

Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas  
Departamento de Genética  
Curso de Pós-Graduação em Genética



**Sequenciamento e caracterização  
de genes identificados como  
codificantes para proteínas  
antigênicas de *Leishmania  
chagasi***

**CHEILA NATALY GALINDO BEDOR**

**Recife, 2003**

**Sequenciamento e caracterização  
de genes identificados como codificantes para antígenos  
de *Leishmania chagasi***

**Cheila Nataly Galindo Bedor**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética da  
Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do grau de Mestre  
em Genética

**Orientador: Dr Osvaldo Pompílio de Melo Neto**

Banca examinadora composta pelos seguintes membros:

---

Dr marcos Antônio de Moraes Junior – UFPE/LIKA

---

Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres-CpQAM/FIOCRUZ

---

Dra. Maria Raquel Moura Coimbra – UFRPE

---

Dra Ana Maria Benko Iseppon – UFPE/CCB/Genética (suplente)

---

Dra. Nilma Cintra Leal – CpQAM/FIOCRUZ (Suplente)

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto, pela confiança que depositou em mim.

Aos meus amigos do Departamento de Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, por todo companheirismo.

Aos companheiros dos departamentos de Entomologia e Imunologia do Centro de pesquisas Aggeu Magalhães.

Ao Departamento de Imunologia do Centro de pesquisas Gonçalo Moniz, pelo suporte técnico/ científico/ financeiro.

E a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

"Se não houver frutos, valeu a beleza das flores. Se não houver flores, valeu a sombra das folhas. Se não houver folhas, valeu a intenção das sementes."

Henfil , humorista e cartunista brasileiro.

## **NOTA:**

Como os resultados apresentados nesse trabalho serão submetidos a patente, o nome das proteínas e alguns detalhes sobre elas não serão mostrados. É válido salientar ainda, que após serem patenteados esses dados poderão ser anexados à tese.

# SUMÁRIO

Lista de Figuras e Tabelas .....	08
Lista de abreviações .....	09
Resumo.....	10
Abstract.....	11
I – Introdução.....	12
II – Revisão bibliográfica.....	14
1. <i>Leishmania</i> .....	14
1.1 Histórico.....	14
1.2 Quadro geral.....	15
1.3 Taxonomia.....	16
1.4 Ciclo biológico.....	17
1.5 Transmissão e reservatório.....	19
1.6 Morfologia e reprodução.....	20
1.7 Genoma do gênero <i>Leishmania</i> .....	22
2. <i>Patogênese</i> .....	23
2.1 Leishmaniose Tegumentar.....	23
2.2 Leishmaniose Visceral.....	23
2.3 Tratamento.....	24
3. <i>Aspectos Imunológicos</i> .....	25
3.1 Resposta imune.....	25
3.2 Vacinas.....	26
4. <i>Diagnóstico para Leishmaniose Visceral</i> .....	28
5. <i>Moléculas antigênicas</i> .....	31
6. Uma breve revisão sobre sequenciamento e análise computacional de seqüências.....	36
6.1 Sequenciamento.....	36
6.2 Análise computacional das seqüências.....	37
7. <i>Referências Bibliográficas</i> .....	39
III - Artigo Científico.....	50

## Lista de Figuras e Tabelas

<b>Figura I</b> - Distribuição de Leishmaniose Visceral na América Latina.....	15
<b>Figura II</b> – Ciclo de vida da <i>Leishmania chagasi</i> .....	19
<b>Figura III</b> – Esquema das formas de <i>Leishmania</i> .....	21
<b>Figura IV</b> - Esquema simplificado da reação de sequenciamento.....	37
<b>Tabela I</b> – Posição sistemática do gênero <i>Leishmania</i> .....	16
<b>Tabela II</b> – Algumas espécies de <i>Leishmania</i> , suas localizações e respectivas Patologias.....	18

## Lista de Figuras e Tabelas do artigo

<b>Figura 1</b> – Digestão dos plasmídeos .....	71
<b>Figura 2</b> – Esquema e resultado do sequenciamento dos clones LC 9 e LC 12.....	72
<b>Figura 3</b> – Esquema da proteína codificada pelos clones LC 9 e LC 12 .....	73
<b>Figura 4</b> – Esquema e resultado do sequenciamento dos clones LC 14 e LC 16. ...	74
<b>Figura 5</b> – Esquema da proteína codificada pelos clones LC 14 e LC 16.....	75
<b>Figura 6</b> – Esquema e resultado do sequenciamento parcial do clone LC 18.....	76
<b>Figura 7</b> – Digestões do clone LC 30.....	77
<b>Figura 8</b> – Esquema do sequenciamento do clone LC 30.....	78
<b>Figura 9</b> – Esquema da seqüência da região do cromossomo LC 16 de <i>L. major</i> que possui homologia com o clone LC 30.....	79
<b>Tabela 1</b> - Tamanho aproximado dos fragmentos obtidos por digestões com as enzimas dos sítios de clonagem.....	70

## Lista de Abreviações

GP46 – Glicoproteína 46

GP63 – Glicoproteína 63

HSP – Proteína de choque térmico

I $\gamma$  - Interferon gama

IL2 – Interleucina 2

IL4 – Interleucina 4

IL5 – Interleucina 5

IL10 – Interleucina 10

IL12 – Interleucina 12

kDa – Kilo Dalton

LACK – Homólogo de *Leishmania* dos receptores para a cinase C ativada

LT – Leishmaniose Tegumentar

LV – Leishmaniose Visceral

Mb – Mega Base

ORF – Seqüência aberta de leitura

SDS PAGE – Gel de polacrilamida em condições desnaturantes

UTR – Região não traduzível



## RESUMO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma enfermidade potencialmente fatal, sendo no Brasil causada pela *Leishmania chagasi* com cerca de 3.500 novos casos por ano. Está presente em quase todo o território brasileiro, mas o maior número de casos ocorre em áreas onde os serviços de saúde são pouco desenvolvidos, o que dificulta seu diagnóstico baseado principalmente nos sintomas clínicos, também comuns a outras doenças. Por esse motivo e pela falta de um tratamento não tóxico muitos trabalhos buscam estratégias que permitam um diagnóstico rápido e confiável ou a produção de uma vacina.

Em um estudo anterior, foram selecionados genes codificantes para proteínas antigênicas de *L. chagasi* que se mostraram capazes de reagir com anticorpos de cães infectados por esse parasita e seres humanos portadores de calazar. No presente trabalho, esses genes foram seqüenciados e as seqüências analisadas para a caracterização das respectivas proteínas. Os resultados obtidos mostraram que 6 dos clones codificam 4 proteínas diferentes, compostas por regiões contendo múltiplos domínios repetitivos de tamanhos diferentes e não relacionados entre si. Essas repetições sugerem que, ao menos em *L. chagasi*, proteínas com regiões repetitivas podem ser melhor indutoras de imunidade humoral, podendo ser então candidatas a componentes de sistemas de diagnóstico contra a leishmaniose visceral.

## ABSTRACT

The Visceral Leishmaniasis (VL) is a potentially fatal disease caused by *Leishmania chagasi* in Brazil, responsible for about 3.500 new cases each year. It is present in almost all the Brazilian territory, but it occurs mainly in areas where the health services are scarce. Due to the difficulties in the diagnosis of VL in low income areas and the lack of non toxic treatment, many studies aim the development of strategies for a fast and reliable diagnosis of VL or the production of a vaccine against this disease.

In previous studies, genes were selected which codify for antigenic proteins from *L. chagasi* capable of reacting with sera from dogs infected with this parasite or from humans with Calazar. In the present work these genes were sequenced and the resulting sequences analyzed for the characterization of the corresponding proteins. Our results show that these clones codify proteins composed of regions that contain multiple repetitive domains. Among the different proteins these domains are unrelated and of different sizes, suggesting that, at least in *L. chagasi*, proteins with repetitive regions can be better inducers of humoral immunity and therefore could be good candidates as components of kits for the diagnostic of visceral leishmaniasis.

## I. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é considerada pela Organização Mundial de Saúde uma das seis doenças mais importantes dos países tropicais (Wright e El Amin, 1989) e está presente em quase todo o território brasileiro. É causada por protozoários do gênero *Leishmania*, os quais são transmitidos por flebotomíneos, sendo capazes de se multiplicar em vários hospedeiros mamíferos.

Dependendo de fatores como, a espécie do parasita e a resposta imune do hospedeiro, a leishmaniose pode se manifestar em forma de lesões cutâneas ou viscerais. Cerca de 500.000 casos de LV ocorrem no mundo a cada ano (Monroy-Ostria et al., 2000). No Brasil a infecção acomete principalmente crianças com aproximadamente 3 anos de idade, sendo mais freqüente no interior da região nordeste (D'Oliveira Júnior et al., 1997).

Devido ao padrão epidemiológico diversificado e à variedade de espécies de *Leishmania*, a doença não pode ser controlada com medidas preventivas como redução dos vetores, eliminação dos reservatórios, proteção pessoal e vigilância (Grimaldi Jr, 1995). As drogas usadas no tratamento são tóxicas para o organismo dos pacientes e há também grande dificuldade para obtenção de um diagnóstico rápido e confiável, uma vez que os sintomas clínicos são comuns a outras doenças e os testes sorológicos dão em sua maioria reações cruzadas (Ferreira e Ávila, 1996; Liart et al., 2001). Por esses motivos, muitos trabalhos procuram identificar novos antígenos parasitários que possam ser utilizados na imunoterapia, no melhoramento das técnicas para diagnóstico ou no desenvolvimento de uma vacina contra a leishmaniose.

Em um trabalho prévio realizado pela equipe do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, foram selecionados genes codificantes para proteínas antigênicas de *Leishmania chagasi*. Essas proteínas se mostraram capazes de reagir com anticorpos de cães infectados por *L. chagasi* (cães de áreas endêmicas apresentando sorologia positiva para antígenos brutos deste parasita) e com seres humanos portadores de calazar.

**Objetivo Principal** - O objetivo principal deste estudo foi seqüenciar esses genes e analisar as seqüências obtidas para caracterização das respectivas proteínas.

**Objetivos específicos foram:**

- Montagem das estratégias de sequenciamento dos genes que codificam proteínas antigênicas de *L. chagasi*.
- Desenho de oligonucleotídeos internos para o sequenciamento completo.
- Subclonagens para conclusão do sequenciamento.
- Caracterização das proteínas através da análise de homologia com seqüências disponíveis em bancos de dados.
- Identificação de motivos antigenicamente relevantes nas proteínas caracterizadas.

## II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A leishmaniose compreende um grupo de doenças classificadas de acordo com os sintomas clínicos e a espécie de *Leishmania* responsável pela infecção. As patologias se distinguem em duas principais categorias: a leishmaniose tegumentar (LT) ou cutânea e a leishmaniose visceral (LV). Sendo o objetivo principal desse trabalho seqüenciar e caracterizar antígenos de *Leishmania chagasi*, essa revisão bibliográfica se detém em muitos aspectos a essa espécie e a doença causada por ela: a leishmaniose visceral.

### 1. *Leishmania*

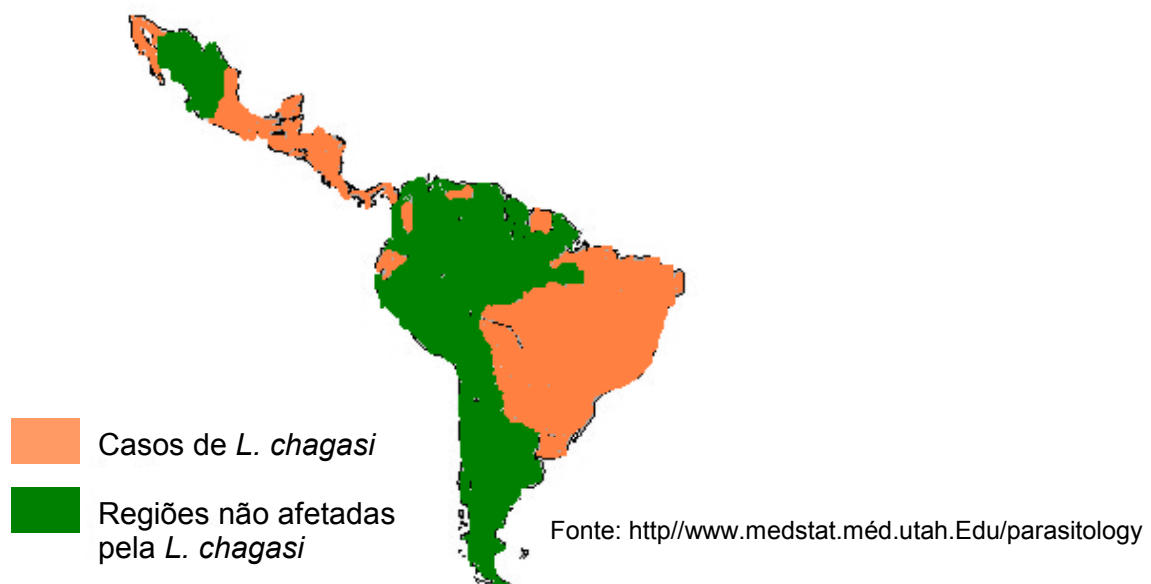
#### 1.1 Histórico

Os parasitas do gênero *Leishmania* provavelmente surgiram durante o período Mesozóico. Com a separação dos continentes no começo do Cenozóico, algumas espécies vieram para o Continente Americano acompanhando a migração dos hospedeiros roedores (Shaw, 1994). Há registros de desenhos de pessoas com lesões na pele e deformidades faciais, semelhantes às da leishmaniose, em cerâmicas pré-colombianas do Peru e Equador que datam do primeiro século depois de Cristo (Neves, 1991). Contudo as primeiras descrições do protozoário *Leishmania* foram separadamente feitas em 1903 por William Leishman e Charles Donovan em tecido esplênico de pacientes indianos que sofriam de uma doença fatal (Herwaldt, 1999). Na América do Sul o primeiro caso de leishmaniose visceral foi relatado no Paraguai por Migone em 1913 em um paciente que contraiu a doença no Estado do Mato Grosso, Brasil. Em 1934, Penna relatou a identificação do parasita no Brasil (Neves, 1991).

## 1.2 Quadro geral

A Organização Mundial de Saúde estima que 12 milhões de pessoas em 88 países são acometidas por diferentes tipos de leishmaniose, sendo que a cada ano surgem 2 milhões de novos casos e 350 milhões de pessoas vivem em situação de risco (Monroy–Ostria, 2000).

A leishmaniose visceral é endêmica nas áreas tropicais e subtropicais da África, Ásia, Mediterrâneo, Sudeste da Europa e na América Central e do Sul (Akhter, 1998 a; Gomes et al., 1998). No Brasil são registrados cerca de 3.500 novos casos por ano, distribuídos em 17 estados (FUNASA, 2002), como é mostrado na figura I. A doença é altamente endêmica no estado da Bahia e do Ceará, onde ocorrem cerca de 70% do total de casos (Akhter, 1998 a).



**Figura I:** Distribuição de Leishmaniose Visceral na América Latina.

Embora a LV afete mais as áreas rurais, o número de casos tem aumentado de forma significativa em regiões peri-urbanas do Brasil, como nas cidades de Sobral e Russas (Ceará), Teresina (Piauí), Jacobina (Bahia), Rio de Janeiro (Rio de Janeiro) e Natal (Rio Grande do Norte) (Aguillar et al., 1998). Isso talvez seja resultado da migração de pessoas para as cidades nos últimos 20 anos, que além de aumentar consideravelmente o número de infectados teve também como consequência um grande aumento desse número em famílias de baixa renda social (Peacock et al., 2001).

### 1.3 Taxonomia

O parasita *Leishmania* apresenta a classificação taxonômica descrita na tabela I:

**Tabela I:** Posição sistemática do gênero *Leishmania*

Categoria taxonômica	Nome
Reino	Protista
Filo	Sarcomastigophora
Classe	Zoomastigophorea
Ordem	Kinetoplastida
Família	Trypanosomatidae
Gênero	<i>Leishmania</i>

Devido ao grande número de espécies, aproximadamente 21 (Herwaldt, 1999), a taxonomia desse parasita é um processo dinâmico; várias classificações já foram propostas para os subgêneros, elas se baseiam em diversos métodos de caracterização genética como eletroforese isoenzimática, análise do DNA, além de

estudos da morfologia e desenvolvimento do protozoário dentro do inseto vetor e do hospedeiro (Shaw, 1994, Victoir et al., 1998).

A classificação mais usada foi criada por Lainson e Shaw em 1987 (Gontijo et al., 1995; Momen e Cupolillo, 2000), que dividiu as espécies encontradas nos mamíferos em 2 subgêneros, de acordo com a localização do parasita no vetor:

- Subgênero *Leishmania*: constituído pelas espécies que são encontradas no intestino médio do vetor.
- Subgênero *Viannia*: constituído pelas espécies que se desenvolvem na região posterior do intestino do inseto vetor.

Ao todo são conhecidas oito espécies do subgênero *Viannia* que infectam o homem no Novo Mundo e 13 do subgênero *Leishmania*, espalhadas por várias regiões do planeta (Degraeve et al., 1994; Shaw, 1994). A tabela II mostra a classificação de algumas espécies. Uma variante dessa classificação é que muitos autores consideram a *L. chagasi*, como possível sinônimo da *Leishmania infantum* ou ainda, originada de linhagens desta que foram trazidas para o Novo Mundo (Maurício et al., 2000; Momen e Cupolillo, 2000),

#### 1.4 Ciclo biológico

Os parasitas do gênero *Leishmania* têm um ciclo dimórfico (Joshi et al., 2002). Após a picada do inseto são repassadas para os hospedeiros as formas promastigotas do protozoário que são então fagocitadas pelos macrófagos. Essa interação parasita-macrófagos tem um papel importantíssimo para o estabelecimento da infecção (Chakrabarty et al., 1996). Duas moléculas são de grande importância para que isso ocorra: os lipofosfoglicanos (LPG), expressos na



**Tabela II:** Algumas espécies de *Leishmania*, suas localizações e respectivas patologias (Degraive et al., 1994; Neves, 1991).

Subgêneros		
<i>Leishmania</i>		<i>Viannia</i>
Velho mundo	Novo mundo	Novo mundo
<i>donovani</i> *	<i>chagasi</i> *	<i>braziliensis</i> #
<i>tropica</i> **	<i>mexicana</i> **	<i>peruviana</i> #
<i>infantum</i> *	<i>amazonensis</i> **	<i>guyanensis</i> #
<i>major</i> **	<i>venezuelensis</i> **	<i>panamensis</i> #

\* Espécie transmissora da leishmaniose visceral

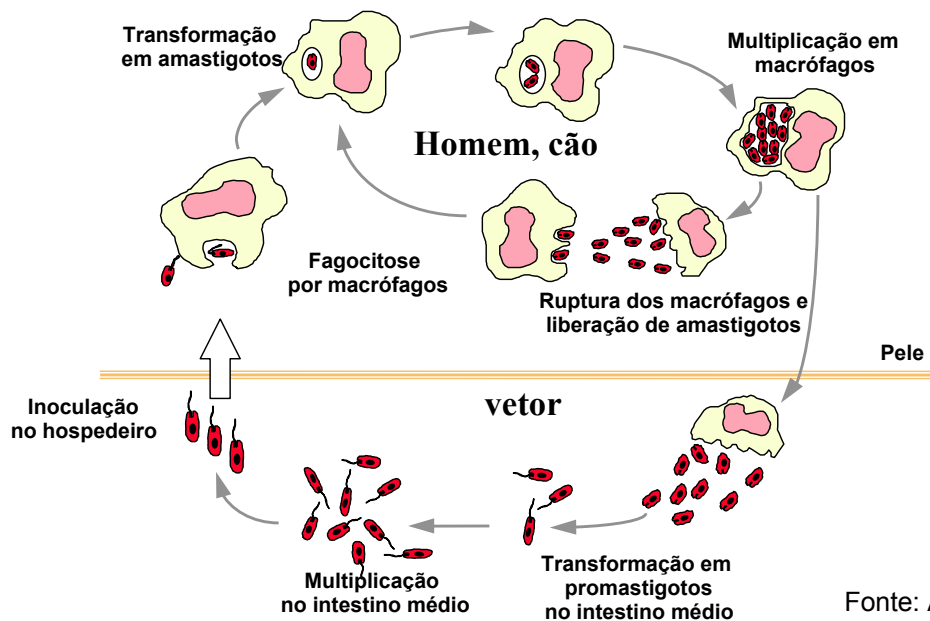
\*\* Espécies que transmitem a leishmaniose cutânea localizada ou difusa

# Espécies que transmitem a leishmaniose cutânea ou cutâneo – mucosa

superfície de todos os promastigotas, que têm como função principal inibir a biogênese fagolisossomal (Pimenta et al., 1992), e a glicoproteína GP63, que protege os parasitas da citólise intrafagolisossomal e da degradação (Alexander et al., 1999; Bogdan e Rollingroff 1998). Uma vez dentro dos macrófagos, as formas promastigotas se transformam nas amastigotas, que são infectivas, se multiplicam,

provocam a lise da célula eucariótica e passam para o sangue periférico para novamente serem fagocitadas.

Ao serem ingeridas pelo inseto vetor as formas amastigotas se diferenciam novamente em promastigota e após a multiplicação podem ser encontradas na parte posterior do intestino ou no piloro do inseto dependendo da espécie do parasita. (Gontijo et al., 1995). A figura II ilustra o ciclo de vida da *L. chagasi*.



**Figura II:** Ciclo de vida da *Leishmania chagasi*.

### 1.5 Transmissão e reservatório

A transmissão da leishmaniose é feita pelas fêmeas de insetos dípteros do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomia* no Novo Mundo (Alexander et al., 1999). A *L. chagasi* é transmitida pela *Lutzomia longipalpis*, inseto de 2 a 3 mm de comprimento e hábitos noturnos (Akhter, 1998 b) e que no Brasil pode ser conhecido

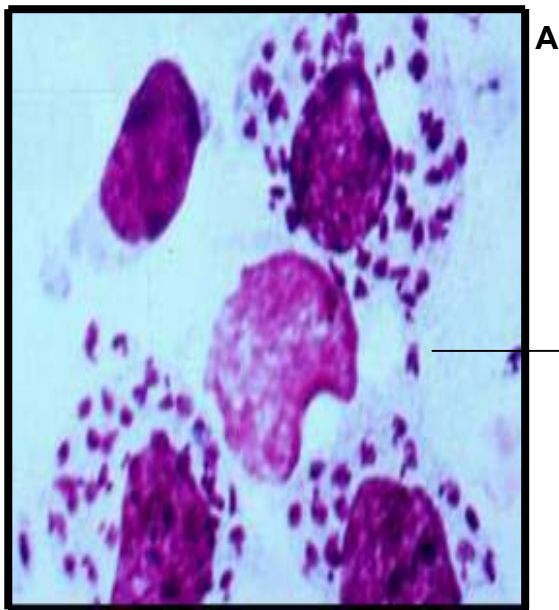
como: mosquito prego, pula-pula, mosquito palha, entre outras denominações populares.

O principal reservatório da *L. chagasi* no Brasil é o cão (Costa et al., 1999), que mesmo assintomático é infectivo para os vetores (Gradoni, 2001). Muitos autores acreditam que a carga parasitária do homem não é suficiente para infectar o *Lutzomia longipalpis*, porém um trabalho feito por Costa e colaboradores mostrou que pessoas com LV ativa podem infectar o vetor e que crianças com menos de quatro anos são mais infectivas do que outras crianças e adultos (Costa et al., 2000).

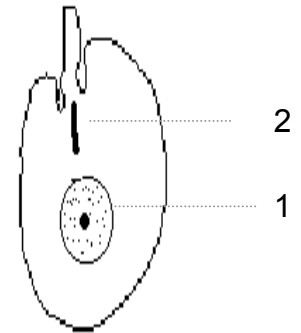
### 1.6 Morfologia e Reprodução

As várias espécies de *Leishmania* podem ser encontradas na forma promastigota flagelar extracelular no trato alimentar do inseto vetor e na forma amastigota no interior dos vacúolos fagolisossomais dos macrófagos dos hospedeiros vertebrados (Wright and El Amin, 1989; Zilberstein and Shapira, 1994). A forma amastigota tem entre 3 e 7 micrômetros de diâmetro, são esféricas e sem motilidade (Figura III A). Já os promastigotas são alongados com 10 a 20 micrômetros (Akhter, 1998 b) (Figura III B). As mudanças morfológicas sofridas pelo parasita durante seu ciclo celular parecem ser induzidas por diferenças na temperatura, no pH e na composição química do hospedeiro e do vetor (Schneider et al., 1992).

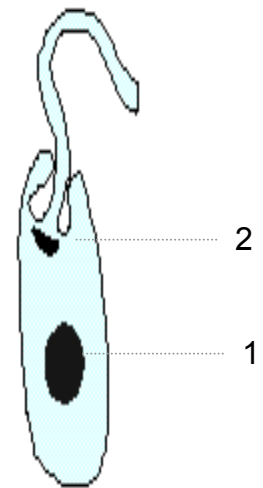
A multiplicação do parasita ocorre por mecanismos assexuados (divisão binária simples), embora ele use a recombinação sexual para se adaptar às mudanças ambientais que ocorrem durante o ciclo celular (Victoir and Dujardim, 2002). A divisão celular se inicia com a produção de um segundo flagelo, que sempre permanece menor que o original, e com mudanças na morfologia,



A



B



Fonte: [http:// www. medstat. med. utah. edu/parasitology](http://www.medstat.med.utah.edu/parasitology)

**Figura III:** Fotomicrografias e representação esquemática das formas de *Leishmania*.

A amastigotas, B promastigotas, 1 núcleo, 2 cinetoplasto.

provavelmente devido à replicação do DNA. Em seguida o núcleo e o cinetoplasto dividem-se em dois e o corpo do parasita se separa longitudinalmente pela região anterior para produzir duas pequenas promastigotas ou amastigotas, dependendo de quem deu origem à divisão (Neves, 1991).

### 1.7. Genoma do gênero *Leishmania*

O tamanho do genoma do gênero *Leishmania* é de aproximadamente 35 Mb organizados em 36 pares de cromossomos, nos quais cerca de 30% consiste em seqüências repetitivas que resultam da região telomérica, microsátélites, transposons e repetições de algumas famílias de genes dispersos. Em geral as espécies de *Leishmania* parecem ter um genoma diplóide relativamente rico em conteúdo GC, alcançando aproximadamente 65% (Ivens e Blackwell, 1999).

As seqüências repetitivas têm sido extensivamente usadas para estudos da variação entre esse gênero, e análises de microsátélites mostram uma alta similaridade entre as diferentes espécies (Rodriguez et al., 1997). Porém, diferentes isolados mostram que existe polimorfismo no tamanho dos cromossomos, principalmente na região sub-telomérica (Ivens e Blackwell, 1999), o que leva a um cariótipo heterogêneo no genoma desse parasita.

A *L. major* é a espécie escolhida para sequenciamento do gênero *Leishmania*. Seu genoma está sendo seqüenciado pelo “Sanger Center”, Cambridge (UK), e os dados são depositados no site desse grupo: <http://www.sanger.ac.uk/projects/L.major>. Além disso, outras seqüências de várias espécies de *Leishmania* vêm sendo depositadas em bancos de dados como o NCBI (National Center for Biotechnology Information) – <http://ncbi.nlm.nih.gov/>, o qual fornece também ferramentas para a caracterização de novas moléculas.

## **2. Patogênese**

### **2.1 Leishmaniose Tegumentar**

A leishmaniose tegumentar caracteriza-se por lesões da pele e da mucosa. As lesões cutâneas são localizadas ou disseminadas e podem evoluir para cura espontânea. As lesões da mucosa geralmente comprometem o trato respiratório ou digestivo alto, causando deformidades e podendo ser letal por acometimento respiratório (Neves, 1991; Herwaldt, 1999).

### **2.2 Leishmaniose Visceral**

A leishmaniose visceral é conhecida por diversos nomes em todo o mundo como, febre dundum e Kala-azar na Índia, leishmaniose infantil no Mediterrâneo e Calazar, no Brasil. Os sintomas variam entre os indivíduos e a região geográfica, mas em geral caracterizam-se por febre, anemia, perda de peso e tosse irritante; além desses, podem ocorrer hepatoesplenomegalia e intensa palidez da pele e mucosa (Akhter, 1998 c; Buates e Matlashewki, 1999). O período de incubação varia de 4 a 10 meses, mas pode chegar a 4 anos (WHO, 1997).

No cão, os principais sintomas são lesões de orelhas, onicogrifose (crescimento exagerado das unhas) e ferimento na pele. No Brasil, o calazar canino é considerado do ponto de vista epidemiológico mais importante do que a doença humana porque além do grande número de cães infectados, eles servem como fonte de infecção para a *L. longipalpis* e reservatório para a doença humana (Neves, 1991).

## 2.3 Tratamento

No Brasil, a droga normalmente escolhida para o tratamento das leishmanioses é o antimoniato de N–metil glucamina (Glucantime<sup>®</sup>), que age inibindo a atividade glicolítica e a via oxidativa (Akhter, 1998 d) e foi introduzida mundialmente em 1940. Essa droga possui efeitos limitados e entre muitas das desvantagens, está a aplicação parenteral, a longa duração de terapia e os efeitos colaterais como: náuseas, diarreia, convulsões e alterações do eletrocardiograma (Herwaldt, 1999). Em pacientes coinfectados com o vírus HIV ela é ineficiente e muito mais tóxica (Fichoux et al., 1998).

A droga de segunda escolha é a Anfotericina B, que age nos esteróis e fosfolipídios da membrana celular das várias espécies de *Leishmania* (Akhter, 1998 d), é também altamente tóxica e cara para ser usada em países em desenvolvimento (Buates e Matlashewski, 1999).

As drogas contra a leishmaniose usadas na terapia da LV humana têm eficácia limitada nos cães (Gradoni, 2001).

Pelos motivos expostos, novas drogas com ações menos tóxicas e de melhor eficácia têm sido testadas, entre elas a “Imiquimod” e a S-28463, que tem mostrado estimular a atividade antileishmanicida nos macrófagos e a indução da síntese de óxido nítrico por estes (Buates e Matlashewski, 1999), e a Hixadecilfosfocolina (HDPC) que também tem efeitos leishmanicidas em ratos infectados com *Leishmania infantum* (Fichoux et al., 1998).

### 3. Aspectos imunológicos

#### 3.1 Resposta Imune

O mecanismo imunológico envolvendo o controle da leishmaniose é bastante complexo, mas é dessa resposta que depende a evolução e severidade da infecção. Quando os hospedeiros entram em contato com os promastigotas respondem com processos mediados pelo complemento, mas os parasitas do gênero *Leishmania* utilizam os receptores do complemento para efetuar a penetração nos macrófagos evitando assim sua destruição pelos produtos tóxicos dessa via (Roitt et al., 1999). Depois de estabelecida a interação com os macrófagos, esses parasitas conseguem sobreviver ao processo de fagocitose e resistir ao meio ácido rico em proteases no fagolisossomo (Bogdan and Rollinghoff, 1998).

A progressão da LV está relacionada com a ativação das células CD4<sup>+</sup> Th2 (Skeiky et al., 1997) que aumenta a sobrevivência do parasita e exacerba as lesões (Abbas et al., 2000). Esse grupo celular produz as interleucinas IL-4, IL-5 e IL-10 e é responsável pela ativação de células B para a produção de anticorpos (Cox, 1997). A expressão dessas interleucinas associadas às células Th2 suprime a proliferação e função das células CD4<sup>+</sup> Th1 (Mossalayi et al., 1999; Skeiky et al., 1995) produtora do IFN- $\gamma$  e das IL-2 e IL-12, que conferem aumento da resistência do hospedeiro (Gomes et al., 1998; Wilson et al., 1995). Isto estimula a ativação do complemento e a opsonização nas células fagocitárias para a ativação dos macrófagos e destruição do parasita.

Em áreas de transmissão de *L. chagasi*, a maioria dos infectados desenvolvem um quadro assintomático ou sub – clínico de infecção, que está associado à síntese do IFN- $\gamma$ . O desenvolvimento da LV é caracterizado por uma



baixa produção desse fator que é considerado o mais importante ativador de macrófagos para matar os parasitas (Costa et al., 1999).

### 3.2 Vacinas

Tendo em vista a dificuldade do sistema imune do hospedeiro em responder com eficiência ao ataque das espécies de *Leishmania* e a falta de um tratamento eficaz, um dos maiores desafios é o desenvolvimento de uma vacina segura que proteja o hospedeiro e não cause qualquer efeito adverso.

Quando se pensa em desenvolver uma vacina para doenças parasitárias, algumas questões devem ser levadas em conta como: quais moléculas serão usadas como antígeno? Qual a via de inoculação? E qual o tempo necessário para uma imunidade satisfatória? (Cox, 1997). Trabalhando nessas questões as vacinas contra a leishmaniose têm sido divididas em duas categorias:

➤ Vacinas de primeira geração:

Produzidas com parasitas mortos. No Brasil, Mayrink e colaboradores, em 1979, utilizaram um sonicação de quatro a cinco diferentes cepas de *Leishmanias* e conseguiram reverter o teste de Montenegro em resultados positivos em apenas 50% dos indivíduos, teste usado há várias décadas para diagnosticar infecções por *Leishmanias* e feito com o uso de parasitas mortos. Este estudo deu início a produção comercial de uma vacina composta por apenas uma cepa de *Leishmania amazonensis*, a LEISHVANCIN® (Biobrás, S/A) (Engers et al., 1996;). Essa vacina hoje está sendo desenvolvida com o uso de adjuvantes (Follador et al., 2002).

➤ Vacinas de segunda geração:

São subdivididas em 3 categorias:

- Vacinas com organismos vivos – estratégias para a produção de vacinas com bactérias recombinantes ou vírus expressando antígenos leishmaniais têm sido bastante estudadas. A tentativa de produzir uma vacina oral utilizando *Salmonella typhimurium* expressando a GP63 de *L. major* demonstrou estabilidade para desenvolver uma resposta Th1 em camundongos (Xu et al., 1995).

- Vacinas de subunidades definidas – várias moléculas antigênicas recombinantes tem sido estudadas, entre elas a GP63 que está sendo testada como vacina em murinos e associada a adjuvantes, mostrando bons resultados contra a leishmaniose (Frankenburg et al., 1996). Além dessa, a LACK tem se mostrado um potente imunógeno em camundongos, quando administrado junto com a IL-12 (Engers et al., 1996).

- Frações antigênicas – Uma fração protéica de 67 a 94 KDa isolada de promastigotas de *L. infantum* ou de *L. major*, denominada F2, induziu uma resposta protetora em camundongos BALB/C que apresentaram os macrófagos com atividade leishmanicida quando infectados com *L. major* e *L. mexicana* (Fromel et. al., 1988). Essa mesma fração purificada em promastigotas de *L. brasiliensis*, chamada de LbbF2, teve resultados comparáveis ao da quimioterapia convencional, quando usada em pacientes com leishmaniose cutânea (Monjour et al., 1994).

Além dessas, existem ainda as vacinas de DNA que têm mostrado induzir atividade protetora em um número experimental de modelos de infecção (Gradoni, 2001). Porém, essa estratégia ainda tem que ser mais estudada devido ao pouco conhecimento do seu mecanismo de ação e dos riscos desconhecidos que poderiam ser causados por esse tipo de vacina.

Como o cão é o principal reservatório para a *L. chagasi*, é de grande importância para países endêmicos em leishmaniose visceral, o desenvolvimento de uma vacina para esses animais, para isso alguns pontos devem ser considerados:

- A vacina deve preferivelmente induzir uma alta resposta Th1.
- Os adjuvantes devem ser mais bem estudados em cães.
- Deve ser dada mais atenção aos estudos em condições experimentais e naturais, uma vez que algumas vacinas que mostram serem boas na fase II (fase em que se testa, a segurança das doses e os efeitos colaterais a curto prazo, em um número pequeno de animais), quando usadas nos cães na fase III (Testes em um grande número de animais, pra certificar que a vacina impede o estabelecimento da doença e não apresenta efeitos colaterais) tem seus efeitos diminuídos.
- A vacina deve proteger o animal contra a infecção e não apenas da doença, porque quando infectado, mesmo sem os aspectos clínicos, o cão continua transmitindo o parasita para o vetor.
- A proteção conferida pela vacina deve durar por um longo período de tempo, já que a leishmaniose canina pode ter um longo período de incubação antes dos sintomas aparecerem (Gradoni, 2001).

#### *4. Diagnóstico para Leishmaniose visceral.*

Preliminarmente o diagnóstico é baseado nos sintomas clínicos, mas algumas doenças apresentam condições similares como: malária, febre recorrente, abscessos hepáticos e tripanossomíase (Akhter, 1998 d), sendo assim complicado o diagnóstico clínico isolado.

### ➤ Diagnóstico parasitológico

Baseia-se na visualização do parasito. Mas são métodos que trazem riscos para o paciente porque são invasivos, dolorosos e requerem uma equipe muito bem treinada.

- Biópsia de baço e fígado

A punção hepática oferece resultados questionáveis pela pequena expressão do parasitismo nesse órgão, e a punção do baço pode levar a ruptura do órgão e a hemorragias fatais (Neves, 1991).

- Punção de medula óssea

Para detecção do parasita, depois do aspirado, são feitas duas lâminas e reserva-se o restante do material para inoculação em meios de cultivo. Nos pacientes com formas agudas, a positividade é de 80 a 90%, mas nas formas subclínicas é inferior a 10 % (Ferreira e Ávila, 1996).

### ➤ Diagnóstico sorológico

O diagnóstico sorológico é baseado na presença de anticorpos séricos específicos e diversos métodos estão disponíveis para a detecção desses anticorpos, mas há alguns problemas a serem solucionados como: a produção do antígeno, que não é disponível comercialmente e sua padronização (Reed, 1996).

- Teste de formol – gel

É um dos mais antigos testes para a LV ainda em uso. Não é um teste específico porque é baseado na detecção de níveis elevados de IgG e IgM, que são encontrados também em outras doenças. Possui a vantagem de ser barato e de simples execução. O soro obtido do sangue é misturado com uma gota de 30% de formaldeído, a reação é positiva quando em 20 minutos há a formação de um precipitado branco opaco.

Testes em pacientes com LV podem não ser positivos até 3 meses depois da infecção e tornam-se negativos apenas 6 meses após a cura (Akhter, 1998 d).

- Reação de fixação de complemento (RFC)

É um teste ainda bastante utilizado no diagnóstico do calazar humano e canino por apresentar uma sensibilidade muito boa. Em infectados são observados títulos elevados de anticorpos no soro, mas títulos menores necessitam de confirmação por outras metodologias, porque podem apresentar reações cruzadas com doença de chagas, sífilis e blastomicose (Neves, 1991).

- Teste de imunofluorescência indireta (IFI)

É amplamente usado desde 1964 e utiliza parasitas íntegros fixados em lâminas. É considerado positivo com títulos iguais ou superiores a 1:32, mas freqüentemente são verificadas reações cruzadas com soros de chagásicos, tuberculosos e hansênicos (Ferreira e Ávila, 1996).

- Teste de aglutinação direta (DAT)

Foi descrito inicialmente em 1975 por Allain e Kagan (Ferreira e Ávila, 1996). É um teste simples, com alta sensibilidade, especificidade e reprodutividade, de fácil manuseio e não requer equipamentos especializados. Sua limitação é o longo tempo de incubação (18 h) (Schallig et al., 2002). Outra desvantagem é que o DAT é incapaz de distinguir entre infecções precoces e depois da cura.

- Ensaio de imunoadsorção enzimático indireto (ELISA)

O antígeno utilizado é preparado a partir de promastigotas e o teste pode ser feito em soro, plasmas ou uma gota de sangue coletada em papel de filtro (Akhter, 1998 d). Este teste apresenta uma sensibilidade muito boa na detecção do calazar, contudo mostra reações cruzadas com outros tripanosomatídeos (Neves,

1991). A utilização do ELISA nos hospitais da rede pública é dificultada pela falta de equipamentos apropriados para a leitura e pela falta de antígenos comerciais.

➤ Reação em cadeia da polimerase (PCR)

PCR é um método *in vitro* que sintetiza seqüências específicas de DNA. Essa técnica tem sido usada no diagnóstico de LV em cães (Mathis and Deplazes, 1995) e na América Central para detectar a presença de *L. chagasi* em seres humanos (Zeledon et al., 1993). Apesar de apresentar uma boa sensibilidade e especificidade, cerca de 90 % e 100 % respectivamente em pacientes com LV na Índia, Quênia e Brasil (QIAO et al., 1995), e capaz de detectar DNA circulante do parasito em casos assintomáticos (Schaefer et al., 1995), essa técnica não é adequada para ser utilizado no diagnóstico de rotina, devido ao alto custo, à necessidade de equipamentos e mão de obra qualificada além da possibilidade de contaminação com ácidos nucleicos exógenos (Eisenberg and affe, 1999).

## 5. Moléculas antigênicas

Para o estabelecimento de uma infecção os parasitas precisam elaborar vários fatores de virulência que eliminem a resposta imune dos hospedeiros. As moléculas antigênicas envolvidas neste processo agem na interação do parasita com as células alvo e em eventos que garantirão o estabelecimento de uma infecção. Dentro dessas moléculas encontram-se:

➤ A GP63, uma glicoproteína com peso molecular de 63 KDa, considerada o maior antígeno de superfície de *Leishmania* e que pode representar 0,5 a 2% do total de proteínas celulares (Button et al., 1991; Liu e Chang, 1992). Essa glicoproteína é bem conservada entre as diferentes espécies de *Leishmania* (Etges

et al., 1986) estando presente nos dois estágios do parasita (Wilson et al., 1993). A GP63 está envolvida com a infectividade das espécies de *Leishmania* no reconhecimento por receptores de macrófagos em hospedeiros mamíferos (McMaster et al., 1994; Steinkraus e Langer, 1992) e na sobrevivência das formas promastigotas ao sistema complemento (Yao et al., 2002). Em um trabalho feito em *L. chagasi* foi observado que o aumento da expressão de GP63 está associado com o aumento de virulência (Ramammorthy et al., 1995). Ela também estimula a produção de células T em pacientes com leishmaniose quando administradas oralmente em linhagem de *Salmonella typhimurium* (Xu et al., 1995) e a imunização em indivíduos normais com essa proteína produziu IFN- $\gamma$  em resposta a lisados de *Leishmania* (Russo et al., 1993). Além disso, é considerada uma molécula importante para proteger o parasita contra as enzimas citolíticas no interior do fagolisossomo (Seay et al, 1996; Voth et al., 1998).

➤ A GP46 é também uma glicoproteína presente na superfície de muitas espécies de *Leishmania*. É uma proteína de 46 kDa específica da fase promastigota (Myung et al., 2002) que embora não tenha função biológica conhecida, consegue proteger camundongos contra *Leishmania amazonensis* quando esses são imunizados parcialmente com GP46 (Champsi e McMahon-Pratt, 1988; Beetham et al., 1997).

➤ As HSPs, proteínas de choque térmico, constituem uma família de proteínas caracterizadas por serem altamente conservadas na escala evolutiva (Zilberstein e Shapira, 1994; Salotra et al., 1995). São proteínas de estresse produzidas por células eucarióticas e procarióticas quando essas sofrem uma inesperada mudança de temperatura, inflamação ou na presença de agentes químicos. Em *Leishmania*, a indução dessas proteínas em grande quantidade ocorre

quando há interação do patógeno com o hospedeiro, sendo elas assim associadas ao estágio de diferenciação que ocorre no parasita (Searle et al., 1989; Kaufmann, 1990; Rey-Ladino et al., 1997). Além disso, as HSPs tem um papel essencial na biossíntese e em proteínas relacionadas ao transporte, translocação e dobramento (Quijada et al., 2000).

Dentre as HSPs mais estudadas encontram-se as HSP 70 e HSP 83 que possuem uma massa molecular com cerca de 70 e 83 Kda, respectivamente. Os membros da família da HSP 70 são as proteínas mais abundantes e imunogênicas presentes nos organismos patógenos (Rey-Ladino et al., 1997) e no gênero *Leishmania* parecem estar envolvidas nos primeiros passos para a transformação celular de promastigotas para amastigotas (Searle et al., 1989). As HSPs 83 estão envolvidas na virulência e na resposta imunológica provocada pelas espécies de *Leishmania* (Salotra et al., 1995).

➤ As Cinesinas pertencem à superfamília de proteínas motoras responsáveis pelo transporte de moléculas / organelas ao longo dos microtúbulos e pela dinâmica dos cromossomos na mitose e meiose. Para esses processos, elas utilizam energia química da hidrólise do ATP para gerar o mecanismo de força. Essas proteínas são constituídas por duas cadeias pesadas idênticas, com aproximadamente 300 aminoácidos, e cadeias leves. As cadeias pesadas contém 3 domínios, um motor globular N-terminal, um domínio central de  $\alpha$ -hélice e um globular C-terminal (Proweb; Sack et al., 1999). As cadeias leves são constituídas de regiões de domínios repetitivos que variam de tamanho entre as espécies (Kull et al., 1996).

No NCBI estão disponibilizados, pelo menos, nove homólogos de cinesinas em *L. major*. Um trabalho feito com o rK39, um antígeno recombinante composto de



uma repetição de 39 aminoácidos, pertencente a uma cinesina de 23 kDa de *L. chagasi*, em pacientes com LV, LC e infectados com *Trypanosoma cruzi*, demonstrou que apenas os pacientes com LV possuíam anticorpos contra esse antígeno, indicando que ele pode ser usado para diagnóstico de leishmaniose visceral (Burns et al., 1993). Em pacientes co-infectados com HIV, o rk39 foi o antígeno mais eficiente na detecção de anticorpos contra as espécies de *Leishmania* que causam a LV, além de estar diretamente relacionado com a atividade da doença, indicando que pode ser usado para monitorar a quimioterapia (Houghton et al., 1998). O rK39 tornou-se disponível comercialmente em vários formatos de teste, porém algumas questões não foram respondidas como, quão rapidamente o teste do K39 torna-se negativo em paciente com tratamento bem sucedido e porque há uma discrepância na sensibilidade e especificidade entre eles. Além disso, um desses testes deixou de confirmar 14,2 % de cães com infecção comprovada por *L. chagasi* (Cabrera et al., 1999).

➤ Os antígenos K9 e K26 de *L. chagasi* são homólogos de proteínas hidrofílicas de superfície de *L. major*, que possuem peso molecular de ~9 kDa e ~26 kDa, respectivamente e podem ser usados em conjunto, complementando o rk39 para um diagnóstico sorológico mais específico de LV no Velho e Novo mundo. A diferença significativa entre esses dois antígenos é a presença de 11 cópias de 14 aminoácidos repetitivos no começo da ORF do K26. A região flanqueada pelas repetições possui 69 % de homologia com a ORF do K9. Análises mostram que o K9 e K26 são conservados em várias espécies de *Leishmania* e que as proteínas de ambos têm migração diferente no gel de SDS PAGE (Bathia et al., 1999).

➤ Ubiquitina é uma pequena proteína de 76 aminoácidos altamente conservada entre os eucariotas. Tem um papel essencial em vários processos biológicos como na regulação do ciclo celular, replicação de DNA, resposta a estresse, além de ser utilizada como sinal para a degradação de proteínas (Ulrich, 2002; VanDemark e Hill, 2002). Utilizando os testes de Elisa e Western Blots, foi observado que ubiquitinas purificadas de *L. mexicana* e de humanos não reagiram com um “pool” de soros de pacientes com doença de Chagas e que a purificada de *T. cruzi* não reagiu com soro de pacientes com leishmaniose cutânea localizada, sugerindo que mesmo com o alto grau de homologia, as ubiquitinas de parasitas e hospedeiros parecem ser antigenicamente distintas, indicando uma resposta espécie-específica (Telles et al., 1999).

➤ LACK (homólogo de *Leishmania* dos receptores para a cinase c ativada) consiste em uma proteína de 36 KDa altamente conservada em várias espécies de *Leishmania* e expressa tanto na forma promastigota quanto na amastigota. Apesar da sua função ainda não está totalmente esclarecida, já se sabe que quando o LACK é administrado com IL12, tem uma eficácia protetora contra o desenvolvimento de leishmaniose (Soussi et al., 2000).

Apesar da caracterização dessas moléculas antigênicas ainda não estar totalmente elucidada, a complementação desses estudos ou a descoberta de novas moléculas pode ser de grande ajuda, tanto para o entendimento do mecanismo de interação do parasita com o hospedeiro, como também no uso dessas proteínas em estratégias para driblar a infecção ou na produção de um teste diagnóstico mais eficiente, de uma vacina e de novos tratamentos.

## *6. Uma breve revisão sobre Sequenciamento e Análise computacional de seqüências.*

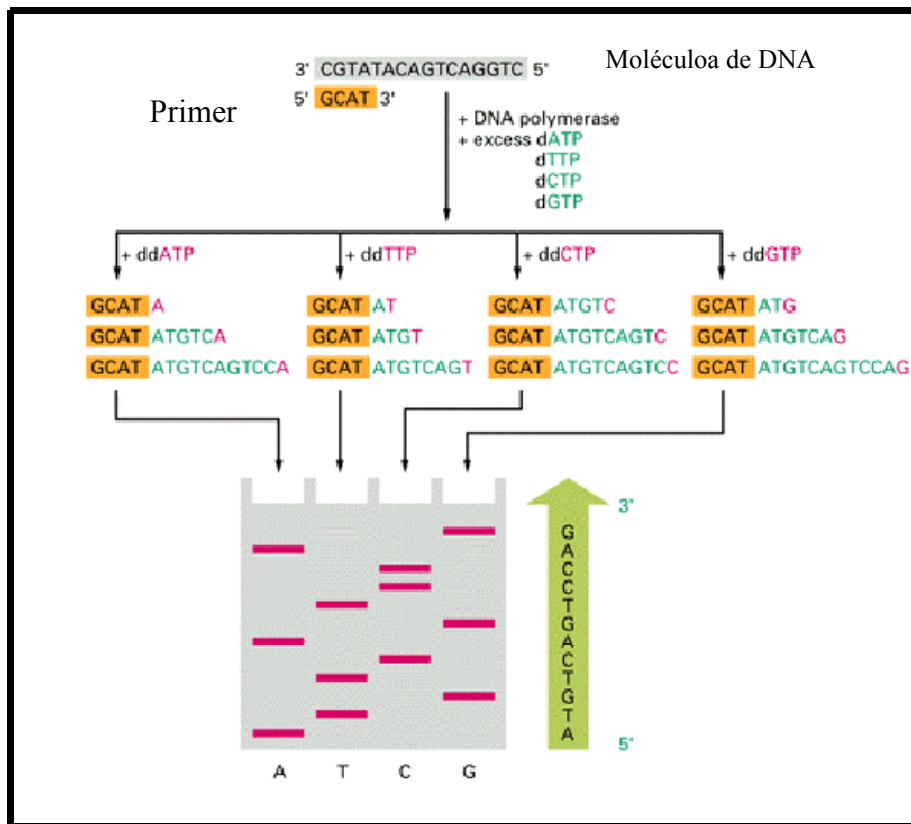
### 6.1 Sequenciamento

O método de sequenciamento do DNA mais utilizado hoje é o término do crescimento da cadeia, que foi desenvolvido por Sanger e colaboradores na década de 70. A base desse método é o uso de dideoxynucleotídeos (ddNTP), que se diferem dos deoxynucleotídeos (dNTP) pela falta do grupo 3'-OH da desoxirribose, que impede a adição do nucleotídeo seguinte quando é incorporado em uma cadeia de DNA.

Na reação são usados o fragmento da cadeia de DNA a ser seqüenciado, os quatro tipos de nucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), os quatro tipos de dideoxynucleotídeo (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP), os primers de DNA e a DNA polimerase. São feitas quatro reações diferentes, uma para cada ddNTP, em cada uma delas um número muito grande de moléculas de fita complementar é copiado simultaneamente. No entanto, em um dado momento da extensão, uma pequena porcentagem de moléculas incorpora um ddNTP que interrompe o alongamento da cadeia. Por outro lado, em outras moléculas a reação de extensão continua a ocorrer até que um ddNTP seja incorporado. Sendo assim, em cada uma das quatro reações, haverá fragmentos de vários tamanhos, mas todos possuindo início comum, variando de acordo com a ddNTP incorporada (Alberts et al., 1994).

Para leitura no sequenciador automático o "primer" ou cada um dos dideoxynucleotídeos é marcado com fluorocromo, que uma vez excitados por um feixe de laser emite luz. Essa luz é detectada por um fotomultiplicador e a informação é processada através de um computador.

A reação de sequenciamento está mostrada simplificada na figura IV.



**Figura IV:** Esquema simplificado da reação de sequenciamento.

### 6.3 Análise computacional das seqüências

Com o surgimento dos seqüenciadores automáticos o número de seqüências obtidas cresceu rapidamente. Para que elas pudessem ser analisadas a Bioinformática, ciência que tem como objetivo agilizar e facilitar a análise e compreensão da imensa quantidade de variedade de dados biológicos experimentais e clínicos, formulou ferramentas computacionais que facilitassem a caracterização dos fragmentos seqüenciados.

Quando os dados saem do computador, ao término do sequenciamento, deve ser feita primeiramente uma verificação da qualidade da seqüência, para isso

existem alguns programas, disponíveis na Internet. Após essa verificação deve ser realizada uma limpeza, para que sejam retirados artefatos e seqüências dos vetores, nos quais os fragmentos seqüenciados estavam clonados. E para confirmação do que seja o fragmento seqüenciado é feito um BLAST que vai Identificar numa coleção de seqüências, as que são homólogas a seqüência estudada.

As seqüências caracterizadas são depositadas em bancos de dados, que além de guardarem essas seqüências, oferecem ferramentas para caracterização de novas moléculas. (Kreuzer and Massey, 2002; Prosdocime et al., 2002).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas AK, Lichtman AH and Pober JS (2000) *Imunologia Celular e Molecular*. 3 ed. Revinter, Rio de Janeiro, 361-365 pp.
- Aguilar CM, Fernandez E, Fernandez R, Cannova DC, Ferrer E, Cabreca Z, Souza WJS and Coutinho SG (1998) Urban Visceral Leishmaniasis in Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 15-16.
- Akhter M (1998a) Geographical distribution of visceral leishmaniasis. Disponível em: <http://homepages.uel.ac.uk/D.P.Humber/akhter>.
- Akhter M (1998b) The *Leishmania* life cycle. Disponível em: <http://homepages.uel.ac.uk/D.P.Humber/akhter>.
- Akhter M (1998c) Visceral leishmaniasis. Disponível em <http://homepages.uel.ac.uk/D.P.Humber/akhter>.
- Akhter M (1998d) Control of Leishmaniasis. Disponível em <http://homepages.uel.ac.uk/D.P.Humber/akhter>.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1994) *Biologia molecular da célula*. 3 ed. Artes médicas, Porto Alegre, 291-334 pp.
- Alexander J, Satoskar AR and Russell DG (1999) *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci* 112: 2993-3002.
- Andrade HM, Toledo VPCP, Mayrink W and Genaro O (1999) Evaluation of the immune response and production of interferon in canine visceral leishmaniasis. *Revue Méd Vét* 150: 809-814.
- Bhatia A, Daifalla NS, Jen S, Badaro R, Reed ST and Skeiky YAW (1999) Cloning, characterization and serological evaluation of K9 e K26: two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasitol* 102: 249-261.

- Beetham JK, Myung KS, McCoy J, Wilson ME and Donelson JE (1997) Glycoprotein 46 mRNA abundance is post-transcriptionally regulated during development of *Leishmania chagasi* promastigotes to an infectious form. J Biol Chem 272: 17360-17366.
- Bogdan C and Rollinghoff M (1998) The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. J Parasitol 28: 121-134.
- Buates S and Matlashewski G (1999) Treatment of experimental leishmaniasis with the immunomodulators Imiquimod and S-28463: efficacy and mode of action. J Infect Dis 179: 1485-1494.
- Burns Jr JM, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R and Reed SG (1993) Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. Proc Natl Acad Sci USA 90: 775-779.
- Button LL, Reiner NE and McMaster R (1991) Modification of GP63 genes from diverse species of *Leishmania* for expression of recombinant protein at high levels in *Escherichia coli*. Mol Biochem Parasitol 44: 213-224.
- Cabrera GP, Da Silva VO, Da Costa RT, Reis AB, Mayrink W, Genaro O, Palatnik-De-Sousa CB (1999) The fucose-mannose ligand-ELISA in the diagnosis and prognosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. Am J Trop Med Hyg 61: 296-301.
- Chakrabarty R, Mukherjee S, Lu HG, McGwire BS, Chang JP and Basu MK (1996) Kinetics of entry of virulent and avirulent strains of *Leishmania donovani* into macrophages: a possible role of virulence molecules (GP63 and LPG). J Parasitol 82: 632-635.

- Champsi J and McMahon-Pratt D (1988). Membrane glycoprotein M-2 protects against *Leishmania amazonensis* infection. *Infect and Immun* 52: 3272-3279.
- Costa CHN, Gomes RBB, Silva MRB, Garcez LM, Ramos PKS, Santos RS, Shaw JJ, David JR and Maguire JH (2000) Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. *J Infect Dis* 182: 997-1000.
- Costa SR, D'Oliveira Jr A, Bacellar O and Carvalho EM (1999) T Cell response of asymptomatic *Leishmania chagasi* infected subjects to recombinant *Leishmania* antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 367-370.
- Cox FEG (1997) Designer vaccines for parasitic diseases. *Inter J Parasitol* 27: 1147-1157.
- Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M and Lopes U (1994) Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* – a mini review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 463-469.
- D'Oliveira Jr A, Costa SRM, Barbosa AB, Orge MGO and Carvalho EM (1997) Asymptomatic *Leishmania chagasi* infection in relatives and neighbors of patients with visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 15-20.
- Eisenberg CL, Jaffe C (1999) *Leishmania*: Identification of Old World species using a permissively primed intergenic polymorphic-polymerase chain reaction. *Exp Parasitol* 91:70-77.
- Engers HD, Bergquist R and Modabber F (1996) Progress on Vaccines Against Parasites. *Dev Biol Stand* 87:73-84
- Etges R, Bouvier J and Bordier C (1986) The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a protease. *J Biol Chem* 261: 9098-9101.
- Ferreira AW and Ávila SLM (1996) Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas. 1ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 150-156 pp.



Fichoux YL, Rousseal D, Ferrua B, Ruetter S, Lelievre A, Grousseau D and Kubar J (1998) Short-and long-term efficacy of hexadecyl - phosphocholine against established *Leishmania infantum* infection in Balb/c mice. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 654-658.

Follador I, Araujo C, Orge G, Cheng LH, Carvalho L, Bacellar O, Almeida RP and Carvalho EM (2002) Immune response to an inactive vaccine against American cutaneous leishmaniasis together with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Vaccine* 20: 1365-1368.

Frankenburg S, Axelrod O, Kutner S, Greenblatt CL, Klaus SN, Pirak EA, McMaster R and Lowell GH (1996) Effective immunization of mice against cutaneous leishmaniasis using an intrinsically adjuvanted synthetic lipopeptide vaccine. *Vaccine* 14: 923-929.

Frommel D, Ogunkolade BW, Vouldoukis and Monjour L (1988) Vaccine – induced immunity against cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice *Infect Immun* 56: 843-848.

Fundação Nacional De Saúde - FUNASA (2002). Disponível em: <http://www.funasa.gov.br>.

Gomes NA, Barreto-de-Souza V, Wilson ME and DosReis GA (1998) Unresponsive CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from *Leishmania chagasi* infected mice increase cytokine production and mediate parasite killing after blockade of B7-1/CTLA-4 molecular pathway. *J Infect Dis* 178: 1847-1851.

Gontijo CMF, Falcão AR, Falcão AL and Coelho MV (1995) The development of species of *Leishmania* Ross, 1903 in *Lutzomyia longipalps* (Lutz & Neiva, 1912). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90: 367-373.

- Gradoni L (2001) An Update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. *Vet Parasitol* 100: 87-103.
- Grimaldi Jr G (1995) Meetings on vaccine studies towards the control of leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90: 553-556.
- Herwaldt BL (1999) Leishmaniasis. *Lancet* 354: 1191-1199.
- Houghton RL, Pretescu M, Benson DR, Skeyky YAW, Scaloni A, Badaró R, Reed SG and Gradoni L (1998) A cloned antigen (recombinant K39) of *Leishmania chagasi* diagnostic for visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type 1 patients and a prognostic indicator for monitoring patients undergoing drug therapy. *J Infect Dis* 177: 1339-1344.
- Ivens AC and Blackwell JM (1999) The *Leishmania* genome comes of age. *Parasitol Today* 15: 225-231.
- Joshi PB, Kelly BL, Kamhawi S, Sacks DL and McMaster WR (2002) Target gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Mol Biochem Parasitol* 120: 33-40.
- Kauffman SHE (1990) Heat shock proteins and the immune response. *Immunol Today* 11:129-136.
- Kreuzer H, Massey A (2002) Engenharia genética e biotecnologia. 2 ed. Artmed, Porto Alegre.
- Kull FJ, Sablin EP, Lau R, Fletterick RJ and Vale RD (1996) Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin. *Nature* 380: 550-555.
- Liart DB, Mendonça IL, Luz FCO, Abreu EAS, Mello GWS, Farias TJC, Ferreira AFB, Millington MA and Costa CHN (2001) QBC<sup>®</sup> for the diagnostic of human and

- canine american visceral leishmaniasis: preliminary data. *Rev Soc Bras Med Trop* 34: 577-581.
- Liu X, Chang K-P (1992) Extrachromosomal genetic complementation of surface metalloproteinase (gp63)-deficient *Leishmania* increases their binding to macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4991-4995.
- Mathis A, Deplazes P (1995) PCR and *in vitro* cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. *J Clin Microbiol* 33: 1145-1149.
- Maurício IL, Stothard JR and Miles MA (2000) The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol today* 16: 188-189.
- McMaster WR, Morrison CJ, Macdonald MH and Joshi PB (1994) Mutational and functional analysis of the *Leishmania* surface metalloproteinase GP63: similarities to matrix metalloproteinases. *Parasitology Cambridge* 108: S29-S36.
- Momen H and Cupolillo E (2000) Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 583-588.
- Monjour L, Neogy AB, Vouldoukis I, Silva AO, Boisnic S, Brito MEF, Lesot A, Vignot N, Martins JS and Jardim ML (1994) Exploitation of parasite derived antigen in therapeutic success of human cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 479-483.
- Monroy-Ostria A, Hernandez-Montes O and Barker B (2000) Aetiology of visceral leishmaniasis in Mexico. *Acta Trop* 75: 155-161.
- Mossalayi MD, Arock M, Mazier D, Vincendeau P and Vouldoukis I (1999) The human immune response during cutaneous Leishmaniasis: No problem. *Parasitol Today* 15: 342-345.

Myung KS, Beetham JK, Wilson ME and Donelson JE (2002) Comparison of the post-transcriptional for the surface proteins PSA (GP46) and MSP (GP63) of *Leishmania chagasi*. J Biol Chem 277: 16489-16497.

Neves DP 1991. Parasitologia Humana. 8 edition. Ed. Atheneu, São Paulo, Rio de Janeiro, 35-81 pp.

Peacock CS, Collins A, Shaw MA, Silveira F, Costa J, Coste CH, Nascimento MD, Siddiqui R, Shaw JJ and Blackwell JM (2001) Genetic epidemiology of visceral leishmaniasis in Northeastern Brazil 2001. Genet Epidemiol 20: 383-396.

Pimenta PFP, Turco SJ, McConville MJ, Lawyer PG, Perkins PV and Sacks DL (1992) Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. Science 256: 1812 -1815.

Prosdocimi F, Cerqueira GC, Binneck E, Silva AF, dos Reis NA, Junqueira ACM, dos Santos ACF, Nhani Jr A, Wust CI, Camargo Filho F, Kessedjian JL, Petretski JH, Camargo LP, Ferreira RGM, Lima RP, Pereira RM, Jardim S, Sampaio VS and Folgueras-Flatschart AV (2002) Bioinformática: Manual do Usuário. Biotec. Ciência e desenvolvimento 29: 12-25.

Proweb. Disponível em: [http:// www. Proweb.org/kinesin//kinesin.html](http://www.Proweb.org/kinesin//kinesin.html)

Qiao Z, Miles MA, Wilson SM (1995) Detection of parasites of the *Leishmania donovani*-complex by a polymerase chain reaction-solution hybridization enzyme-linked immunoassay (PCR-SHELA). Parasitology 110: 269-275.

Quijada L, Soto M, Alonso C, Requena JM (2000) Identification of a putative regulatory element in the 3' untranslated region that controls expression of HSP70 in *Leishmania infantum*. Mol Biochem Parasitol 272: 4493-4499.

- Ramamoorthy R, Swihart KG, McCoy JJ, Wilson ME and Donelson J (1995) Intergenic regions between tandem gp63 genes influence the differential expression of gp63 RNAs in *Leishmania chagasi* promastigotes. J Biol Chem 270: 12133-12139.
- Reed S (1996) Diagnosis of *Leishmania*. Clin Dermatol 14: 471-478.
- Rey-Ladino JA, Joshi PB, Singh B, Gupta R and Reiner NE (1997) *Leishmania major*: molecular cloning, sequencing and expression of the Heat Shock Protein 60 gene reveals unique carboxy terminal peptide sequences. Exp Parasitol 85: 249-263.
- Rodriguez N, de Lima H, Rodriguez A, Brewster S and Barker DC (1997) Genomic DNA repeats from *Leishmania Viannia braziliensis* (Venezuela strain) containing simple repeats and microsatellites. Exp Parasitol 115: 349-358.
- Roitt I, Brostoff J and Male D (1999). Immunologia. 5 edition. Ed. Manole. LTDA, São Paulo, 395pp
- Russo DM, Jardim A, Carvalho EM, Sleath PR, Armitage RJ, Olafson RW and Reed SG (1993) Mapping human T cell epitopes in *Leishmania* gp63. Identification of cross-reactive and species-specific epitopes. J Immunol 150: 932-939.
- Sack S, Kull FJ and Mandelkow E (1999) Motor proteins of the kinesin family structures, variations, and nucleotide binding sites. J Biochem 262: 1-11.
- Salotra P, Chauhan D, Ralhan R and Bhatnagar R (1995) Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces preferential expression of stress proteins in virulent promastigotes of *Leishmania donovani*. Immunology Lett 44:1-5.
- Schaefer KU, Schoone GJ, Muller AS, Kager PA, Meredith SEO (1995) Visceral leishmaniasis: use of the polymerase chain reaction in an epidemiological study in Baringo District, Kenya. Trans R Soc Trop Med Hyg 89: 492-495.

- Schallig HDFH, Canto-Cavalheiro M and da Silva ES (2002) Evaluation of the direct agglutination test and the rK39 dipstick test for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 1015-1018.
- Schneider P, Rosat J, Bouvier J, Louis J and Bordier C (1992) *Leishmania major*: differential regulation of the surface metalloprotease in amastigote and promastigotes stages. *Exp Parasitol* 75: 196-206.
- Searle S, Campos AJR, Coulson RMR, Spithill TW and Smith DF (1989) A family of heat-shock protein 70-related genes are expressed in the promastigotes of *Leishmania major*. *Nucleic Acids Res* 17: 5081-5095.
- Seay MB, Heard PL and Chaudhuri G (1996) Surface Zn-Proteinase as a molecule for defense of *Leishmania mexicana amazonensis* promastigotes against cytolysis inside macrophage phagolysosomes. *Infect Immun* 64: 5129-5137.
- Shaw JJ (1994) Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 471-478.
- Skeiky YA.W, Benson DR, Costa JLM, Badaro R and Reed SG (1997). Association of *Leishmania* heat shock protein 83 antigen and immunoglobulin G4 antibody titers in Brazilian patients with diffuse cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 65: 5368-5370.
- Skeiky YAW, Guderian JA, Benson DR, Bacelar O, Carvalho EM, Kubim M, Badaro R, Trinchieri G and Reed SG (1995) A recombinant *Leishmania* antigen that stimulatory human peripheral blood mononuclear cells to express a Th1-type cytokine profile and to produce interleukin 12. *J Exp Med* 181: 1527-1537.
- Soussi N, Milon G, Colle J-H, Mougneau E, Glaichenhaus N and Goossens P (2000) *Listeria monocytogenes* as a short-lived delivery system for the induction of type

- 1 cell-mediated immunity against the p36/LACK antigen in *Leishmania major*. Infect Immun 68: 1498-1506.
- Steinkraus HB and Langer PJ (1992) The protein sequence predicted from a *Leishmania guyanensis* gp63 major surface glycoprotein gene is divergent as compared with other *Leishmania* species. Mol Biochem Parasitol 52: 141-144.
- Telles S, Abate T, Slezynger TC and Henriquez DA (1999) *Trypanosoma cruzi* and human ubiquitin are immunologically distinct proteins despite only three amino acid difference in their primary sequence. FEMS Immunol Med Microbiol 24: 123-130.
- Ulrich HD (2002) Degradation or maintenance: Actions of the ubiquitin system on eukaryotic chromatin. Eukaryot Cell 1: 1-10.
- VanDemark AP and Hill CP (2002) Structural basis of ubiquitylation. Curr Opin Struct Biol 12: 822-830.
- Victoir K, Banuls AL, Arevalo J, Llanos-Cuentas A, Hamers R, Noel S, De Doncker S, Ray D LE, Tibayrenc M and Dujardin JC (1998) The gp63 gene locus, a target for genetic characterization of *Leishmania* belonging to subgenus *Viannia*. Parasitology Cambridge 117: 1-13.
- Victoir K, Dujardin J-C (2002) How to succeed in parasitic life without sex? Asking *Leishmania*. Trends Parasitol 18: 81-85.
- Voth BR, Kelly BL, Joshi PB, Ivens AC and McMaster WR (1998) Differentially expressed *Leishmania major* gp63 genes encode cell surface leishmanolysin with distinct signals for glycosylphosphatidylinositol attachment. Mol Biochem Parasitol 93: 31-41.

- Wilson ME, Paetz KE, Ramamoorthy R and Donelson JE (1993) The effect of ongoing protein synthesis on the steady state levels of gp63 RNAs in *Leishmania chagasi*. J Biol Chem 268: 15731-15736.
- Wilson ME, Young BM, Andersen KP, Weinstock JV, Metwali, Ali KM and Donelson JE (1995) A recombinant *Leishmania chagasi* antigen that stimulates cellular immune response. Infect Immun 63: 2062- 2069.
- World Health Organization - WHO (1997). Leishmaniasis.. Disponível em: <http://www.who.programmes/ctd/diseases>
- Wright EP, and El Amin ERM (1989) *Leishmania* infection: surfaces and immunity. Biochem Cell Biol 67: 525-536.
- Xu D, McSorley SJ, Chatfield SN, Dougan G and Liew FY (1995) Protection against *Leishmania* major infection in genetically susceptible BALB/c mice by gp63 delivered orally in attenuated *Salmonella typhimurium* (AroA-AroD). Immunology 85: 1-7.
- Yao C, Leidal KGL, Brittingham A, Tarr DE, Donelson JE and Wilson ME (2002) Biosynthesis of the major surface protease GP63 of *Leishmania chagasi*. Mol Biochem Parasitol 121: 119-128.
- Zeledon R, Maingon R, Ward R, Arana B, Belli A, De Carreira P, Ponce C (1993) The characterization of *Leishmania* parasites and their vectors from Central America using molecular techniques. Arch Inst Pasteur Tunis 70: 325-329.
- Zilberstein D and Shapira M (1994) The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. Annu Rev Microbiol 48: 449-470.



Manuscrito a ser  
enviado à revista

**Memórias do instituto**

**Oswaldo Cruz**

# Caracterização de genes codificantes para antígenos de *Leishmania chagasi* compostos por domínios múltiplos repetitivos

**Cheila Nataly Galindo Bedor <sup>\*</sup>, Osvaldo Pompílio de Melo Neto <sup>#</sup>**

<sup>\*</sup>Curso de Pós-graduação em genética, Universidade Federal de Pernambuco <sup>#</sup> Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. Avenida Moraes Rego s/n, Caixa Postal 7472, 50670-420, Recife, Pe, Brasil. E-mail: opmn@cpqam.fiocruz.br

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma enfermidade potencialmente fatal, sendo no Brasil causada pela *Leishmania chagasi* com cerca de 3.500 novos casos por ano. Está presente em quase todo o território brasileiro, mas o maior número de casos ocorre em áreas onde os serviços de saúde são pouco desenvolvidos, o que dificulta seu diagnóstico baseado principalmente nos sintomas clínicos, também comuns a outras doenças. Por esse motivo e pela falta de um tratamento não tóxico muitos trabalhos buscam estratégias que permitam um diagnóstico rápido e confiável ou a produção de uma vacina.

Em um estudo anterior, foram selecionados genes codificantes para proteínas antigênicas de *L. chagasi* que se mostraram capazes de reagir com anticorpos de cães infectados por esse parasita e seres humanos portadores de calazar. No presente trabalho, esses genes foram seqüenciados e as seqüências analisadas para a caracterização das respectivas proteínas. Os resultados obtidos mostraram que seis dos clones codificam quatro proteínas diferentes, compostas por regiões contendo múltiplos domínios repetitivos de tamanhos diferentes e não relacionados entre si. Essas repetições sugerem que, ao menos em *L. chagasi*, proteínas com regiões repetitivas podem ser melhor indutoras de imunidade humoral, podendo ser então candidatas a componentes de sistemas de diagnóstico contra a leishmaniose visceral.

---

O gênero *Leishmania* é composto por protozoários da família trypanosomatidae com muitas espécies patogênicas. Esses organismos são parasitas obrigatórios e possuem dois estágios durante seu ciclo celular: um promastigota extracelular, presente no inseto vetor e um amastigota intracelular, no

fagolisossomo dos macrófagos de mamíferos. As várias espécies de *Leishmania* causam as leishmanioses, um grupo de doenças classificadas de acordo com os sintomas clínicos e a espécie responsável pela infecção, que afetam milhões de pessoas em quase todo o mundo. As patologias se distinguem em duas principais categorias: a leishmaniose tegumentar (LT) ou cutânea e a leishmaniose visceral (LV) (Gradoni 2001, Herwaldt 1999, Joshi et al. 2002). A LV é transmitida pela *L. chagasi* na América do Sul e pelas *L. donovani* e *L. infantum* nos demais continentes onde está presente. Seus sintomas variam entre os indivíduos e a região geográfica, mas em geral caracteriza-se por febre, anemia, perda de peso e hepatoesplenomegalia (Buates & Matlashewski 1999).

A grande incidência anual de LV, cerca de 500.000 casos a cada ano (Monroy-Ostria et al. 2000), motiva a busca de estratégias que permitam um diagnóstico rápido e confiável. Preliminarmente o diagnóstico é baseado nos sintomas clínicos, mas apresentam condições similares a outras doenças. O diagnóstico parasitológico baseia-se na visualização do parasito, mas os métodos são invasivos para os pacientes. Já o diagnóstico sorológico, que procura anticorpos séricos específicos, tem problemas como a produção do antígeno padronizado e reações cruzadas com outros parasitas (Reed 1996, Schalling et al. 2002). Esta, contudo parece ser a abordagem mais promissora, uma vez que na LV, anticorpos específicos podem ser facilmente detectados durante a doença e os ensaios podem ser rotineiramente executados em amostras de sangue ou urina.

Muitas vacinas contra a leishmaniose já foram testadas, entre elas vacinas produzidas com organismos vivos, vacinas de subunidades definidas, frações antigênicas e vacinas de DNA. Embora alguns resultados obtidos sejam promissores, nenhuma dessas vacinas chegou ao consenso de quais moléculas

devem ser usadas como antígeno, a melhor via de inoculação e o tempo necessário para uma imunidade satisfatória (Fromel et al. 1988, Monjour et al. 1994, Xu et al. 1995, Engers et al. 1996, Frankenburg et al. 1996, Gradoni 2001, Follador et al. 2002).

Pelos motivos apresentados e também pela falta de um tratamento não tóxico e de melhor eficácia, muitos trabalhos procuram identificar novos antígenos parasitários que possam ser utilizados no melhoramento das técnicas para diagnóstico, no desenvolvimento de uma vacina ou na imunoterapia contra a leishmaniose. Alguns antígenos de *Leishmania* já estão bem caracterizados entre eles: as glicoproteínas GP63 e a GP46 (Etges et al. 1986, Champisi & McMahon-Pratt 1988, Button et al. 1991, Liu & Chang 1992, Steinkraus & Langer 1992, McMaster et al. 1994, Beetham et al. 1997, Myung et al. 2002, Yao et al. 2002), as HSPs (Zilberstein & Shapira 1994, Salotra et al. 1995), as Cinesinas (Kull et al. 1996), os antígenos K9 e K26 (Burns et al. 1993), a Ubiquitina (Ulrich 2002, VanDemark & Hill 2002) e o LACK (Soussi et al. 2000).

Neste trabalho, tivemos como objetivo principal seqüenciar e caracterizar clones de uma biblioteca de cDNA de expressão de *L. chagasi*, reconhecidos por soros de cães e humanos com calazar. Clones que codificam quatro proteínas diferentes foram seqüenciados total ou parcialmente. A análise da seqüência de aminoácidos destas proteínas mostrou que todas, independente de suas homologias com proteínas descritas ou não na literatura, são compostas por regiões contendo domínios repetitivos. Estes domínios são de tamanhos diferentes e não relacionados entre si. A ocorrência destas repetições sugere que, ao menos em *L. chagasi*, proteínas compostas por regiões repetitivas podem ser melhor indutoras de

imunidade humoral. Estas proteínas seriam então candidatas a componentes de sistemas de diagnóstico contra a leishmaniose visceral.

## **MATERIAL E METÓDOS**

**Clones de cDNA de *L. chagasi*** – Os clones foram obtidos a partir de uma biblioteca cDNA de formas amastigotas de *L. chagasi*, construída em vetor ZAP dExpress Lambda Phage Vector (Stratagene). Os clones selecionados continham polipeptídios recombinantes que reagiram com anticorpos de um conjunto de soros de cães de áreas endêmicas, com sorologia e reação intradérmica positiva para antígeno bruto deste parasita, e com soros humanos portadores de calazar. Os plasmídeos presentes nos fagos selecionados foram excisados em *Escherichia coli* e em seguida purificados para posterior seqüenciamento. Esse trabalho foi realizado pela equipe do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz. Os plasmídeos foram então seqüenciados parcialmente no Centro de Biotecnologia da Universidade Cornell, Nova Iorque – EUA e os que continham insertos considerados relevantes, foram enviados para o Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães para seqüenciamento total e melhor caracterização (Tabela I).

**Métodos de digestão e purificação de DNA** – Os plasmídeos pBK-CMV, contendo os cDNAs, foram digeridos simultaneamente com as enzimas *Eco* RI e *Xho* I (New England Biolabs, England, UK) para estimativa do tamanho dos fragmentos e transformados em *E. coli* (cepas DH5 $\alpha$  ou Tg-2). A digestão, transformação e obtenção de DNA plasmidial em larga escala, foi executada segundo Sambrook et

al. (1989) e Ausubel et al. (1992). A purificação do DNA, quando precisou ser feita, foi com o “Plasmid Mini Kit” QIAGEN,UK, a partir de colunas QIAGEN - tip 20, seguindo as recomendações do fabricante.

**Estratégias para seqüenciamento de DNA** – Primeiramente todos os clones foram seqüenciados com os oligonucleotídeos M13 universal e o M13 reverso. Em seguida, foram desenhados “primers” internos para obtenção das seqüências completas. No caso do clone LC 30 foram ainda realizadas três etapas de diminuição do tamanho do inserto visando facilitar o sequenciamento. Assim, o plasmídeo contendo o inserto LC 30 original foi inicialmente digerido com a enzima *Kpn* I, que reconhece um sítio de restrição no vetor pBKCMV e um segundo sítio no interior do fragmento, e depois religado com a enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs, England, UK) gerando o clone LC 30 - *Kpn*. Para a obtenção de mais duas sub-clonagens foi usada essa mesma estratégia com a enzima *Bam* HI, tanto no plasmídeo selvagem quanto para o clone LC 30 – *Kpn* gerando os plasmídeos LC 30 - *Bam* HI e LC 30 – *Kpn* – *Bam* HI, respectivamente. O sequenciamento destes diferentes plasmídeos com os oligos M13 universal e reverso permitiu que trechos maiores do LC 30 fossem seqüenciados, antes da utilização dos “primers” internos.

**Seqüenciamento de DNA** – Os seqüenciamentos foram feitos utilizando-se “o kit AIFexpress AutoRead Sequencing” (Amersham Biosciences, USA), que possui os oligonucleotídeos marcados na posição 5', quando foram usados os oligonucleotídeos M13 universal e o M13 reverso. Na reação, cerca de 5-10 µg do DNA plasmidial foram incubados com 4 pmoles do “primer” e 6 a 8 unidades de T7 DNA polimerase. Para anelamento a reação era colocada a 65°C por 5 min e a 37°C por 10 min para

extensão. O “kit Therminator Cycle Sequencing” (Amersham Biosciences, USA), que possui os dideoxynucleotídeos marcados, foi usado quando o sequenciamento era feito com os “primers” internos, facilitando a estratégia já que nesse Kit os “primers” não precisam ser marcados. Nessa reação cerca de 0.2-0.5 µg de DNA plasmidial foram incubados com 2 pmoles do “primer” e 10 U da T7 DNA polimerase. A reação de sequenciamento/amplificação foi realizada em um Termociclador (Biometra) por um total de 30 ciclos nas condições de 95°C por 30s, 60°C por 30s e 72°C 2 min. O seqüenciador utilizado foi o automático ALF II da empresa Amersham Biosciences.

**Análise computacional dos resultados** - Os resultados dos seqüenciamentos foram editados no programa DNASTar (versão 3.85): EDitseq para edição das seqüências, Mapdraw para edição dos mapas e o Megaline para alinhamento das seqüências obtidas a cada sequenciamento. A caracterização foi feita por análise de homologia com seqüências disponíveis em bancos de dados, através do programa “BLAST” (Basic Local Alignment Search Tool) do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para comparação com todas as seqüências contidas neste banco e do SangerCenter (<http://www.sanger.ac.uk>) e genedb (<http://www.genedb.org>) para a comparação das seqüências obtidas com as seqüências de *L. major*.

## RESULTADOS

Com a digestão dos plasmídeos e a liberação dos fragmentos foi possível estimar os tamanhos dos mesmos (Fig. 1). O clone LC 9 liberou uma banda de aproximadamente 1,2 Kb, o LC 12 de 2,0 Kb. O clone LC 14 liberou dois fragmentos próximos de 1,25 e 1,0 Kb sendo então estimado em aproximadamente 2,25 Kb, já o LC 16 liberou duas bandas de 1,0 Kb cada. O clone LC 18 foi estimado em 2,2 Kb e o

LC 30 em 5 Kb (Tabela I). Diferentes estratégias para o seqüenciamento de cada um desses clones foram elaboradas e estão descritas a seguir. Vale salientar que os clones que codificam a mesma proteína, identificados no início da etapa de seqüenciamento, estão descritos em conjunto.

**Seqüenciamento dos clones LC 9 e LC 12** – No seqüenciamento dos clones LC9 e LC12, foram obtidas três e seis seqüências, respectivamente, com os “primers” M13 universal e reverso além dos internos, desenhados especificamente para esse fim. A estratégia de seqüenciamento é mostrada na Fig. 2. Após o alinhamento dessas seqüências descobriu-se que ambos são originados de um mesmo mRNA e codificam para a mesma proteína. O clone LC9 possui 1213 nucleotídeos que codificam uma proteína de 30 kDa com 296 aminoácidos, já a seqüência do LC 12 é composta por 1902 nucleotídeos e a proteína de aproximadamente 52 kDa possui 524 aminoácidos. Essa proteína é composta basicamente por segmentos repetitivos de 39 aminoácidos (cinco no LC 9 e 11 no LC 12) e uma região não repetitiva de 76 aminoácidos na sua extremidade C-terminal (Fig. 3). A diferença entre esses dois clones é a presença de um maior número de repetições no clone LC 12 e uma diminuição no LC 9 da região 3’ não traduzível que não interfere na seqüência da proteína. A submissão dos resultados a uma análise de homologia, com seqüências de proteínas disponíveis na rede, mostrou que a proteína codificada pelos clones LC 9 e LC 12 é homóloga a uma presente em várias espécies de *Leishmania*, inclusive em *L. chagasi*. Contudo a seqüência consenso para os domínios repetitivos na proteína dos clones LC 9 / LC 12 é ligeiramente diferente daquele já descrito no homólogo de *L. chagasi*, sugerindo que este parasita possua mais de um homólogo para essa proteína.



**Clones LC 14 e LC 16** – O seqüenciamento do clone LC 14 foi feito utilizando seis oligonucleotídeos diferentes (Fig. 4), os tamanhos dos fragmentos construídos, a partir de cada “primer”, podem ser observados na Fig. 4. A seqüência obtida possui 2250 nucleotídeos e codifica uma proteína de 541 aminoácidos, com peso molecular de 54 kDa. O clone LC 16 precisou de cinco “primers” para ser seqüenciado (Fig. 4), com a seqüência final possuindo 1890 nucleotídeos. Quando esse clone foi digerido com as enzimas *Xho* I e *Eco* RI liberou apenas um fragmento (Fig. 1). Porém na análise dos primeiros seqüenciamentos foi verificado que ele possuía um sítio interno de *Xho* I, que o cortava em dois fragmentos de aproximadamente 1,0 Kb, que no gel são interpretados como uma só banda, o que justifica o tamanho de aproximadamente 2,0 Kb do clone LC 16.

Como no caso do LC 9 / LC12, as seqüências dos clones LC 14 e LC 16 mostraram que estes cDNAs resultaram de um mesmo mRNA e codificam a mesma proteína, que no caso do LC 16 é composta por 449 aminoácidos com 45 kDa. Essa proteína é constituída de uma região não repetitiva de 230 aminoácidos na extremidade carboxi-terminal e uma região repetitiva composta por 22 ou 15 repetições de 14 aminoácidos, no caso das LC 14 e LC 16, respectivamente (Fig. 5). No resultado do BLAST, com seqüências de proteínas disponíveis no NCBI, não foi encontrado nenhum homólogo dessa proteína descrito em *Leishmania*. Porém no SangerCenter, com os resultados do genoma parcial de *L. major*, foi possível encontrar uma alta homologia com um fragmento de um cromossomo parcialmente seqüenciado. Esse fragmento consiste basicamente em uma seqüência de 14 aminoácidos repetidos pelo menos 125 vezes, seguida de uma extremidade Carboxi-terminal não repetida, com cerca de 240 aminoácidos. Avaliando essa seqüência de *L. major* com a ferramenta BLAST no NCBI, foi identificado um homólogo em um

cromossomo de *Trypanosoma cruzi*, o qual aparentemente faz parte de um grupo de antígenos repetitivos, já caracterizados parcialmente, mas que parecem ter funções e localizações distintas.

**Clone LC 18** - A seqüência do LC 18 ainda não está terminada, apesar de terem sido usados quatro “primers” que resultaram em fragmentos compostos por duas repetições de 74 aminoácidos (Fig. 6). Esses fragmentos são homólogos de uma proteína altamente conservada em eucariotos. Como a seqüência é parcial, não foi possível saber se a proteína codificada já foi descrita em *L. chagasi*, mas já se sabe que, em algumas outras espécies de *Leishmania*, essa proteína está presente em mais de um número de cópias e é altamente conservada.

**Clone LC 30** – Tendo em vista o alto peso molecular do fragmento LC 30 e a dificuldade de desenhar e produzir o elevado número de “primers” para o seu sequenciamento partiu-se para a identificação de sítios internos de restrição que permitissem a redução do tamanho do fragmento. As enzimas *Kpn* I e *Bam* HI foram escolhidas para as novas construções (Fig. 7). Os clones LC 30 selvagem, LC 30–*Kpn*, LC 30–*Bam* e LC 30–*KPN*–*BAM* foram seqüenciados com um total de sete diferentes oligonucleotídeos, que resultaram em nove diferentes seqüências (Fig. 8). Essas seqüências parciais foram agrupadas em três conjuntos maiores, separados por trechos não seqüenciados. Não foi encontrado nenhum homólogo dessa proteína no NCBI. Porém na busca realizada no genoma de *L. major*, nos bancos de dados do “SangerCenter” e “Genedb”, foi identificada uma homologia com duas regiões distintas do cromossomo L 16 (seqüência parcial em andamento) de *L. major*, no qual uma delas possui uma região de 3376 nucleotídeos completa e uma repetição parcial desses nucleotídeos, indicando um possível motivo repetitivo de 1125 aminoácidos (Fig. 9).

## DISCUSSÃO

Muitos antígenos de *Leishmania* descritos possuem motivos repetitivos. Em um trabalho de Bhatia et al. (1999) foram descritos dois antígenos hidrofílicos de *L. chagasi*, o K9 e o K26, que possuem peso molecular de ~9 e ~26 KDa respectivamente, onde a diferença básica entre os dois é a presença de 11 cópias de 14 aminoácidos repetitivos na ORF do K26. Esses antígenos são específicos para a detecção de anticorpos em soros infectados com *L. chagasi*. No *T. cruzi*, os antígenos CRA e FRA têm uma alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da Doença de Chagas. O antígeno FRA está localizado no flagelo e possui repetições de 68 aminoácidos, enquanto que o CRA está localizado no citoplasma e suas repetições consistem em 14 aminoácidos (Krieger et al. 1992, Muller & Felleisen 1995). A alta frequência de antígenos isolados com domínios repetitivos no *T. cruzi* pode ser explicada pela elevada concentração de anticorpos específicos contra esses antígenos no soro de pacientes chagásicos (Silveira et al. 2001).

Os resultados desse trabalho mostram que os seis clones seqüenciados codificam para pelo menos quatro proteínas diferentes. O fato dos clones LC 9 / LC 12 e LC 14 / LC 16 codificarem a mesma proteína deve-se ao fato de que a síntese do cDNA a partir do mRNA durante a construção da biblioteca não prossegue até o fim, gerando cópias de tamanhos distintos, pelo abandono prematuro da transcriptase reversa da fita de mRNA, ou ainda pela presença de mRNAs que tiveram a região 5' degradada.

A grande quantidade de antígenos com motivos repetitivos encontrada na biblioteca pode ser explicada, pela alta imunogenicidade que esses apresentam por serem compostos por regiões que se repetem. Pelo número de aminoácidos e vezes que esses motivos repetitivos ocorrem, os antígenos podem ser divididos em dois grupos. O grupo um é composto pelos clones LC 9 / LC 12, LC 14 / LC 16 e LC 18

que possuem repetições de 14 a 74 aminoácidos. Esses números são compatíveis com antígenos compostos por motivos repetitivos descritos, tanto nas espécies de *Leishmania*, como no caso dos antígenos K9 e K26 e o gene *ppg1* de 2300 aminoácidos, que possui cerca de 100 repetições de 15 aminoácidos e é um homólogo da glicoproteína de superfície do complexo *psa2/gp46* (Ilg et al. 1999), como também dos antígenos CRA e FRA de *T. cruzi*.

No grupo dois esta presente o clone LC 30, onde a repetição do seu homólogo é composta por pelo menos 1125 aminoácidos, um número bastante elevado, o que põe em dúvida se essa seqüência codifica mesmo uma proteína. Se isso ocorrer, esse antígeno pode vir a ser um ótimo candidato para um sistema de diagnóstico contra as leishmanioses, uma vez que, por não possuir homologia com nenhuma proteína descrita em outro gênero, pode ser bem específica para detecção de anticorpos contra as espécies de *Leishmania*.

As proteínas codificadas pelos clones LC 14 / LC 16, LC 9 / LC 12 e LC 18, por apresentarem um maior número de repetições, podem vir a constituir antígenos que poderão ser usados em testes de diagnóstico, altamente sensíveis para a *L. chagasi*. Por outro lado, a especificidade desses antígenos está comprometida, uma vez que o homólogo do LC 14 / LC 16 em *L. major*, apresenta uma alta homologia com uma proteína de *T. cruzi*. Os clones LC 9 / LC 12 e LC 18 são homólogos de proteínas descritas em várias espécies. Apesar disso alguns trabalhos, como o de Bhatia et al. (1999), mostram que proteínas compostas por motivos repetitivos podem ser usadas em conjunto com outros antígenos em testes sorológicos mais específicos contra as espécies de *Leishmania*.

Além dos fragmentos descritos nesse trabalho, foi identificado ainda, neste mesmo rastreamento, um outro clone, o LC13. A caracterização do seu fragmento final mostra

que ele codifica uma proteína homóloga de várias espécies de *Leishmania* que, entretanto não possui repetições, mas também apresenta uma alta imunogenicidade. Isso mostra que além de motivos repetitivos, outras características, talvez como a localização e função das proteínas, interfiram no grau de respostas dos antígenos a anticorpos contra os parasitas causadores das leishmanioses.

Concluimos então que as proteínas descritas parecem ser potentes candidatas para a elaboração de sistemas de diagnóstico contra a leishmaniose. Isso ocorre porque essas proteínas apresentam regiões de domínios repetitivos, o que aumenta a sensibilidade em testes sorológicos. Para uma melhor especificidade, entretanto estes sistemas podem ser elaborados usando essas proteínas em conjunto com outros antígenos que apresentam também alta imunogenicidade.

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith J, Struhl K 1992. *Short Protocols in Molecular Biology*. A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology. 2nd ed., New York.
- Beetham JK, Myung KS, McCoy J, Wilson ME, Donelson JE 1997. Glycoprotein 46 mRNA abundance is post-transcriptionally regulated during development of *Leishmania chagasi* promastigotes to an infectious form. *J Biol Chem* 272: 17360-17366.
- Bhatia A, Daifalla NS, Jen S, Badaro R, Reed ST, Skeiky YAW 1999. Cloning, characterization and serological evaluation of K9 e K26: two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasitol* 102: 249-261.

- Buates S, Matlashewski G 1999. Treatment of experimental leishmaniasis with the immunomodulators Imiquimod and S-28463: efficacy and mode of action. *J Infect Dis* 179: 1485-1494.
- Burns Jr JM, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG 1993. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 775-779.
- Button L. L, Reiner NE, McMaster R 1991. Modification of GP63 genes from diverse species of *Leishmania* for expression of recombinant protein at high levels in *Escherichia coli*. *Mol Biochem Parasitol* 44: 213-224.
- Champsi J, McMahon-Pratt D 1988. Membrane glycoprotein M-2 protects against *Leishmania amazonensis* infection. *Infect and Immun* 52: 3272-3279.
- Engers HD, Bergquist R, Modabber F 1996. Progress on vaccines against parasites. *Dev Biol Stand* 87:73-84.
- Etges R, Bouvier J, Bordier C 1986. The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a protease. *J Biol Chem* 261: 9098-9101.
- Follador I, Araujo C, Orge G, Cheng LH, Carvalho L, Bacellar O, Almeida RP, Carvalho EM 2002. Immune response to an inactive vaccine against American cutaneous leishmaniasis together with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Vaccine* 20: 1365-1368.

- Frankenburg S, Axelrod O, Kutner S, Greenblatt CL, Klaus SN, Pirak EA, McMaster R, Lowell GH 1996. Effective immunization of mice against cutaneous leishmaniasis using an intrisically adjuvanted synthetic lipopeptide vaccine. *Vaccine* 14: 923-929.
- Frommel D, Ogunkolade BW, Vouldoukis, Monjour L 1988. *Infect Immun* 56: 843-848.
- Gradoni L 2001. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. *Vet Parasitol* 100: 87-103.
- Herwaldt BL 1999. Leishmaniasis. *Lancet* 354: 1191-1199.
- Ilg T, Montgomery J, Stierhof YD and Handman E 1999. Molecular cloning and characterization of a novel repeat-containing *Leishmania major* gene, ppg1, that encodes a membrane-associated form of roteophosphoglycan with a putative glycosylphosphatidylinositol anchor. *J Biol Chem*. 29: 31410-31420.
- Joshi PB, Kelly BL, Kamhawi S, Sacks DL, McMaster WR 2002. Target gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Mol Biochem Parasitol* 120: 33-40.
- Krieger MA, Almeida E, Oelemann W, Lafaille JJ, Pereira JB, Krieger H, Carvalho MR, Golgenberg S 1992. Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' diseases. *Am J Trop Med Hyg* 46: 427-434
- Kull FJ, Sablin EP, Lau R, Fletterick RJ, Vale RD 1996. Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin. *Nature* 380: 550-555.

- Liu X, Chang K-P 1992. Extrachromosomal genetic complementation of surface metalloproteinase (gp63)-deficient *Leishmania* increases their binding to macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4991-4995.
- McMaster WR, Morrison CJ, Macdonald MH, Joshi PB 1994. Mutational and functional analysis of the *Leishmania* surface metalloproteinase GP63: similarities to matrix metalloproteinases. *Parasitology Cambridge* 108: S29-S36.
- Monjour L, Neogy AB, Vouldoukis I, Silva AO, Boisnic S, Brito MEF, Lesot A, Vignot N, Martins JS, Jardim ML 1994. Exploitation of parasite derived antigen in therapeutic success of human cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 479-483.
- Monroy-Ostria A, Hernandez-Montes O and Barker B 2000. Aetiology of visceral leishmaniasis in Mexico. *Acta Trop* 75: 155-161.
- Muller N, Felleisen R 1995. Bacterial expression systems are tools for the production of immunodiagnostic parasite antigens. *Parasitology Today* 11: 476-480.
- Myung KS, Beetham JK, Wilson ME, Donelson JE 2002. Comparison of the post-transcriptional for the surface proteins PSA (GP46) and MSP (GP63) of *Leishmania chagasi*. *J Biol Chem* 277: 16489-16497.
- Reed S 1996. Diagnosis of *Leishmania*. *Clin Dermatol* 14: 471-478
- Salotra P, Chauhan D, Ralhan R, Bhatnagar R 1995. Tumor necrosis factor-alpha induces preferential expression of stress proteins in virulent promastigotes of *Leishmania donovani*. *Immunology Lett* 44:1-5.



- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T 1989. *Molecular cloning – A laboratory manual*. 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schallig HDFH, Canto-Cavalheiro M, da Silva ES 2002. Evaluation of the direct agglutination test and the rK39 dipstick test for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 1015-1018.
- Silveira JF, Umezawa ES, Luquetti AO 2001. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends Parasitology* 17: 286-291
- Soussi N, Milon G, Colle J-H, Mougneau E, Glaichenhaus N, Goossens P 2000. *Listeria monocytogenes* as a short-lived delivery system for the induction of type 1 cell-mediated immunity against the p36/LACK antigen in *Leishmania major*. *Infect Immun* 68: 1498-1506.
- Steinkraus HB, Langer PJ 1992. The protein sequence predicted from a *Leishmania guyanensis* gp63 major surface glycoprotein gene is divergent as compared with other *Leishmania* species. *Mol Biochem Parasitol* 52: 141-144.
- Ulrich HD 2002. Degradation or maintenance: actions of the ubiquitin system on eukaryotic chromatin. *Eukaryotic Cell* 1: 1-10.
- VanDemark AP, Hill CP 2002. structural basis of ubiquitylation. *Curr Opin Struct Biol* 12: 822-830.
- Xu D, McSorley SJ, Chatfield SN, Dougan G, Liew FY 1995. Protection against *Leishmania major* infection in genetically susceptible BALB/c mice by gp63 delivered orally in attenuated *Salmonella typhimurium* (AroA-AroD-). *Immunology* 85: 1-7.

Yao C, Leidal KGL, Brittingham A, Tarr DE, Donelson JE, Wilson ME 2002.

Biosynthesis of the major surface protease GP63 of *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasitol* 121: 119-128.

Zilberstein D, Shapira M 1994. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol* 48: 449-470.

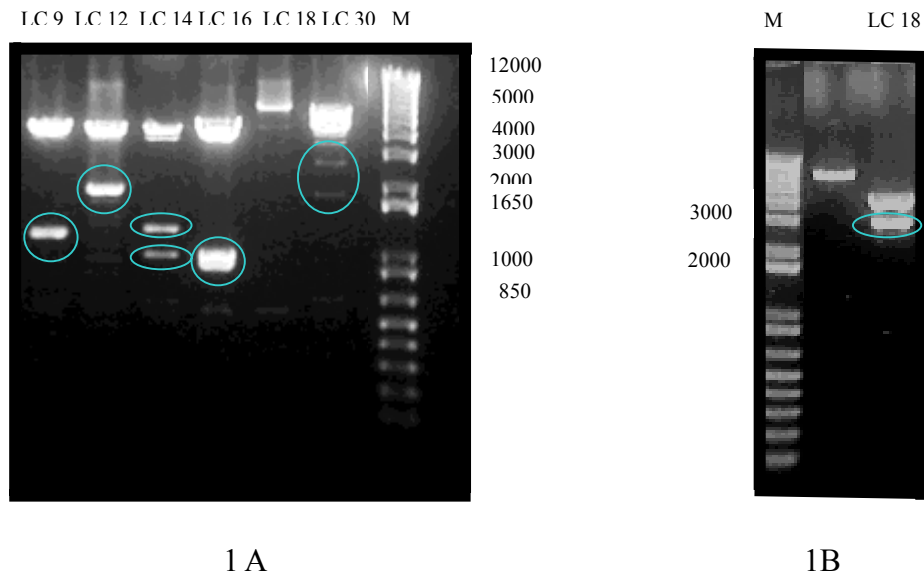
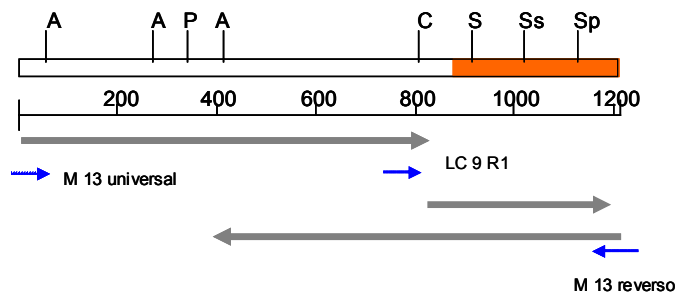


Fig 1. Digestões dos clones. A figura 1A mostra a digestão simultânea dos clones com as enzimas *Eco* RI e *Xho* I, que estima os tamanhos dos clones LC 9 em 1,2 Kb, LC 12 em 2,0 Kb, LC 14 em 2,25 Kb, LC 16 em 2,0 Kb (duas bandas de quase mesmo tamanho) e o LC 30 em 5,0Kb. O clone LC 18 é apenas linearizado com essa digestão. A figura 1B mostra a digestão do LC 18 com a enzima *Hinc* II presente também no plasmídeo, estimando seu tamanho em 2,2 Kb.

## LC 9



## LC 12

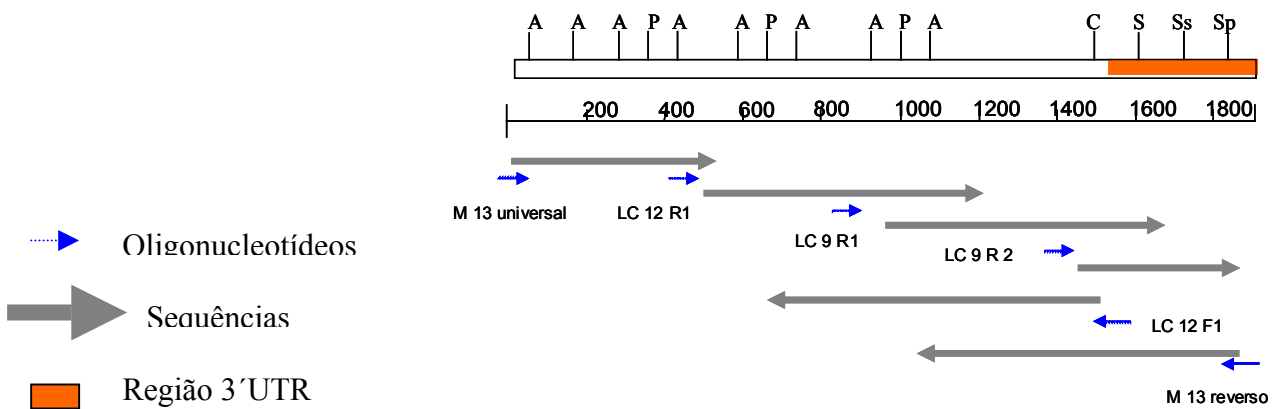


Fig 2. Esquema e resultado do sequenciamento dos clones LC 9 e LC12. As seqüências finais dos dois clones foram obtidas a partir de três oligonucleotídeos para o LC9 e seis o LC12. O primer LC 9 R1 interno foi usado nos dois clones. Essas seqüências são mostradas com suas enzimas de restrição. Regiões seqüenciadas apenas em um sentido, possuem boa qualidade e são confiáveis.

A – *Ava* II    P – *Pvu* II    C – *Cla* I    S – *Sac* I    Sp – *Sph* I    Ss – *Ssp* I

## LC 9 / LC12

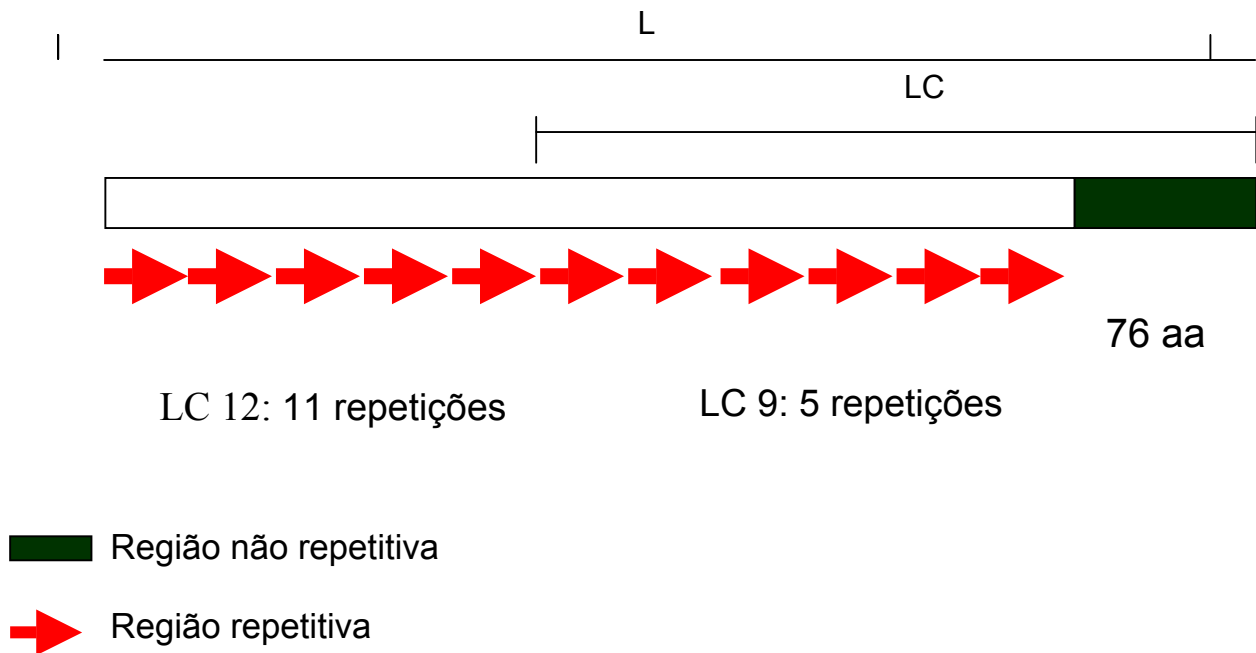
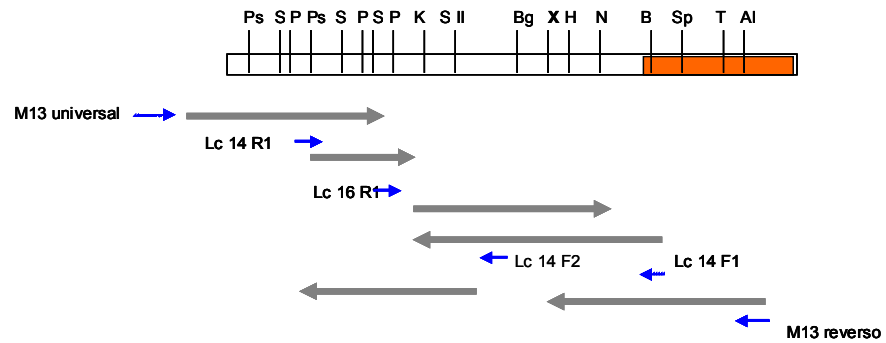


Fig 3. Esquema da proteína codificada pelos clones LC 9 e LC12. As proteínas codificadas por esses clones possuem 296 e 524 aminoácidos respectivamente e são compostas por uma região de 11 repetições no LC12 e cinco repetições no LC 9 de 39 aminoácidos, a região não repetitiva tem 76 aminoácidos.

## LC 14



## LC 16

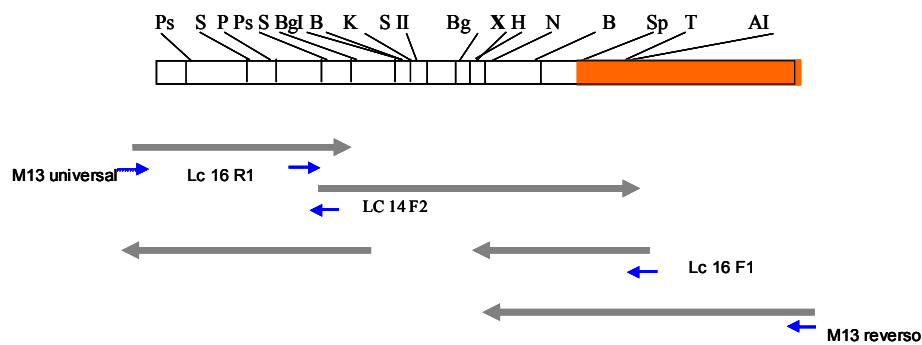


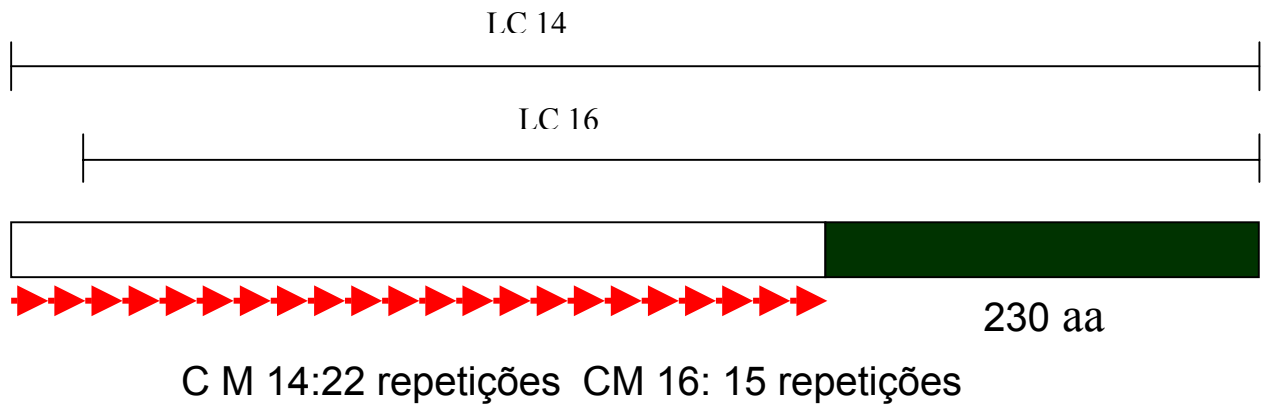
Fig 4. Esquema e resultado do sequenciamento dos clones LC 14 e LC 16. O clone LC 14 foi seqüenciado com seis oligonucleotídeos e o clone LC 16 com cinco. Alguns primers foram utilizados nos dois clones. As seqüências finais são mostradas com seus sítios restrição inclusive o sítio de Xho I interno. Regiões seqüenciadas apenas em um sentido possuem boa qualidade e são confiáveis.

Ps – *Pst* I      S – *Sac* I      P – *Pvu* II      B – *Bam* HI      K – *Kpn* I      S II – *Sac* II      Bg – *Bgl* I

X – *Xho* I      H – *Hind* III      N – *Nco* I      Sp – *Sph* I      T – *Tth* 111      AI – *Ava*

..

## LC 14/ LC 16



■ Região não repetitiva  
→ Região repetitiva

Fig 5. Esquema da proteína codificada pelos clones LC 14 e LC 16. As proteínas codificadas por esses clones possuem 296 e 524 aminoácidos respectivamente, sendo compostas por uma região de 22 repetições no LC 14 e de 15 repetições no LC 16. A região não repetitiva possui 76 aminoácidos.

## Clone parcial do LC 18

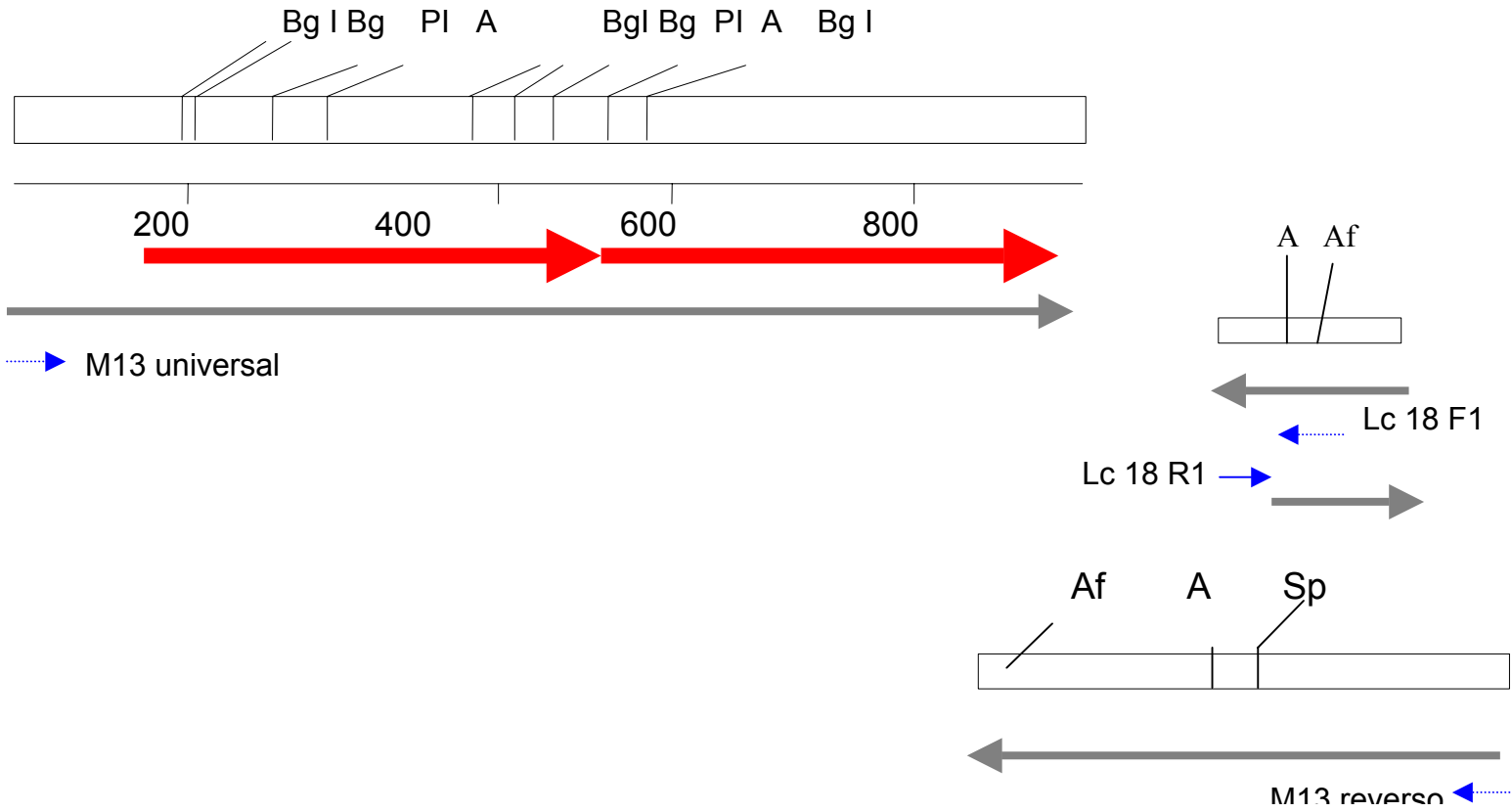


Fig 6. Esquema do seqüenciamento parcial do clone LC18. As quatro seqüências do LC 18 foram obtidas com quatro oligonucleotídeos diferentes. O fragmento total tem um tamanho estimado de 2,2 Kb e é composto por duas repetições de 222 nucleotídeos.

Bg I – *Bgl* I      Bg – *Bgl* II      PI – *Pvu* I      A – *Ava* II      Af – *Afl* III



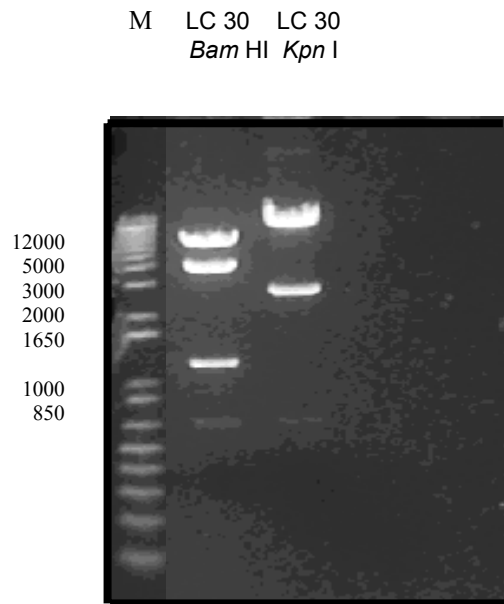


Fig 7. Digestão do clone LC 30. O plasmídeo LC 30 foi digerido com as enzimas *Bam* HI e *Kpn* I. O produto da reação foi corrido em gel de agarose 0,8 %. Os clone LC 30 – KPN, LC 30 Bam HI e o LC 30 – Kpn – Bam HI foram construídos a partir dessa digestão. O marcador usado é o Ladder 1Kb plus da Life Technologies.

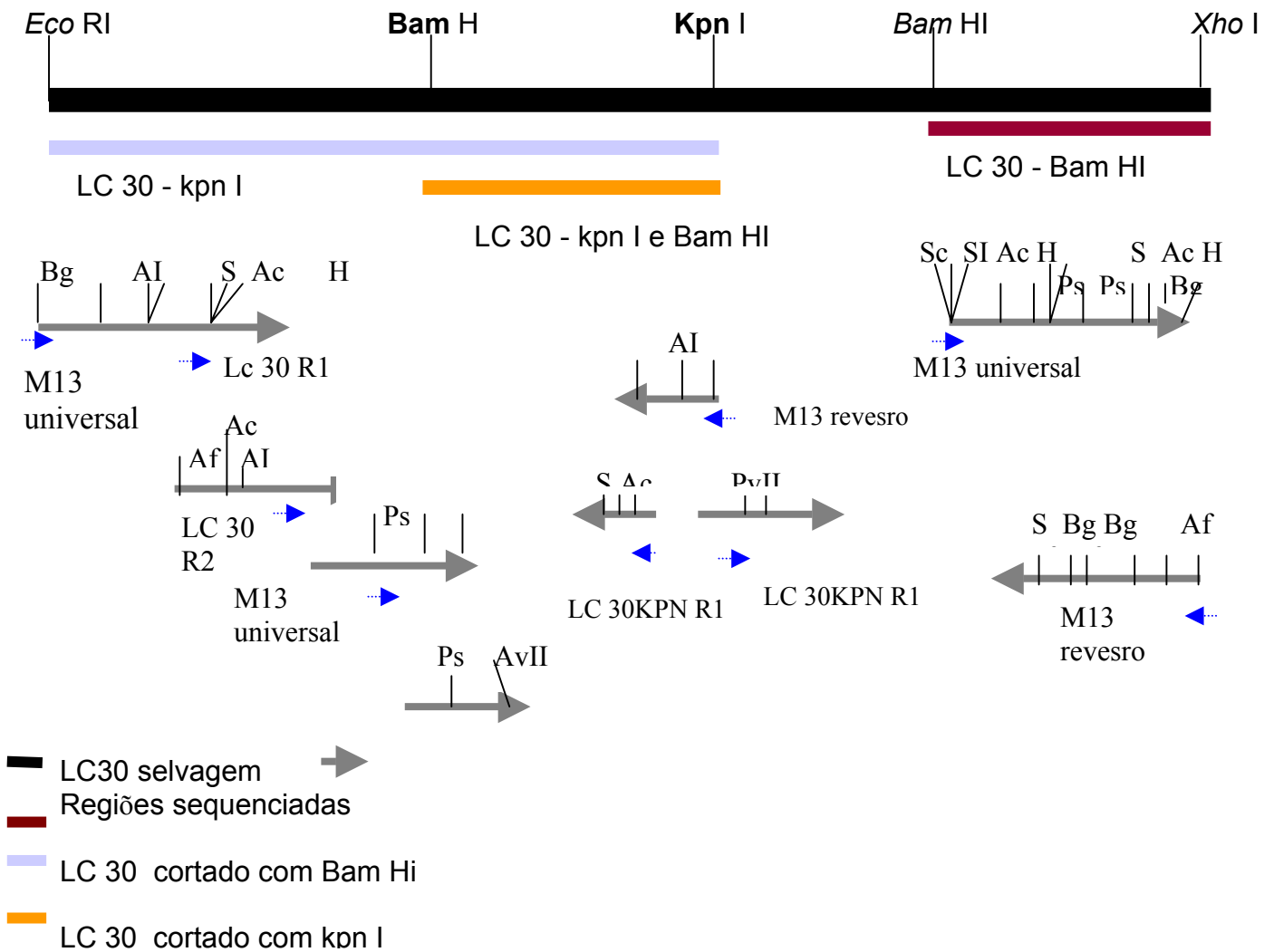
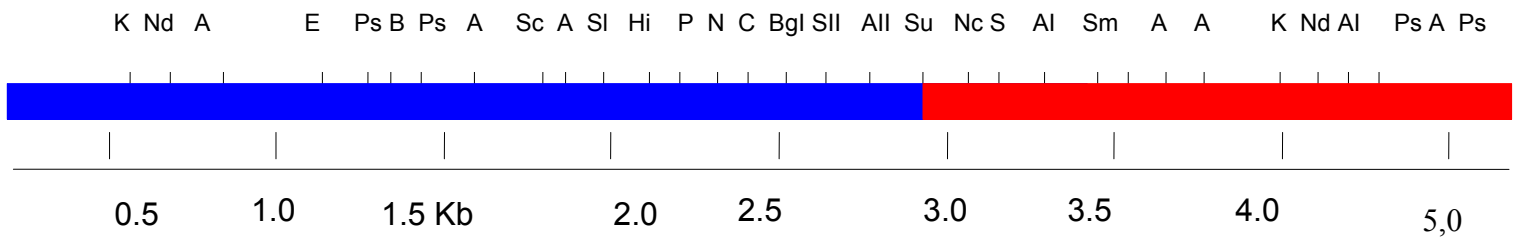


Fig 8: Esquema do sequenciamento do clone LC 30. Foram construídos três clones com as enzimas *Kpn I* e *Bam HI*. Ao todo foram usados seis oligonucleotídeos que deram origem a nove fragmentos diferentes. O fragmento inteiro não foi ainda totalmente sequenciado. Bg – *Bgl I* AI – *Ava I* S – *Sac I* Ac - *Accl* H – *Hind III* Af – *Afl III* K – *Kpn I* SI – *Sal I* Ps – *Pst I*



- Região repetida completa
- Região repetida parcialmente

Fig 9. Esquema da seqüência da região do cromossomo LC 16 de *L. major* que tem homologia com o clone LC 30. Essa seqüência possui 5703 nucleotídeos e é composta por uma região de aproximadamente 3376 nucleotídeos com duas repetições parciais.

K – *Kpn* I    Nd – *Nde* I    A – *Ava* II    T – *Tth* 111    E – *Eco* RI    P – *Pvu* II    Ps – *Pst* I    Sc – *Sca* I    SI – *Sal* I    HI – *Hiinc* II    N – *Not* I

C – *Cla* I    Bg I – *Bgl* I    S II – *Sac* II    AI – *Ava* I    Su – *Stu* I    Nc – *Nco* I    Sm – *Sma* I