidade dos testes parasitológicos, uma vez que há migração do parasito para fora da circulação, conforme o curso da doença se torna crônico. Daí, a importância de padronizar testes que sejam sensíveis e específicos na pesquisa de anticorpos. Todavia, o sucesso do atual teste de pesquisa de anticorpos (RIFI) depende dentre vários fatores, do olhar do profissional que examina a lâmina de imunofluorescência, podendo o mesmo ser subjetivo, tempo de realização do exame, dependendo do número de amostras a ser analisado e presença de reações cruzadas com outros tripanosomatídeos (SILVA et al., 2002; ZANETTE, 2006). Uma vantagem dos testes de ELISA em comparação com os testes de RIFI, diz respeito a praticidade, uma vez que no ELISA é possível realizar o processamento de várias amostras de uma só vez e leitura é realizada por espectrofotometria, enquanto a RIFI requer diluições seriadas, além de ter número restrito de amostras processadas por lâmina (ZANETTE, 2006).

Com o avanço da doença, surge a necessidade de ter maneiras diagnósticas precisas, a fim de realizar de maneira eficiente o controle e o tratamento da patologia. O uso de proteínas recombinantes para diagnóstico da tripanosomíase bovina é uma tecnologia nova, havendo poucos trabalhos na literatura que decorem o uso das mesmas para o diagnóstico da tripanosomíase bovina, sendo o presente trabalho um dos pioneiros no assunto. Após proteínas semelhantes a outros tripanosomatídeos e patógenos serem eliminados, visando minimizar reação cruzada no teste sorológico, a proteína TvY486_0012280 foi selecionada por apresentar potencial aplicação em testes imunodiagnóstico para ser clonada e expressa.

Para a obtenção das proteínas utilizadas no presente experimento, foi utilizado o plasmídeo pET28a-TEV. O plasmídeo possui uma cauda de histidina, na qual a proteína expressa é ligada, facilitando a purificação posterior com a coluna de níquel. Já para a expressão, o microorganismo utilizado foi a *E. coli*, por crescer rapidamente, até altas

densidades e em meio de cultura acessível, produzindo grande quantidade de produto recombinante (TERPE, 2006).

Como mencionado por Day e Schultz, (2011), para que resultados satisfatórios sejam obtidos no teste de ELISA, deve-se ter o cuidado de, primeiramente, padronizar as diluições de antígeno, soro e conjugado que serão utilizadas, bem como o uso de padrões ouro de soros negativos e positivos. Comparando os resultados obtidos com os do trabalho realizado por Madruga et al., (2006) que testou antígenos brutos de *T. vivax* em ELISA, percebeu-se que o referido autor obteve sensibilidade de 97,6%, frente a 94,4% do presente trabalho. Isso pode ser devido ao tipo de antígeno utilizado. O uso de antígenos brutos são considerados de menor qualidade, uma vez que a especificidade aos subgêneros de *Trypanosoma* é limitada (MAGONA, et al., 2003).

Alem disso, o uso de antígenos brutos, permitem reações cruzadas (MADRUGA et al., 2006) e são de obtenção dificultosa, uma vez que é necessário protocolo de aprovação por parte de um comitê de ética, para uso de animais para inoculação. Ademais, envolve treinamento de equipe para acompanhamento dos animais no intervalo entre inoculação, até que seja atingido o pico de parasitemia para obtenção do parasito. Em contraste, a obtenção de proteínas recombinantes, assim como realizado no presente estudo, é uma tecnologia inovadora e que é capaz de obter proteínas específicas em larga escala e de boa qualidade, dispensando o uso de animais (FONSECA, 2013; ROSANO, CECARELLI, 2014).

A baixa densidade ótica observada nos testes de ELISA pode ser explicada pela escolha de um único antígeno, onde há ligação de anticorpos a uma proteína antigênica isolada, diferente do que é observado quando utiliza-se um pool de proteínas, havendo várias moléculas antigênicas que promovem a ligação de vários anticorpos, e conseqüentemente uma maior DO.

Trabalho realizado por Porrozzi et al., (2007) utilizando antígenos bruto e recombinantes (rA2 de *L. donovani*, rK26 e rK39 de *L. Infantum*) para diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina por ELISA foram comparados, e mostraram diferenças em relação a sensibilidade. Nos protocolos de ELISA utilizando os antígenos rK26, rK39 e rA2 frente a soros de cães sintomáticos a sensibilidade foi de 94%, 100% e 70%, respectivamente, enquanto que o ELISA com extrato bruto do parasito apresentou sensibilidade de 88%. Quando utilizou-se soros de cães assintomáticos, a sensibilidade foi de 66% para os antígenos rK26 e rK39, de 88% para rA2 e 30% para ELISA com extrato bruto de parasito.

Madruga et al., (2006) comentam que reações cruzadas com outros tripanosomatídeos são esperadas (96,9% de especificidade), porém o presente estudo utilizou de pesquisa de bioinformática, que descartou epítomos com maior similaridade a outros tripanosomatídeos,

sendo portanto um teste que evita reações cruzadas, o que justifica a especificidade de 100%. Este resultado significativo é um importante parâmetro, uma vez que se trata da capacidade do teste em indicar que um indivíduo não possui a doença quando ela não está presente, evitando assim que hajam reações cruzadas (JEKEL; KATZ; ELMORE, 2005).

Outros trabalhos utilizando proteínas recombinantes para doença de Chagas e leishmaniose visceral canina (LVC) foram realizados e também observaram sensibilidades e especificidades diferentes. Como por exemplo o trabalho realizado por LANNA (2015), que objetivou padronizar ELISA para diagnóstico de doença de Chagas utilizando proteína recombinante e obteve uma sensibilidade de 25,64% e especificidade de 80% entre pacientes chagásicos e pacientes com leishmaniose visceral, não sendo um alvo bom para o teste, além de ter apresentado reações cruzadas com pacientes positivos para leishmaniose visceral.

Zanette (2006), ao testar ELISA para o diagnóstico da LVC, obteve uma sensibilidade de 94% e especificidade de 84,4%. Ademais, observou reação cruzada com outras patologias causadas por protozoários, tais como doença de Chagas, erliquiose, babesiose, toxoplasmose e neosporose ao testar ELISA, RIFI e ensaio imunocromatográfico para diagnóstico da LVC. As reações cruzadas podem ser explicadas no referido trabalho pelo uso de antígenos totais nas técnicas de ELISA e RIFI.

Trabalho realizado por PILLAY e colaboradores (2013), demonstrou resultados satisfatórios para detecção de *T. vivax* com ELISA, em animais entre 10 a 20 DPI. Os autores isolaram uma proteína associada ao flagelo, quase idêntica a vários isolados de *T. vivax* para padronização do teste, e obtiveram uma sensibilidade de 91,5% e especificidade de 91,3%, quando comparado a outro teste que utilizou antígeno lisado para adsorção da placa. Todavia, observou resultados falso-negativos antes dos 10 DPI em animais experimentais, além de reação cruzada com soros de animais infectados por *T. congolense*.

Fonseca (2003), ao testar duas proteínas recombinantes para o diagnóstico de Leishmaniose visceral, obteve sensibilidade de 75% e 80% para uma, e especificidade de 90% e 60%, para a outra. Ao observar o valor preditivo positivo (proporção de verdadeiros positivos entre todos os indivíduos com teste positivo) para as duas proteínas testadas, o mesmo observou VPP de 97% e 92%. O valor preditivo positivo do presente trabalho foi 100%, sendo então 100% de todos os indivíduos positivos detectados ao teste. Ao observar o valor preditivo negativo (proporção de verdadeiros negativos entre todos os indivíduos com teste negativo), o mesmo autor obteve VPN de 39% e 35%. O presente trabalho obteve VPN de 99,3%, sendo portanto 99,3% dos indivíduos negativos detectados no teste. É importante ressaltar que os bons valores obtidos no presente trabalho devem-se a escolha de soros bem caracterizados do período de infecção.

A curva ROC trata-se de uma importante ferramenta na avaliação de métodos diagnósticos. Nela é possível colocar valores de sensibilidade (eixo X) e especificidade (eixo Y), sendo possível escolher um *cut-off* de acordo com maior ou menor especificidade e sensibilidade. Ademais, a curva ROC fornece a área sob a curva (ASC), valor que é expresso entre 0,0 a 1,0 e permite condensar as possíveis combinações de sensibilidade e especificidade em um único valor (GREINER; PFEIFFER; SMITH, 2000)

Ao comparar os valores de ASC para as duas proteínas de Fonseca (2003), o autor obteve 0,76 e 0,86 para duas proteínas testadas. O presente trabalho obteve 0,986. De acordo com Luz e colaboradores (2016), valores preditivos refletem a contribuição de um teste para condições clínicas. A acurácia total indicou que 98,6% dos resultados são corretos, reforçando a boa performance da metodologia descrita. A área sobre a curva é capaz de mostrar a performance de um teste, podendo ter qualquer valor de 0 a 1, onde quanto mais perto de 1, melhor é a acurácia do teste (ZHOU; OBUCHOWSKI; MCCLISH; 2002;)

A razão de verossimilhança positiva (RVP), indica a probabilidade de encontrar resultado positivo em indivíduos que sejam verdadeiramente positivos. A RVP do presente trabalho foi de $+\infty$, indicando portanto se tratar de um teste promissor, pois expressa que a probabilidade de encontrar um indivíduo portador da doença, quando comparados a indivíduos não doentes (FONSECA, 2013). Ainda segundo Fonseca (2013), a razão de verossimilhança negativa (RVN), indica a probabilidade de encontrar resultado negativo em indivíduos portadores da doença, portanto quanto mais próximo for de zero, melhor é o teste. O VPN do presente trabalho foi de 0,06, mostrando-se também adequado.

Com o grande aumento dos casos de tripanosomíase bovina, espera-se que o desenvolvimento de novas técnicas diagnósticas seja capaz de detectar a doença tanto em fase aguda, quanto em fase crônica, visando também o uso de um diagnóstico prático, eficiente e consequentemente um tratamento precoce, aspirando manter a sanidade dos rebanhos.

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- A padronização demonstra-se adequada com 1000 nanogramas de proteína recombinante (TvY486_0012280) para sensibilização, soro na diluição de 1:100 e conjugado na diluição de 1:5000;
- A proteína recombinante permite padronizar o teste imunoenzimático ELISA com elevada especificidade (100%) e sensibilidade (94,4%);
- O teste imunoenzimático ELISA utilizando a proteína recombinante TvY486_0012280 é uma ferramenta promissora e alternativa para o diagnóstico da tripanosomíase bovina.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Com o grande aumento dos casos de tripanosomíase bovina, o desenvolvimento de novas técnicas diagnósticas é uma necessidade para que a detecção da doença tanto em fase aguda, quanto em fase crônica.

As perspectivas futuras do presente trabalho incluem a realização e padronização de ELISA utilizando a proteína recombinante e amostras de animais advindas do campo, e posteriormente, criação de imunoensaio cromatográfico feito a campo para diagnóstico da tripanosomíase bovina, tanto em fase aguda quanto em fase crônica.

REFERÊNCIAS

- ADAMU, S.; FATIHU, M. Y.; USEH, N. M.; MAMMAN, M.; SEKONI, V. O.; ESIEVO K. A. N. Sequential testicular and epididymal damage in zebu bulls experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. **Veterinary Parasitology**, v.143, p. 29–34. 2007.
- AQUINO, L. P. C. T.; MACHADO, R. Z.; LEMOS, K. R.; MARQUES, L. C.; GARCIA, M.; V.; BORGES, G. P. Antigenic characterization of *Trypanosoma evansi* using sera from experimentally and naturally infected bovines, equines, dogs, and coatis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 112-118. 2010.
- ASLETT, M.; AURRECOECHEA, C.; BERRIMAN, M.; BRESTELLI, J.; BRUNK, B. P.; CARRINGTON, M.; DEPLEDGE, D. F.; FISCHER, S.; GAJRIA, B.; GAO, X.; GARDNER, M. J.; GINGLE, A.; GRANT, G.; HARB, O. S.; HEIGES, M.; HERTZ-FOWLER, C.; HOUSTON, R.; INNAMORATO, F.; IODICE, J.; KISSINGER, J. C.; KRAEMER, E.; LI, W.; LOGAN, F. J.; MILLER, J. A.; MITRA, S.; MYLER, P. J.; NAYAK, V.; PENNINGTON, C.; PHAN, I.; PINNEY, D. F.; RAMASAMY, G.; ROGERS, M. B.; ROOS, D. S.; ROSS, C.; SIVAM, D.; SMITH, D. F.; SRINIVASAMOORTHY, G.; STOECKERT JR, C. J.; SUBRAMANIAN, S.; THIBODEAU, R.; TIVEY, A.; TREATMAN, C.; VELARDE, G.; WANG, H. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic Acids Research**. 2010.
- BARAL, T. N. Immunobiology of African Trypanosomes: Need of alternative interventions. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, artigo n.389153, 24 p. 2010.
- BASSI, P. B. **Cinética dos parâmetros clínicos, hematológicos e imunológicos em bovinos infectados experimentalmente por *Trypanosoma vivax***. 91f. Dissertação (Mestrado), Universidade de Uberaba – UNIUBE, Uberaba, 2014.
- BATISTA, J. S.; BEZERRA, F. S. B.; LIRA, R. A.; CARVALHO, J. R. G.; ROSADO NETO, A. M.; PETRI, A. A.; TEIXEIRA, M. M. G. Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 28, n. 1, p. 63-69. 2008.
- BATISTA, J. S.; RODRIGUES, C. M. F.; OLINDA, R. G.; SILVA, T. M. F.; VALE, R. G.; CÂMARA, A. C. L.; REBOUÇAS, R. E. S.; BEZERRA, F. S. B.; GARCÍA, H. A.; TEIXEIRA, M. M. G. Highly debilitating natural *Trypanosoma vivax* infections in Brazilian calves: epidemiology, pathology, and probable transplacental transmission. **Parasitology Research**, v.110, p.73–80. 2012.
- BEZERRA, F. S. B; BATISTA, J. S. Efeitos da infecção por *Trypanosoma vivax* sobre a reprodução: uma revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2, n.3, p.61-66, 2008.
- CADIOLI, F. A.; BARNABÉ, P. A.; MACHADO, R. Z.; TEIXEIRA, M. C. A.; ANDRÉ, M. R.; SAMPAIO, P. H.; FIDÉLIS JÚNIOR, O. L.; TEIXEIRA, M. M. G.; MARQUES, L. C. First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.21, n.2, p.118-124. 2012.
- CARNEIRO, F. R.; SILVA, T. C.; ALVES, A. C.; HALINE-VAZ, T.; GOZZO, F. C.; ZANCHIN, N. I. Spectroscopic characterization of the tumor antigen NY-REN-21 and

identification of heterodimer formation with SCAND1. **Biochemical and biophysical research communications**, v.343, p.260-268. 2006.

CARVALHO, A. U.; ABRÃO, D. C.; FACURY FILHO, E. J.; PAES, P. R. O.; RIBEIRO, M. F. B. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* no estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, p.769–771. 2008.

CUGLOVICI, D. A.; BARTHOLOMEU, D. C.; REIS-CUNHA, J. L.; CARVALHO, A. U.; RIBEIRO, M. F. B. Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.11, n.3-4, p.320-326. 2010.

DÁVILA, A. M. R.; RAMIREZ, L.; SILVA R. A. M. S. Morphological and biometrical differences among *Trypanosoma vivax* isolates from Brazil and Bolivia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.92, p.357-358. 1997.

DÁVILA, A. M. R.; HERRERA, H. M.; SCHLEBINGER, T.; SOUZA, S. S.; TRAUB-CSEKO, Y.M. Using PCR for unraveling the cryptic epizootiology of livestock trypanosomosis in the Pantanal. **Brazilian Veterinary Parasitology**, v.117, p.1–13. 2003.

DAY, M. J.; SCHULTZ, R. D. **Veterinary Immunology Principles and Practice**. London: Manson Publishing, 1. ed., 256 p. 2011.

DELAFOSSÉ, A.; THÉBAUD, E.; DESQUESNES, M.; MICHAUX, Y. Epidemiology of *Trypanosoma vivax* infection in cattle in the tse-tse free area of Lake Chad. **Preventive Veterinary Medicine**, v.74, p.108–119. 2006.

DESQUESNES, M.; TRESSE, L. Evaluation de la sensibilité du test de Woo pour la détection de *Trypanosoma vivax*. **Revue d'élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux**, v.49, n.315-321. 1996.

DESQUESNES, M.; DÁVILA, A. M.R. Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. **Veterinary Parasitology**, v.109, p.213–231. 2002.

DESQUESNES, M. **Livestock trypanosomoses and their vectors in Latin America**. OIE & CIRAD, Paris, 190p. 2004

DOSZTÁNYI, Z.; CSIZMOK, V.; TOMPA, P.; SIMON, I. IUPred: Web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. **Bioinformatics** v. 21, p. 3433–3434, 2005.

FANKHAUSER, N.; MÄSER, P.; Identification of GPI anchor attachment signals by a Kohonen self-organizing map. **Bioinformatics**, v.21, p.1846–1852. 2005.

EISLER M. C.; LESSARD P.; MASAKE R. A.; MOLOO S. K.; PEREGRINE A. S.; Sensitivity and specificity of antigen-capture ELISAs for diagnosis of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma vivax* infections in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 79, p. 187-201, 1998.

EL-MANZALAWY, Y.; HONAVAR, V. Recent advances in B-cell epitope prediction methods. **Immunome Research**, v.6(2), 2010.

FERNÁNDEZ-ROBLEDO, J. A.; VASTA, G. R. Production of recombinant proteins from protozoans parasites. **Cell Press**. v.26(5), p. 244-254. 2010.

FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 443 p. 2004.

FONSECA, A. M. **Diagnóstico da Leishmaniose visceral utilizando proteínas de *Leishmania infantum* com função desconhecida**. 74f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Minas Gerais, 2013.

FRANGE, R. C. C. **Tripanosomíase em vacas da microrregião de Uberaba – MG: Estudo Soroepidemiológico e Relato de Surto**. 2013, 76f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Uberaba – UNIUBE, Uberaba, 2013.

GARCIA, G. C.; MOURA, D. M.; FRANGE, R. C. C.; BITTAR, E. R.; BITTAR, J. F. F. Bovine Trypanosomiasis: Retrospective investigation and Clinical Signs. **Epidemiology Open Journal**, v.1 (1), p.16-19. 2016.

GARDINER, P. R. Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*. **Advances in Parasitology**, v.28, p.229-317. 1989.

GÓMEZ-PIÑERES, E.; TAVARES-MARQUES, L.; REYNA-BELLO, A. Tiempo de supervivencia in vivo y criopreservación de *Trypanosoma vivax*. **Revista Científica, FCV-Luz**, v.19, n.3, p.225 – 229. 2009.

GREIF, G.; PONCE DE LEON, M.; LAMOLLE, G.; RODRIGUEZ, M.; PIÑEYRO, D.; TAVARES-MARQUES, L. M.; REYNA-BELLO, A.; ROBELLO, C.; ALVAREZ-VALIN, F. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. **Preventive Veterinary Medicine** v.45. p. 23-41 2000.

GREINER, M.; PFEIFFER, D.; SMITH, R. D. Transcriptome analysis of the bloodstream stage from the parasite *Trypanosoma vivax*. **BMC Genomics** v.14:149. 2013.

GUERREIRO, L. T. A. **Identificação e caracterização de minicírculos de *Trypanosoma vivax* através de geração e análise de GSS (Genome Sequence Survey)**. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

HILL, E. W.; O’GORMAN, G. M.; AGABA, M.; GIBSON, J. P.; HANOTTE, O.; KEMP, S. J.; NAESSENS, J.; COUSSENS, P. M.; MACHUGH, D. E. Understanding bovine trypanosomiasis and trypanotolerance: the promise of functional genomics. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.105:3-4, p. 247–258. 2005.

HOARE, C. A. **The Trypanosomoses of mammals**, Oxford: Blackwell, 749p. 1972.

JEKEL, J. F.; KATZ, D. L.; ELMORE, J. G. **Epidemiologia, Bioestatística e Medicina Preventiva**. São Paulo: Artmed, 2. ed. p. 114-121, 2005.

- LANNA, A. C. P. M. **Teste e padronização de alvos de proteínas recombinantes para o diagnóstico da doença de Chagas.** 72f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Minas Gerais, 2015.
- LARSEN, J. E.; LUND O.; NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome Research**, 2(2), 2006.
- LEVINE, N. D. **Protozoan parasites of domestic animals and of man.** 2. ed. Minneapolis: Burgess Publ. Co., 406 p. 1973.
- LINHARES, G. F. C.; DIAS FILHO, F. D.; FERNANDES, P. R.; DUARTE, S. C.; Tripanossomíase em bovinos no município de Formoso do Araguaia, Tocantins. Relato de Caso. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 4, p. 455-460, 2006.
- LIRA, R. A. **Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: Avaliação do Desempenho dos Kits EIE-Leishmaniose-VisceralCanina-Bio-Manguinhos e IFI-Leishmaniose-VisceralCanina-Bio-Manguinhos** 87 f. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2005.
- LUCKINS, A. G. Detection of antibodies in trypanosome-infected cattle by means of a microplate enzyme-linked immunosorbent assay. **Tropical Animal Health and Production**, v.9, p. 53–62, 1977.
- LUZ, J. G. G.; SOUTO, D. E. P.; MACHADO-ASSIS, G. F.; DE LANA, M.; LUZ, R. C. S.; MARTINS-FILHO, O. A.; DAMOS, F. S.; MARTINS, H. R. Aplicability of a novel immunoassay based on surface plasmon resonance for the diagnosis of Chagas disease. **Clinica Chimica Acta**. v.45A, p.39-45, 2016.
- MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; CAVALCANTE-GOES, G.; MARTINS, C.; PFEIFER, I. B.; RIBEIRO, L. R.; KESSLER, R. H.; SOARES, C. O.; MIGUITA, M.; MELO, E. P.; ALMEIDA, R.; LIMA JR, M. M. The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* antibodies and its use in epidemiological surveys. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 7. 2006.
- MAGONA, J. W.; MAYEND, D. J. S.; OLAHO-MUKANI, W.; COLEMAN, P. G.; JONSON, N. N.; WELBURN, S. C.; EISLER, M. C. A comparative study on the clinical, parasitological and molecular diagnosis of bovine trypanosomosis in Uganda. Onderstepoort. **Journal of Veterinary Research**, v.70, p.213-218, 2003.
- MAGONA, J. W.; WALUBENGO, J.; ODIMIN, J. T. Acute haemorrhagic syndrome of bovine trypanosomosis in Uganda. **Acta Tropica**, v.107, p.186–191. 2008.
- MATTIOLI, R. C.; WILSON, R. T. Trypanosomes, tsetse and trypanotolerance: coevolution in Tropical Africa. **Parassitologia**, v. 38, p. 531-535. 1996.
- MATTIOLI, R. C.; FAYE, J. A.; JAITNER, J. Estimation of trypanosomal status by the buffy coat technique and an antibody ELISA for assessment of the impact of trypanosomosis on health and productivity of N'Dama cattle in The Gambia. **Veterinary Parasitology**, v.95, p.25–35. 2001.

MENDES, T. A.; REIS CUNHA, J. L.; DE ALMEIDA LOURDES, R.; RODRIGUES LUIZ, G. F.; LEMOS, L. D.; DOS SANTOS, A. R.; DA CAMARA, A. C.; GALVAO, L. M.; BERN, C.; GILMAN, R. H.; FUJIWARA, R. T.; GAZZINELLI, R. T.; BARTHOLOMEU, D. C. Identification of strain-specific B-cell epitopes in *Trypanosoma cruzi* using genome-scale epitope prediction and high-throughput immunoscreening with peptide arrays. **PLoS neglected tropical diseases**, v.7(10), 2013.

MENEZES SOUZA, D.; MENDES, T. A. O.; NAGEM, R. A. P.; SANTOS, T. T. O.; SILVA, A. L. T.; SANTORO, M. M.; GUIMARÃES DE CARVALHO, S. F.; COELHO, E. A. F.; BARTHOLOMEU, D. C.; FUJIWARA, R. T. Mapping B-Cell Epitopes for the Peroxidoxin of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and Its Potential for the Clinical Diagnosis of Tegumentary and Visceral Leishmaniasis. **PLOS One**, v. 9(6), 2014.

MURRAY, M. An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.71, n.4, p.325-326. 1977.

NAESSENS, J.; TEALE, A. J.; SILEGHEM, M. Identification of mechanisms of natural resistance to African trypanosomiasis in cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.87, p.187-194. 2002.

OSÓRIO, A. L. A. R.; MADRUGA, C. R.; DESQUESNES, M.; SOARES, C. O.; RIBEIRO, L. R. R.; DA COSTA, S. C. G. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World - a Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, p. 1–13. 2008

PAIVA, E. **Tripanossomíase por *Trypanosoma vivax* em pequenos ruminantes: descrição de surtos e infecção experimental da doença**. 84f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Rio Grande do Norte, 2009.

PALOMARES, L. A.; ESTRADA-MONDACA, S.; RAMÍREZ, O. Production of recombinant proteins: Challenges and solutions. **Methods in Molecular biology** v.267, p. 15-51, 2004.

PASTINI, A. C.; IGLESIAS, S. R.; CARRICARTE, V. C.; GUERIN, M. E.; SÁNCHEZ, D. O.; FRASCH, A. C. Immunoassay with Recombinant *Trypanosoma cruzi* Antigens Potentially Useful for Screening Donated Blood and Diagnosing Chagas Disease. **Clinical Chemistry** v.40(10), p. 1893-1897, 1994.

PETERSEN, T. N.; BRUNAK, S.; VON HEIJINE, G.; NIELSEN, H. SignalIP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods** v.8(10), p. 785-786, 2011.

PILLAY, D.; IZOTTE, J.; FIKRU, R.; BÜSCHER, P.; MUCACHE, H.; NEVES, L.; BOULANGÉ, A.; SECK, M. T.; BOUYER, J.; NAPIER, G. B.; CHEVTZOFF, C.; COUSTOU, V.; BALTZ, T. *Trypanosoma vivax* GM6 Antigen: A Candidate Antigen for Diagnosis of African Animal Trypanosomosis in Cattle. **PLoS ONE** n. 8, v. 10, 2013.

PIMENTEL, D. S.; RAMOS, C. A. N.; RAMOS, R. A. N.; ARAÚJO, F. R.; BORBA, M. L.; FAUSTINO, M. A. G.; ALVES, L. C. First report and molecular characterization of

Trypanosoma vivax in cattle from state of Pernambuco, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.185, p.286-289. 2012.

PORROZZI, R.; DA COSTA, M. V. S.; TEVA, A.; FALQUETO, A.; FERREIRA, A. L.; DOS SANTOS C. D.; FERNANDES, A. P.; GAZZINELLI, R. T.; CAMPOS-NETO, A.; GRIMALDI JR, G. Comparative evaluation of enzyme linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. **Clinical and vaccine immunology**, v.14, n.5, p.544-548. 2007.

REBESKI, D. E.; WINGER, E. M.; ROGOVIC, B.; ROBINSON, M. M.; CROWTHER, J. R.; DWINGER, R. H. Improved methods for the diagnosis of African Trypanosomosis. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 2, p. 249-253, 1999.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology** v.5(172), 2014.

SAMPAIO, P. H. **Resposta imune-humoral e proteinogramas séricos de bovinos naturalmente infectados pelo *Trypanosoma vivax***. 58f. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista – UNESP, São Paulo, 2013.

SCHENK, M. A. M.; MENDONÇA, C. L.; MADRUGA, C. R.; KOHAYAGAWA, A.; ARAÚJO, F. R. Avaliação clínico laboratorial de bovinos Nelore infectados experimentalmente com *Trypanosoma vivax*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n.4, p. 157-161. 2001.

SEKONI, V. O. Reproductive disorders caused by animal trypanosomiasis: A review. **Theriogenology**, Stoneham, v.42, n.4, p.557-570, 1994.

SONNHAMMER, E. L.; VON HEIJNE, G.; KROGH, A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. **Proceedings International Confernce on Intelligent Systems for Molecular Biology**, v.6: p.175–182. 1998.

SERRA-FREIRE, N. M.; REZENDE, A. M. L. Stomoxys calcitrans, um vetor mecânico do *Trypanosoma vivax* no Brasil e notas sobre o comportamento do parasito no vetor. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v.11, n.1, p.77-82, 1988.

SHAW, J. J.; LAINSON, R. *Trypanosoma vivax* in Brazil. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 66, p.25-32. 1972.

SILVA, R. A. M. S.; RAMIREZ, L.; SOUZA, S. S.; ORTIZ, A. G.; PEREIRA, S. R.; DÁVILA, A. M. R. Hematology of natural bovine trypanosomosis in the Brazilian Pantanal and Bolivian wetlands. **Veterinary Parasitology**, v.85, p.87–93. 1999.

SILVA, R. A. M. S.; SEIDL, A.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R. ***Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*– Biologia, diagnóstico e controle**. EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), Corumbá, Brasil,. 140 p. 2002.

SILVA, R. A. M. S.; PELLEGRIN, A. O.; LIMA, E. S. S.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R. **Abortos por *Trypanosoma vivax* no Pantanal Mato-Grossense e Bolívia**. Embrapa, Corumbá-MS, , 21p. 2004.

SILVA, A. S.; COSTA, M. M.; POLENZ, M. F.; POLENZ, C. H.; TEIXEIRA, M. M. G.; LOPES, S.T.A.; MONTEIRO, S. G. First report of *Trypanosoma vivax* in bovines in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciência Rural**, v.39, n.8, p.2550-2554. 2009.

Stephen L. E. **Trypanosomiasis: a veterinary perspective**. 1st ed. New York: Pergamon Press. 533p. 1986.

TAYLOR, K.; AUTHIÉ, E. M. L. Pathogenesis of Animal Trypanosomiasis. In: MAUDLIN, I.; HOLMES, P.; MILES, M. **The Trypanosomiasis**. 1. ed, Wallingford: CABI Publishing, cap. 18, p. 334. 2004.

TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.72, p. 211-222. 2006.

TEIXEIRA, A. R. L.; VEXENAT, A. C. O real significado de exames sorológicos no diagnóstico de doenças endêmicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 29(4), p. 379-382, 1996.

VENTURA, R. M.; PAIVA, F.; SILVA, R. A. M. S.; TAKEDA, G.F.; BUCK, G. A.; TEIXEIRA, M. M. G. *Trypanosoma vivax*: Characterization of the Spliced-Leader Gene of a Brazilian Stock and Species-Specific Detection by PCR Amplification of an Intergenic Spacer Sequence. **Experimental Parasitology**, v. 99, p. 37–48. 2001.

ZANETTE, M. F. **Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina** 94f. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista – UNESP, São Paulo, 2006.

WOO, P. T. K. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomosis. **Acta Tropica**, v.27, p.384-386, 1970.

ZIEMANN, H. B. zur Trypanosomenfrage. **Cbl. Bakt** (I. Abt.); v.38:307-429, 1905.

ZHOU, X. H.; OBUCHOWSKI, N. A.; MCLISH, D. K.; **Statistical Methods in Diagnostic Medicine**, 1st ed. New York: John Wiley & Sons:15–164. 2002.

ANEXO A – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL (UNIUBE)**Comitê de Ética em Experimentação Animal**

Ofício CEEA-022/2013

Uberaba, 06 de junho de 2013

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 001/2013 relativo ao projeto intitulado "**Caracterização do perfil sorológico e imunofenotípico de linfócitos periféricos de bovinos infectados experimentalmente por Trypanosoma vivax**" que tem como responsável **Profa. Joely Ferreira Figueiredo Bittar**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UNIUBE) regido pela lei nº 11.794/08.

CERTIFICATE

We hereby certify that the protocol nº 006/2013 related to the project entitled "**Serological and immunological profile of peripheral lymphocyte bovine experimentally infected with trypanosome vivax**", under the supervision of **Profa. Joely Ferreira Figueiredo Bittar**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEEA/UNIUBE) according to the law nº 11.794/08.

Atenciosamente,



Prof. Dr. André Belico de Vasconcelos
Vice-Coordenador do CEEA-UNIUBE



INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento:	DIRPA	Página:
	Formulário		2/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código:	Versão:
		FQ001	2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

6. Inventor (72):

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seus nome(s), neste caso não preencher os campos abaixo.

6.1 Nome: DANIEL MENEZES SOUZA

6.2 Qualificação: PROFESSOR

6.3 CPF: 057.928.896-00

6.4 Endereço Completo: RUA JOSÉ RIBEIRO FILHO, 396, BLOCO B, APTO. 301, BAIRRO OURO PRETO,

6.5 CEP: 31.330-500

6.6 Telefone:

6.7 FAX:

6.8 E-mail:

continua em folha anexa

7. Declaração de divulgação anterior não prejudicial.

Artigo 12 da LPI – período de graça.

Informe no item 11.13 os documentos anexados, se houver.

8. Declaração na forma do item 3.2 da Instrução Normativa PR nº 17/2013:

Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

9. Procurador (74):

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço Completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 FAX:

9.8 E-mail:

continua em folha anexa

10. Listagem de seqüências biológicas.

Informe nos itens 11.9 ao 11.12 os documentos anexados, se houver.



INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento:	Formulário	DIRPA	Página:	3/3
	Título do Documento:			Código:	Versão:
Depósito de Pedido de Patente			FQ001	2	
			Procedimento: DIRPA-PQ006		

11. Documentos Anexados:

(Assinale e indique também o número de folhas):

(Deverá ser indicado o número total de somente uma das vias de cada documento).

	Documentos Anexados		folhas
<input checked="" type="checkbox"/>	11.1	Guia de Recolhimento da União (GRU).	01
<input type="checkbox"/>	11.2	Procuração.	—
<input type="checkbox"/>	11.3	Documentos de Prioridade.	—
<input type="checkbox"/>	11.4	Documento de contrato de trabalho.	—
<input checked="" type="checkbox"/>	11.5	Relatório descritivo.	17
<input checked="" type="checkbox"/>	11.6	Reivindicações.	02
<input checked="" type="checkbox"/>	11.7	Desenho(s) (se houver). Sugestão de figura a ser publicada com o resumo: nº, _____ por melhor representar a invenção (sujeito à avaliação do INPI).	01
<input checked="" type="checkbox"/>	11.8	Resumo.	01
<input checked="" type="checkbox"/>	11.9	Listagem de sequências em arquivo eletrônico: <u>2</u> nº de CDs ou DVDs (original e cópia).	—
<input checked="" type="checkbox"/>	11.10	Código de controle alfanumérico no formato de código de barras referente às listagem de sequências.	01
<input type="checkbox"/>	11.11	Listagem de sequências em formato impresso.	—
<input checked="" type="checkbox"/>	11.12	Declaração relativa à Listagem de sequências.	01
<input checked="" type="checkbox"/>	11.13	Outros (especificar) ANEXO DE INVENTORES, PORTARIA	03

12. Total de folhas anexadas: 29 fls.

13. Declaro, sob as penas da Lei que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Belo Horizonte, 23/11/2015

Local e Data

Adelina MR

Assinatura e Carimbo

Profa. Adelina Martha dos Reis
46-Reitora de Pesquis. / UFMG
Portaria nº 1.536/2014

ANEXO DE INVENTORES**Título: "MÉTODO E KIT PARA DIAGNÓSTICO DE TRIPANOSSOMÍASE BOVINA E USO"**

Página 1

Nome: TIAGO ANTÔNIO DE OLIVEIRA MENDES

Qualificação: FARMACÊUTICO-BIOQUÍMICO

CPF: 079.540.906-04

Endereço Completo: RUA ÔMEGA, 212, BAIRRO JARDIM AMÉRICA, BELO HORIZONTE, MG

CEP: 30.421-375

Telefone:

FAX:

E-mail:

Nome: EUSTÁQUIO RESENDE BITTAR

Qualificação: PESQUISADOR

CPF: 763.144.646-68

Endereço Completo: RUA PROFESSOR TERRA, 275B, BAIRRO ESTADOS UNIDOS, UBERABA, MG

CEP: 38.015-270

Telefone:

FAX:

E-mail:

Nome: GUILHERME CAETANO GARCIA

Qualificação: PESQUISADOR

CPF: 103.996.606-31

Endereço Completo: RUA ODILON FERNANDES, 205, APTO. 901, CENTRO, UBERABA, MG

CEP: 38.017-030

Telefone:

FAX:

E-mail:

Nome: MÁTHEUS FERNANDES COSTA SILVA

Qualificação: PESQUISADOR

CPF: 067.432.246-00

Endereço Completo: RUA JOSÉ RIBEIRO FILHO, 396, BLOCO B, APTO. 601, BAIRRO OURO PRETO, BELO HORIZONTE, MG

CEP: 31.330-500

Telefone:

FAX:

E-mail:

Nome: OLINDO ASSIS MARTINS FILHO

Qualificação: PESQUISADOR

CPF: 512.097.726-04

Endereço Completo: RUA DOS ESTADOS, 601, APTO. 203, BAIRRO SANTA AMÉLIA, BELO HORIZONTE, MG

CEP: 31.560-030

Telefone:

FAX:

E-mail:

ANEXO DE INVENTORES**Título: "MÉTODO E KIT PARA DIAGNÓSTICO DE TRIPANOSSOMÍASE BOVINA E USO"**Página 2

Nome: MÁRCIO SOBREIRA SILVA ARAÚJO

Qualificação: PESQUISADOR

CPF: 818.211.906-53

Endereço Completo: RUA JUVENAL DOS SANTOS, 440, APTO. 402, BAIRRO LUXEMBURGO, BELO HORIZONTE, MG

CEP: 30.380-530

Telefone:

FAX:

E-mail:

Nome: JOELY FERREIRA FIGUEIREDO BITTAR

Qualificação: PESQUISADORA

CPF: 866.327.016-04

Endereço Completo: RUA PROFESSOR TERRA, 275 B, BAIRRO ESTADOS UNIDOS, UBERABA, MG

CEP: 38.015-270

Telefone:

FAX:

E-mail:
