



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



Juliana Pereira Lage da Silveira Gasparini

Métodos proteômicos aplicados à análise composicional e controle de qualidade da LBSap, preparação vacinal anti Leishmaniose Visceral Canina

OURO PRETO – MG

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE ENZIMOLOGIA E PROTEÔMICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica Estrutural e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. William de Castro Borges

OURO PRETO – MG

2017

G213m Gasparini, Juliana Pereira Lage da Silveira.
Métodos proteômicos aplicados à análise composicional e controle de
qualidade da LBSap, preparação vacinal anti Leishmaniose visceral canina
[manuscrito] / Juliana Pereira Lage da Silveira Gasparini. - 2017.
xiii, 89f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Prof. Dr. William de Castro Borges.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de
Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Bioquímica Estrutural e Biologia Molecular.

1. Proteômica . 2. Leishmaniose visceral . I. Borges, William de Castro. II.
Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 616.993.161

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



nupeb

Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

"Métodos proteômicos aplicados à análise composicional e controle de qualidade da LBSap, preparação vacinal anti Leishmaniose Visceral Canina "

Aos doze dias do mês de dezembro de 2017, às 13 horas e 30 minutos, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Juliana Pereira Lage da Silveira Gasparini**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Bruno Mendes Roatt
Examinador (UFOP)

Prof. Dr. Roney Santos Coimbra
Examinador (FIOCRUZ)

Prof. Dr. William de Castro Borges
Presidente (UFOP)

DATA DA DEFESA: 12/12/2017



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NUPEB - Bloco I / Universidade Federal de Ouro Preto Campus Universitário
Morro do Cruzeiro / CEP 35.400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil Tel: 55 (31) 3559 1691
E-mail: cbiol@nupeb.ufop.br / www.nupeb.ufop.br/cbiol

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar meus caminhos.

Ao meu esposo Vitor por todo amor, dedicação, paciência e apoio em todos os momentos.

Ao meu filho Pedro que trouxe luz para minha vida, me ensinou a forma mais pura de amar e ser a cada dia mais forte. Obrigada por todo carinho.

Aos meus pais por terem me ensinado a lutar e não desistir dos meus sonhos. Aos meus irmãos, especialmente minha irmã Andreza, pela amizade e palavras de apoio. Apesar da distância você está sempre presente.

Ao prof. William de Castro Borges pela oportunidade de realizar o mestrado. Obrigada por todo apoio, aprendizado e amizade.

Aos amigos do LEP, pela amizade, ensinamentos, momentos de descontração e ajuda. Agradeço ao Leandro pelo aprendizado, auxílio e discussões sobre meu trabalho; à Ananda pela amizade e ensinamentos; ao Bruno por estar sempre disposto a nos ajudar e auxílio nos experimentos; a Ana Helena pela amizade e apoio; ao Gustavo pelo auxílio nos experimentos finais; e às amigas de caminhada, Luciana e Mariana, que tive oportunidade de conhecer no mestrado, obrigada por toda força, risadas e palavras de amizade. Serei sempre grata a cada um de vocês, pela enorme ajuda e apoio para conclusão deste trabalho, principalmente, quando eu estava à espera do meu pequeno Pedro.

Ao prof. Marcos Aurélio, pelas orientações e disponibilidade.

Ao José Henrique, pelo apoio técnico, organização do laboratório e momentos de descontração.

Aos laboratórios LIMP, prof. Alexandre Reis e Rodrigo Dian, pela parceria na execução desse projeto e orientações; e ao LIP, pelo apoio técnico na realização das dosagens.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

À UFOP, ao NUPEB, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas e a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
Resumo	xii
Abstract	xiii
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Aspectos gerais sobre leishmanioses	14
1.2. Leishmaniose visceral canina.....	17
1.3. Vacinas para leishmaniose canina.....	19
1.4. LBSap: preparação vacinal contra LVC	25
1.5. Proteômica no controle de qualidade de amostras complexas	28
2. OBJETIVOS	33
2.1. Objetivo geral.....	33
2.2. Objetivos específicos	33
3. METODOLOGIA	34
3.1. Formulação das preparações vacinais	34
3.2. Avaliação da capacidade extrativa de saponina (<i>Quilaja saponaria</i>) sobre o antígeno particulado de <i>Leishmania braziliensis</i>	36
3.2.1 – Obtenção dos extratos solúvel e de membrana para avaliação da atividade da saponina.....	36
3.2.2- Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida.....	37
3.2.3 – Coloração por coomassie coloidal	38
3.2.4 – Coloração por nitrato de prata.....	39
3.3. Quantificação e análise eletroforética das preparações vacinais.	39
3.3.1- Avaliação de possíveis contaminantes na Saponina (S7900 – Sigma).....	39
3.3.2 - Quantificação de proteínas	40

3.3.3 - Eletroforese unidimensional das preparações vacinais.....	40
3.4. Avaliação da interferência da saponina nos métodos de quantificação de proteínas por BCA, Lowry e Bradford.....	41
3.5. Análise composicional do antígeno particulado de <i>Leishmania braziliensis</i> e das preparações vacinais submetidos a diferentes tratamentos.	41
3.5.1 Digestão em gel.....	41
3.5.2 - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas	43
3.5.3 – Análise dos dados.....	44
3.6. Avaliação do perfil de imunoreatividade por <i>Western blotting</i> das diferentes preparações vacinais em estudo frente ao soro de cães vacinados com LBSap.....	45
4. RESULTADOS.....	47
4.1. Capacidade extrativa de saponina (<i>Quilaja saponaria</i>) sobre o antígeno particulado de <i>Leishmania braziliensis</i>	47
4.2. Avaliação da presença de proteínas como contaminante na saponina S7900 (Sigma).....	48
4.3. Resultados da quantificação de proteínas e perfil eletroforético unidimensional das preparações vacinais.	48
4.4. Análise da interferência da saponina na quantificação de proteínas pelos métodos BCA, Bradford e Lowry.....	50
4.5. Nanocromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e análise proteômica quantitativa em larga escala	52
4.6 Avaliação do perfil de imunoreatividade por <i>Western blotting</i> das diferentes preparações em estudo frente ao soro de cães vacinados com LBSap.....	65
5. DISCUSSÃO	66
6. CONCLUSÃO	73
7. PERSPECTIVAS	74
8. REFERÊNCIAS.....	75
9. ANEXOS	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida das leishmanias.	15
Figura 2: Variações estruturais observadas nas saponinas de <i>Q. saponaria</i>	27
Figura 3: Esquema da obtenção das proteínas de membrana para avaliação da capacidade extrativa da saponina.	37
Figura 4: Capacidade extrativa da saponina sobre proteínas de membrana.	47
Figura 5: Gel representativo da precipitação de proteínas na amostra de saponina S7900 (Sigma).	48
Figura 6: Perfil eletroforético das preparações vacinais produzidas pela Ouro Fino. ...	50
Figura 7: Dosagem de proteína totais pelos métodos BCA, Bradford e Lowry.	51
Figura 8: Representação do TIC (<i>total ion current</i>).	53
Figura 9: Correlação de Pearson entre réplicas.	55
Figura 10: Total de 451 grupos de proteínas diferencialmente identificadas após aplicação dos filtros para peptídeos e proteínas.	56
Figura 11: Total de PSM (<i>peptide spectrum match</i>) por amostra.	57
Figura 12: <i>Heat Map</i> representando as 1.063 proteínas comuns as amostras AgLB L1/15 4°C SART (amostra filtrada) e AgLB L3/15 4°C (não filtrada).	58
Figura 13: Gráfico Volcano das 1.063 proteínas identificadas das amostras AgLB L1/15 4°C SART e AgLB L3/15 4°C, sem aplicação dos filtros.	59
Figura 14: Diagrama de Venn entre as amostras LBSap 1/14 4C, AgLB 3/15 e AgLB 1/15 Sart.	60
Figura 15: Perfil de reatividade do soro dos cães imunizados (T3) frente as preparações vacinais de LBSap.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição das preparações vacinais.....	36
Tabela 2: Resultado da quantificação de proteínas totais por BCA.	49
Tabela 3: Resultados das dosagens com diferentes concentrações de saponina pelos métodos BCA, Bradford e Lowry.....	51
Tabela 4: Proteínas diferencialmente identificadas entre as amostras AgLB L1/15 4°C SART e AgLB L3/15 4°C.....	60
Tabela 5: Relação das proteínas com CV < 20%.	61

LISTA DE ABREVIATURAS

APC - Célula apresentadora de antígeno

BCA - Ácido bicinconínico

BSA - Albumina bovina

CBB - *Coomassie brilliant blue*

CTL - Linfócitos T citotóxicos

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DOMVs - Vesículas de membrana externa extraídas com detergente

DTT - Ditioneitol

FDR - *False Discovery rate*

FML - *Fucose manose ligand*

HCD - *Higher-energy collisional dissociation*

IEF - Focalização isoeletrica

IFN- γ - Interferon γ

Ig - Imunoglobulinas

IL - Interleucina

ISCOMS - Complexo imunoestimulante

KMP-11 - Proteína de membrana de kinetoplasto 11

LACK - Leishmania C-quinase ativada

LC - Leishmaniose Cutânea

LC-MS - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

LEP - Laboratório de Enzimologia e Proteômica

LIMP - Laboratório de Imunopatologia

LIT - *Liver Infusion Tryptose*

LPS - Lipopolissacarídeos bacterianos

LV - Leishmaniose Visceral

LVC - Leishmaniose Visceral Canina

m/z - razão massa/carga

MALDI - *Matrix-assisted laser desorption/ionization*

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MPL - Monofosforil lipídeo A

MS - Ministério da Saúde

NNN - Nicolle-Novy-Neal

OF - Ouro Fino Agronegócios

OMS - Organização Mundial de Saúde

PKDL - Leishmaniose Dérmica Pós kala azar

PVDF - Fluoreto de polivinilideno

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE 1D - Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida

TCA - Ácido trifluoroacético

Temed - *Tetramethylethylenediamine*

TGF- β - *Transforming growth factor beta*

TIC - *total ion current*

TNF- α - Fator de necrose tumoral α

Resumo

A preparação vacinal LBSap consiste de um antígeno particulado de promastigotas de *Leishmania braziliensis* (cepa MHOM/BR/1975/M2903), rompidas por sonicação e administradas juntamente com o adjuvante saponina. A partir de estudos de fase clínica I e II em cães, foi demonstrado o potencial imunogênico da LBSap e obtido registro de patente em 2006. Com o início dos testes em escala industrial junto à empresa Ouro Fino Agronegócios, surgiram alguns questionamentos quanto ao controle composicional dessas amostras quando submetidas a diferentes condições tais como filtração terminal do produto, possibilidade de envase do imunobiológico com saponina em mesmo vial e temperatura de estocagem. Este trabalho propõe uma metodologia capaz de avaliar o proteoma total das preparações de LBSap produzidas industrialmente para detecção de variações na composição molecular quando submetida aos diferentes tratamentos. Proteômica shotgun foi ferramenta de escolha para as análises em larga escala empregando-se a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS, nanoHPLC Q-Exactive). Por meio do software PEAKS Studio e do banco de dados do proteoma de *L. braziliensis* realizou-se identificação e quantificação label-free obtendo-se no total 1.654 proteínas comuns a essas amostras o que representa 20% do proteoma da leishmania. Os parâmetros de quantificação permitiram a comparação das diferentes formulações e avaliação de reprodutibilidade entre réplicas. No total, 451 grupos de proteínas foram diferencialmente identificados. Diferenças marcantes de quantificação foram encontradas na amostra estocada à 37°C, com diminuição no nível de proteínas possivelmente resultante de degradação, quando comparada às amostras estocadas a 4°C. Experimentos de Western Blotting mostraram que o perfil de imunorreatividade é menor nas amostras contendo saponina e armazenadas à 37°C, quando comparado às demais, reforçando os achados de degradação. O processo de filtração terminal do produto não afetou significativamente a composição, sendo que apenas 6 proteínas abundantes foram diferencialmente identificadas. A estratégia de proteômica shotgun apresentou-se como uma ferramenta útil para determinação da composição molecular de LBSap e deve direcionar ações para desenvolvimento do controle de qualidade dessa formulação vacinal.

Palavras chave: Proteômica shotgun, Leishmaniose, controle de qualidade, vacina

Abstract

The LBSap vaccine formulation consists of a particulate antigen of *Leishmania braziliensis* promastigotes (strain MHOM/BR/1975/M2903), sonicated and administered along with adjuvant saponin. From the clinical phase I and II studies in dogs, the immunogenic potential of LBSap was obtained and patent registration was obtained in 2006. Prior to scaling up LBSap production at Ouro Fino Agronecios some questions were raised concerning its compositional control when subjected to different conditions such as terminal filtration of the product, possibility of packaging of the particulate antigen and saponin in the same vial and storage temperature. This work proposes a methodology capable of evaluating the total proteome of industrially produced LBSap preparations for detecting variations in molecular composition when submitted to different treatments. Shotgun proteomics was the tool of choice for large-scale analyzes using liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS, nanoHPLC Q-Exactive). Through the PEAKS Studio software and the protein database of *L. braziliensis*, a label-free identification and quantification analysis was performed, obtaining 1,654 proteins common to these samples. This represented a 20% coverage of the *Leishmania* proteome. The quantification parameters allowed the comparison of the different formulations and evaluation of the reproducibility between replicates. In total, 451 groups of proteins were differentially identified. Significant quantification differences were found in the sample stored at 37° C, with a decrease in protein levels possibly resulting from degradation, when compared to the samples stored at 4° C. Western Blotting experiments showed that the immunoreactivity profile is of lower intensity in the samples containing saponin and stored at 37°C, when compared to the others, reinforcing the degradation findings. Terminal filtration of the product did not significantly affect the composition, and only 6 abundant proteins were differentially identified. The strategy of shotgun proteomics was presented as a useful tool to determine the molecular composition of LBSap and should direct actions to develop the quality control of this vaccine formulation.

Keywords: Shotgun proteomics, LBSap, Canine Visceral Leishmaniasis, quality control and vaccine.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais sobre leishmanioses

As leishmanioses são doenças transmitidas pela picada do mosquito fêmea do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia* infectados por parasitos protozoários do gênero *Leishmania*, família *Trypanosomatidae* (Lainson & Shaw, 1987; Ross, 1903). Existem cerca de 30 espécies de flebotomíneos e 20 espécies do gênero *Leishmania* que apresentam grande complexidade biológica e genética (Desjeux, 2004; Murray *et al.*, 2005).

Dentro do gênero *Leishmania* existe uma divisão em subgêneros: *L. (Leishmania)* conhecidas como leishmanias do velho mundo, *L. (Viannia)* como espécies do novo mundo e *L. (sauroleishmania)* sendo espécies que não infectam mamíferos (Fraga *et al.*, 2010). Estes parasitos apresentam um ciclo de vida digenético, alternando uma fase promastigota (flagelada), presente no intestino do inseto vetor, e outra forma com tamanho reduzido, denominada amastigota (com flagelo não aparente), encontrada no fagolisossomo de células fagocíticas do hospedeiro vertebrado (Reithinger *et al.*, 2007).

O ciclo de vida desse parasito leishmania se inicia durante o repasto sanguíneo do inseto vetor o qual inocula no hospedeiro vertebrado a forma promastigota flagelar juntamente com a saliva. Células fagocitárias do sistema imune tais como macrófagos, células dendríticas ou neutrófilos fagocitam essas promastigotas formando um vacúolo parasitóforo. Dentro do vacúolo, os macrófagos tentam eliminar o parasito através da liberação de hidrolases lisossomais e da cascata de metabólitos de oxigênio como óxido nítrico. No entanto, as promastigotas conseguem evadir as defesas do hospedeiro diferenciando-se em amastigotas e, assim, atenuando a função microbicida e modulando a resposta imune inata e adaptativa. A saliva do flebotomo também contribui para o estabelecimento da infecção pois contém substâncias vasodilatadoras que inibem a produção de citocinas como IL-12, TNF- α e de espécies reativas de oxigênio além de estimular a produção de citocinas envolvidas na resposta imune não protetiva como IL-10, IL-6. O progresso da infecção dependerá da eficiência da resposta imune do hospedeiro sendo necessário um equilíbrio entre as respostas imunes do tipo Th1 e Th2.

As amastigotas recém-formadas se multiplicam por divisão binária até haver rompimento celular sendo liberadas e podendo infectar novas células (Solbach & Laskay, 1999; Kaye & Scott, 2011). O ciclo se completa quando o flebotomíneo ingere macrófagos infectados durante o repasto sanguíneo. No intestino do flebotomíneo as amastigotas são conduzidas à região anterior do trato digestório onde se aglomeram e se diferenciam em promastigotas procíclicas estando protegidas pela matriz peritrófica. Quando a matriz se rompe, as promastigotas podem migrar para o epitélio do trato digestório onde se multiplicam por divisão binária e se aderem no epitélio através do flagelo. Os parasitos migram para região anterior do intestino até a válvula estomodeal onde se concentram e passam pelo processo de metaciclo-gênese dando origem às promastigotas metacíclicas que possuem corpo celular menor e flagelo maior, o que as tornam mais rápidas e infectantes. As promastigotas se aglomeram e danificam a válvula migrando para a probóscide sendo regurgitadas e transmitidas a um novo hospedeiro vertebrado durante repasto sanguíneo do flebotomíneo (Stebut, 2015).

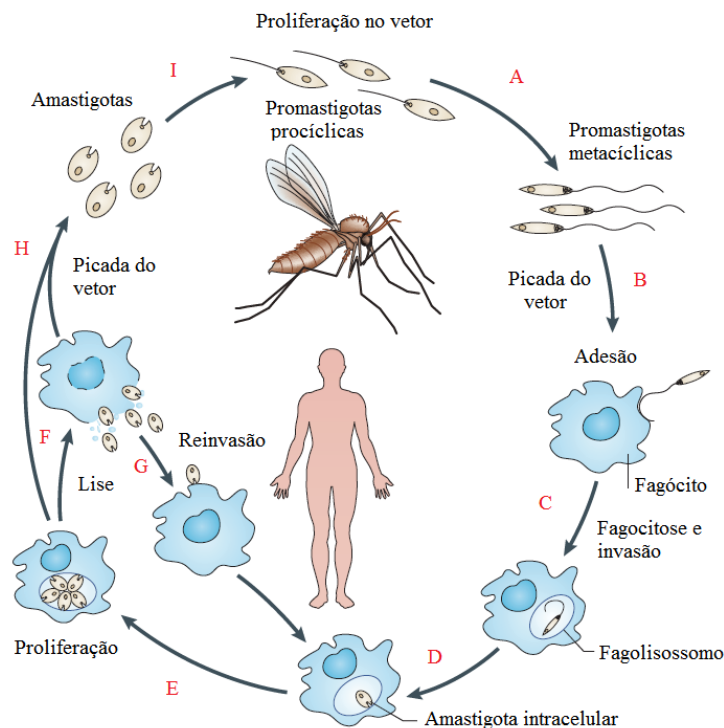


Figura 1: Ciclo de vida do parasito Leishmania.

A) Formas promastigotas procíclicas de Leishmania se replicam e diferenciam no inseto vetor para formas infectivas e não replicantes denominadas promastigotas metacíclicas. B) Durante o repasto sanguíneo do inseto vetor, promastigotas metacíclicas são regurgitadas no hospedeiro vertebrado junto com a saliva. C) Células do sistema imune como macrófagos fagocitam as

promastigotas que conseguem evadir o sistema de defesa do hospedeiro D) Após estabelecer uma resistência intracelular, promastigotas metacíclicas se transformam em uma forma não flagelada denominada amastigota. E) Replicação de amastigotas dentro da célula hospedeira por divisão binária. F) Célula hospedeira se rompe com o excesso de amastigotas. G) Reinfecção de outros fagócitos. H) O ciclo de vida do parasito se completa quando fagócitos infectados são ingeridos por outro inseto vetor durante o repasto sanguíneo. I) Amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas no intestino do inseto. (Adaptado de Kaye & Scott, 2011)

As leishmanioses possuem um amplo espectro de manifestações clínicas com sintomatologia extremamente variável que podem ser cutânea, mucocutânea e visceral. Pacientes imunossuprimidos, crianças e idosos são mais propensos a desenvolver a forma visceral da doença (Desjeux, 2004; Stebut, 2015). O determinante da forma clínica está relacionado com o estado imunológico, fatores do hospedeiro e da espécie de *Leishmania*, sendo que existem muitas espécies que causam a doença no homem (Murray *et al.*, 2005).

A forma cutânea é a mais comum afetando cerca de 90% dos pacientes. Acomete áreas da pele como face, pescoço, braços e pernas. Após semanas ou meses pós infecção forma-se um nódulo que cresce continuamente até a ulceração. Também pode ocorrer impetiginização secundária, infecção caracterizada por lesões com bordas elevadas apresentando eritema, edema, dor e prurido. Em imunocompetentes, a lesão cura após 6-18 meses podendo ocorrer leishmaniose recorrente com disseminação e lesões não ulceradas. A forma mucocutânea afeta 5% dos pacientes e pode estar associada à espécie *L. braziliensis*, tratamento inadequado ou inexistente da infecção primária. Ocorre severa destruição do tecido começando no septo nasal com perfuração, destruição, superinfecção e obstrução. A mortalidade é alta devido à dificuldade de engolir e caquexia. A leishmaniose visceral, também conhecida como kala azar, acomete órgãos internos com parasitismo do fígado, baço, órgãos linfáticos, medula óssea (Stebut, 2015). A doença está entre as seis endemias mais importantes do mundo e pode ser causada pelas espécies do complexo *Leishmania donovani* composto pela *L. donovani* e *L. infantum* no Velho Mundo e pela *L. chagasi* nas Américas. Nessa forma clínica não ocorre lesões na pele, sendo caracterizada por mal-estar, fraqueza, febre irregular, suor noturno, anorexia, caquexia, perda de peso, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, hipergamaglobulinemia e anemia. Estes sinais e sintomas progridem por semanas a meses e, eventualmente, desenvolve-se uma pigmentação escura na pele (*Hindi* = Kala azar = pele escura). A forma visceral é, então, a mais grave da doença e muitas vezes é fatal quando não tratada

(Osman *et al.*, 2000; Palatnik-de-Sousa *et al.*, 2001; Desjeux, 2004; Murray *et al.*, 2005; Stebut, 2015). Pacientes pós kala azar podem desenvolver leishmaniose cutânea crônica denominada Leishmaniose Dérmica Pós kala azar (PKDL) a qual requer um tratamento longo e oneroso (Desjeux, 2004; Stebut, 2015).

Segundo a OMS, a leishmaniose afeta pessoas pobres da África, Ásia e América Latina, estando associada com desnutrição, migração da população das áreas rurais para urbanas, más condições de habitação e falta de recursos. Cerca de 88 países são endêmicos, tendo incidência estimada de 1 a 1,5 milhões de casos de Leishmaniose Cutânea (LC) e 500.000 casos de Leishmaniose Visceral (LV). Estima-se que 12 milhões de pessoas estejam infectadas e que 350 milhões se encontram sob risco de contrair a doença. Mais de 90% dos casos de LV ocorrem em áreas pobres rurais e suburbanas dos países Bangladesh, Brasil, Nepal, Índia e Sudão (Desjeux, 2004; WHO, 2016).

No tratamento da Leishmaniose, as drogas mais utilizadas são os antimônios pentavalentes, miltefosine oral, anfotericina B, anfotericina B lipossomal e paramomicina. Os maiores problemas relacionados a essas drogas são o alto custo, toxicidade, duração de tratamento, via de administração e resistência. Antimônio pentavalente é a droga de primeira escolha, mas há muitos casos de resistência sendo substituído pela Anfotericina B. Entretanto, essa droga é bem tóxica e há casos de resistência do parasito. Miltefosine é então uma droga promissora apesar de haver alguns relatos de recidivas (Jain, K., & Jain, N. K., 2013).

1.2. Leishmaniose visceral canina

O primeiro caso de leishmaniose canina por *L. infantum* foi descrito por Nicole e Comte em 1908 na Tunísia e, desde então, o conhecimento da infecção pelo parasito tem expandido. Várias espécies de *Leishmania* infectam o cão dentre elas *L. infantum* no Velho Mundo, *L. chagasi* (sinônimo de *L. infantum* no Novo Mundo nas Américas Central e Sul), *L. donovani*, *L. tropica*, *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. panamensis*. As espécies possuem ampla distribuição geográfica e há forte associação entre a espécie do parasito e flebotomíneo devido a enzimas específicas e ligantes presentes no intestino do inseto

(Solano-Gallego *et al.*, 2009). A infecção por *L. infantum* em cães desenvolve a forma visceral sendo considerada uma das mais importantes devido ao cão ser o reservatório urbano do parasito e o elo de transmissão da doença ao homem. (Molina *et al.*, 1994). Além disso, a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) possui alta prevalência (1 caso humano para cada 10 caninos), alto parasitismo cutâneo em cães assintomáticos e, geralmente, os casos humanos são precedidos de uma infecção canina (Soares, 2012).

Durante o ciclo de transmissão nos cães, as fêmeas hematófagas do flebotomíneo alimentam-se em áreas com pouca quantidade de pêlos tais como orelha, nariz, cabeça e áreas anal e inguinal. Alguns mecanismos são responsáveis pela susceptibilidade ou resistência a infecção podendo influenciar na polaridade das manifestações clínicas como idade, nutrição, coinfeções, genética, sexo, condições imunossupressoras, citocinas, carga parasitária, cepa do parasito, infecções prévias e forma de transmissão. As manifestações clínicas variam amplamente em consequência dos mecanismos patogênicos da doença, órgãos afetados e diversidade da resposta imune. Os principais achados clínicos em cães incluem lesões na pele, linfadenomegalia, perda de peso, atrofia muscular, diminuição do apetite, letargia, esplenomegalia, lesões oculares, vômito, diarreia, poliúria e epistaxes (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Atualmente, as formas de controle da transmissão da doença estabelecidas pelo Ministério da Saúde (MS) não se mostram eficazes e se baseiam no uso de inseticidas, tratamento dos doentes, detecção e eliminação de cães soropositivos e controle dos vetores (Desjeux, 2004; Palatnik-de-Sousa *et al.*, 2001). A imunoprofilaxia de cães assintomáticos era, até então, contraindicada pelo MS sob justificativa da impossibilidade de se diferenciar um cão imunizado do infectado naturalmente sendo preconizado a eutanásia dos cães sororreativos. Entretanto, a Instrução Normativa Interministerial nº31/2007 (D.O.U. 10/07/2007) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) permite o uso de vacina desde que existam métodos laboratoriais que possam diferenciar cães vacinados de cães infectados através de kits para diagnóstico registrados no MAPA. Somente cães com diagnóstico sorológico negativo para LVC podem ser vacinados, sendo que para tal, nos municípios endêmicos deve haver kits disponíveis para diagnóstico. Além disso, a vacinação deve ter indicação e atestado de uso pelo veterinário, registro de doses administradas e submissão dos registros ao MS seguindo todas as

exigências previstas na instrução normativa. Mesmo que vacinados, os cães que apresentarem sinais clínicos de leishmaniose visceral, reações sorológicas positivas que não possam ser atribuídas à imunidade vacinal estão passíveis às medidas sanitárias vigentes (Ministério da Saúde, 2007)

O tratamento de cães infectados com produtos de uso humano e não registrados pelo MAPA é proibido conforme Portaria Interministerial do MS 1.426/2008, considerando que (1) não há, até o momento, nenhum fármaco ou esquema terapêutico que garanta a eficácia do tratamento canino, bem como a redução do risco de transmissão, (2) a existência de risco de cães em tratamento manterem-se como reservatórios e fonte de infecção para o vetor e que não há evidências científicas da redução ou interrupção da transmissão, (3) existência de risco de indução a seleção de cepas resistentes aos medicamentos disponíveis para o tratamento das leishmanioses em seres humanos, e (4) não existem medidas de eficácia comprovada que garantam a não-infectividade do cão em tratamento. Apesar do desaparecimento dos sinais clínicos o cão continua sendo fonte de infecção sendo um risco para a saúde humana e canina (Ministério da Saúde, 2008). Em 2016, por meio da Nota Técnica Conjunta nº 001/2016 MAPA/MS, assinada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento e pelo Ministério da Saúde foi autorizado o registro do produto Milteforan, sob número SP 000175-9.000003, de propriedade da empresa VIRBAC SAÚDE ANIMAL, para o tratamento da leishmaniose visceral de cães (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2016).

1.3. Vacinas para leishmaniose canina

A prevalência da leishmaniose é alta e o controle da doença tem sido insuficiente devido a fatores como alto custo, toxicidade, ineficiência e resistência às drogas, ausência de vacinas para humanos contra leishmaniose, diversidade e complexidade do parasito, além da variedade de resposta com ampla distribuição geográfica (Giunchetti, 2007; Jain, & Jain, 2015). Considerando-se a importância do cão como mantenedor do ciclo de

transmissão e a resistência dos proprietários na eutanásia de seus animais quando soropositivos, a OMS considera a imunoprofilaxia a melhor estratégia para controle de doenças infecciosas uma vez que a administração profilática em antecipação à exposição ao patógeno pode contribuir para eliminação do agente infeccioso e ativação do sistema imune (Palatnik-de-Sousa *et al.*, 2001).

Embora aconselhada, a vacinação profilática ainda é questionada pela necessidade de se desenvolver uma memória imunológica duradoura, além dos desafios relacionados a complexa imunogenicidade do parasito, ausência de resposta no hospedeiro, variabilidade de espécies e custo efetivo das vacinas. A análise genômica detectou muitas sequências homólogas entre as espécies de *Leishmania* sugerindo ser possível gerar vacinas efetivas contra as diferentes formas clínicas da Leishmaniose e as pesquisas relacionadas ao desenvolvimento têm sido promissoras (Palatnik-de-Sousa *et al.*, 2001; Giunchetti *et al.*, 2007, 2008; Kumar & Engwerda, 2014; Jain & Jain, 2015; Cantacessi *et al.*, 2015).

No desenvolvimento de uma vacina se faz necessário conhecer o tipo de resposta imune produzida para definição da estratégia vacinal que estimule uma resposta protetora e de longa duração. O contato da superfície celular entre célula apresentadora de antígeno (APC) e linfócitos T desencadeia uma cascata de eventos responsável pela resposta imunológica. Na infecção por parasitos do gênero *Leishmania* ocorre supressão da resposta Th1 que é antimicrobica permitindo o desenvolvimento do parasito. Na resposta do tipo Th1 participam citocinas como IL-12, IFN- γ , IL-2, TNF- α que conferem proteção contra leishmaniose. No entanto, resposta do tipo Th2 com citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, TGF- β contribuem para a persistência e vulnerabilidade à doença. A interação entre esses tipos de resposta estabelece a proliferação e expansão clonal dos linfócitos T e B produzindo uma memória imunológica capaz de controlar a infecção. (Alexander, J. & Bryson, K., 2005; Alvar *et al.*, 2013)

Em estratégias vacinais, observa-se que os adjuvantes são amplamente utilizados. Segundo definição ampla de Raimon em 1924, adjuvantes são “substâncias utilizadas em combinação com antígenos específicos produzindo uma resposta imune mais robusta quando comparada à administração somente do antígeno”. Eles estimulam a captação do

antígeno por APCs induzindo assim a resposta imune (O'Hagan & Valiante, 2003; Jain, & Jain, 2015).

O mecanismo da ativação da resposta imune induzido pelos adjuvantes ainda não está bem esclarecido mas sabe-se que pode atuar em diferentes vias: (1) estimulando a resposta de antígenos, (2) modulando a avidéz de anticorpos, especificidade e distribuição de subclasses, (3) estimulando linfócitos T citotóxicos (CTL), (4) promovendo a indução da imunidade em mucosas (5) promovendo a resposta imune em indivíduos imunologicamente imaturos ou senescentes (6) diminuindo a dose do antígeno nas vacinas reduzindo custos ou (7) auxiliando na superação da competição de antígenos em combinação de vacinas (Singh & O'Hagan, 2003).

Os adjuvantes podem ser classificados de acordo com sua fonte, mecanismo de ação ou propriedades físico-químicas. Baseado no mecanismo de ação, eles podem ser divididos em duas classes: sistemas de liberação de vacinas ou adjuvantes imunoestimulatórios (Rajput *et al*, 2007). Os sistemas de liberação de vacinas geralmente são particulados tendo como principal alvo antígenos associados a células apresentadores de antígenos (APC). Exemplos desses sistemas são micropartículas, emulsões, lipossomas e ISCOMS (complexo imunoestimulante). Adjuvantes imunoestimulatórios são predominantemente derivados de patógenos e algumas vezes associados a padrões moleculares os quais ativam células do sistema imune inato tais como LPS (lipopolissacarídeos bacterianos), MPL (monofosforil lipídeo A), saponinas, dentre outros (Singh & O'Hagan, 2003).

As saponinas são geralmente empregadas em preparações vacinais por apresentarem baixo custo, serem de formulação simples, mostrando-se seguras para utilização. De um modo geral, possuem estrutura com caráter anfifílico, tendo parte da sua estrutura com característica lipofílica (triterpeno ou esteróide) e outra hidrofílica (açúcares). Essa característica determina a propriedade de redução da tensão superficial da água e suas ações detergentes e emulsificante. Dessa forma, pode ser classificada de acordo com seu caráter ácido ou básico. O caráter ácido ocorre pela presença de grupamento carboxila na aglicona ou na cadeia de açúcares. O caráter básico decorre da presença de nitrogênio, em geral, sob forma de uma amina secundária ou terciária, como nos glicosídeos nitrogenados esteroidais. Quanto à parte aglicona, denominam-se como

saponinas esteroidais ou triterpênicas (Cox, J. C., & Coulter, A. R., 1997; Hostettmann, K., & Marston, A., 2005; Rajput, Z. I. *et al.*, 2007).

Na literatura é descrito a utilização de saponina em indústrias cosméticas como na fabricação de batons e xampus, e na indústria alimentícia como flavorizante e agente espumante. Também, são descritas suas propriedades biológicas como fitoterápico, demonstrando ação sobre membranas celulares e utilização como imunomoduladora em estratégias vacinais. Como fitoterápico, apresenta ações expectorante e diurética, sendo que o mecanismo de ação ainda não está bem elucidado. Alguns autores descrevem a ação no trato respiratório provocando aumento do volume do fluido e redução da viscosidade por causar irritação no local. Associada à sua propriedade de reduzir a tensão superficial, a saponina poderia diminuir a viscosidade do muco e facilitar sua expectoração. Além disso, o caráter anfifílico das saponinas facilita sua interação com a membrana celular alterando a permeabilidade ou até mesmo causando destruição sendo capaz de formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolípidos de membranas (Balandrin, M. F., 1996).

Há vários anos, as saponinas são empregadas como adjuvantes em vacinas veterinárias orais e injetáveis. Nas vacinas orais, elas melhoram a eficácia facilitando a absorção intestinal de grandes moléculas (Cheeke, 2000). Estudos indicam que essa ação se dá provavelmente pela interação com o colesterol das membranas dos microvilos causando lesões estruturais e consequente alteração da permeabilidade (Johnson *et al.*, 1986). A ação imunológica envolve a interação da saponina com o colesterol das membranas celulares dos macrófagos ou células apresentadoras de antígenos facilitando a entrada antígeno na célula (Bomford *et al.*, 1992). No entanto, também são relatados inconvenientes graves, como alta toxicidade, efeito hemolítico indesejável e instabilidade na fase aquosa o que limita seu uso como adjuvante na vacinação e impede emprego em vacinas humanas (Sun *et al.*, 2009).

A composição dos imunobiológicos é bem ampla consistindo tradicionalmente de (1) antígenos atenuados ou mortos, (2) toxinas inativadas ou proteínas isoladas ou combinadas, e (3) DNA plasmidial; associados ou não aos adjuvantes. De acordo com essa constituição, as vacinas são classificadas como de primeira, segunda e terceira geração, respectivamente (Foroughi-Parvar, F., & Hatam, G., 2014).

Vacinas contendo formas atenuadas promovem indução da produção de anticorpos. Esses, por sua vez, podem neutralizar toxinas, vírus e inibir a ligação do microrganismo às células e até mesmo promover a fagocitose. Embora ocorra desenvolvimento da resposta imune, ocasionalmente pode haver reversão para forma virulenta ou, ainda causar doença em imunossuprimidos. A utilização de antígenos mortos representa uma alternativa para esses casos. Observa-se que nesse tipo de estratégia, a resposta imune é menor do que nos antígenos atenuados e, algumas vezes, produz baixa imunogenicidade particularmente resposta do tipo Th1 onde há produção de IFN- γ . A preparação vacinal Leishvacine se encontra nessa classificação sendo constituída por cepas de *L. amazonensis* e adjuvante BCG. Esse tipo de vacina oferece alguma proteção contra leishmaniose mas há limitações como resposta imune variável e toxicidade não tolerável. Para contornar essas limitações, várias proteínas do parasito têm sido propostas como alvos para a desenvolvimento de novas preparações vacinais.

Avanços recentes na concepção de vacinas de segunda geração contra a leishmaniose canina demonstraram que a imunização com antígenos parasitários definidos fornece proteção contra o desafio com *L. infantum*. Esta geração inclui frações nativas purificadas a partir dos parasitos com base em abundância e localização na superfície ou antígenos recombinantes criados pela engenharia genética que estimulam o sistema imunológico. Exemplos nessa classe encontra-se a Leishmune® constituída por um complexo glicoproteico purificado de promastigotas de *L. donovani*, denominado FML (*fucose manose ligand*) e saponina como adjuvante. O imunobiológico demonstrou forte imunidade protetora, sendo relatados 95% de proteção e 80% de eficácia (Borja-Cabrera *et al.*, 2002; da Silva, *et al.*, 2000). Várias proteínas secretadas também são alvos para pesquisa pois estão envolvidas na patogênese e possuem grande potencial imunogênico. Estudo realizado por Gour *et al.* (2012), relatou 17 proteínas secretadas por *L. donovani* e as dividiu em 5 grupos com diferentes massas moleculares. As proteínas de baixa massa molecular mostraram alto potencial imunogênico sendo então prováveis candidatas ao desenvolvimento de vacinas de segunda geração.

Com o intuito de aumentar a especificidade e potência da vacinação, o uso de DNA plasmidial ou associação desse com proteína recombinante mais adjuvante tem sido avaliado. Em estudo realizado pelo grupo de Rodríguez-Cortés em 2007., avaliou a

imunização de cães saudáveis através de desafio intradérmico empregando um coquetel constituído por quatro plasmídeos diferentes que codificam para proteínas de *L. infantum*. No coquetel foram utilizados Gp63 (proteína de glicol de superfície principal), LACK (Leishmania C-quinase ativada), KMP-11 (proteína de membrana de kinetoplasto 11), e TRYP (tryparedoxin-peroxidase). Apesar da vacina de DNA de plasmídeo multi-antigênico mostrar-se segura e tolerada pelos 12 cães em teste, a maioria deles apresentou sinais clínicos após 3 a 4 meses de infecção e nível elevado de anticorpos foi encontrado nos nódulos linfáticos, fígado e baço sugerindo efeitos não protetores (Rodríguez-Cortés, A., *et al.*, 2007). Em outra tentativa, empregou-se duas formas de vacina, DNA-LACK (Vírus recombinante da vacina-LACK (rVV-LACK) e Vírus modificado Ankara-LACK (MVA-LACK)) o que desencadeou resposta do tipo Th1 em 8 cães testados. Os animais estudados apresentaram menores sintomas clínicos de LVC. No grupo DNA-LACK / MVA-LACK, o aumento de anticorpos com o vírus não replicativo conferiu melhor proteção. Esta vacina de DNA foi capaz de estabelecer uma proteção associada à ausência dos sintomas de leishmaniose (62,5% do grupo vacinado foram assintomáticos após 290 dias), nível mais baixo de IgG específico para Leishmania (em comparação com o grupo de controle), maiores quantidades de ativação de células T e aumento de síntese de citocinas Th1 (IFN- γ e IL-12) (Rodríguez-Cortés, A., *et al.* 2007; Ramos, I. *et al.*, 2008; Foroughi-Parvar, F., & Hatam, G., 2014).

Sistemas de liberação vacinal têm sido avaliados para vacinas que utilizam proteínas purificadas e DNA apresentando como vantagem a utilização dos imunógenos em escala nanométrica. Esses sistemas incluem estratégias como lipossomas, nanopartículas poliméricas, eletroporação, nanopartículas bioadesivas, etc (Jain & Jain, 2015). Entretanto, os resultados são pouco expressivos, necessitando de tecnologias mais sofisticadas para sua produção (Khamesipour *et al.*, 2006; Giunchetti, 2007).

No Brasil, apenas duas vacinas (Leishmune® e Leish-Tec®) tiveram registro aprovado no MAPA para profilaxia da LVC. Após os estudos de fase III que comprovaram a forte imunidade protetora da Leishmune®, a empresa veterinária Fort Dodge Saúde Animal Ltda, comprou o direito de produção do imunobiológico registrando o produto em 2003, que passou então, a ser comercializado em áreas endêmicas no Brasil (da Silva, *et al.* 2000). Entretanto, em 2005, a secretaria de vigilância em Saúde do

Ministério da Saúde não reconheceu a vacina sob justificativa de que o imunobiológico não possui comprovação de prevenir a infecção do cão e não ser possível diferenciar a infecção natural da vacinação, o que dificultaria as ações de controle da doença pelos órgãos de vigilância e controle da LV (Giunchetti, 2007). Em 2014, o MAPA, através da nota técnica nº 038/2014/DFIP/SDA, suspendeu a licença de fabricação e comercialização devido ao imunobiológico não atender completamente os requisitos para estudos de fase III, referente à avaliação da eficácia vacinal previstos no regulamento técnico aprovado pela Instrução Normativa Interministerial nº 31/ 2007. Atualmente, apenas a vacina Leish-Tec® da empresa Hertape Calier Saúde Animal tem licenciamento para produção e comercialização no Brasil. A vacina possui eficácia clínica comprovada e após a vacinação é possível distinguir animais vacinados dos infectados naturalmente por meio de testes sorológicos convencionais que empregam antígenos de formas promastigotas de *Leishmania*. Essa distinção se deve à capacidade da Leish-Tec® de induzir resposta imune celular e humoral em cães, caracterizada pela indução de níveis elevados de IFN- γ e pela produção de anticorpos específicos contra o antígeno vacinal (Fernandes *et al.*, 2008).

1.4. LBSap: preparação vacinal contra LVC

A preparação vacinal LBSap foi desenvolvida como ferramenta importante na prevenção e controle da leishmaniose visceral canina, com o propósito de contribuir também com a diminuição da infecção humana. Em 2004, Giunchetti conduziu os experimentos do primeiro ensaio clínico vacinal de fase I e II em cães empregando a vacina LBSap composta por promastigotas totais de *L. braziliensis* e saponina como adjuvante vacinal. No estudo, o imunobiológico produziu aumento da frequência de linfócitos T CD8⁺, elevação dos níveis de anticorpos IgG total e subclasses (IgG 1 e IgG 2) anti-leishmania, além do aumento da intensidade de proliferação celular com elevada produção de óxido nítrico *in vitro*. Com base nesses resultados, a LBSap demonstrou forte imunogenicidade, desenvolvendo resposta imune celular e humoral indicando o estabelecimento de mecanismos imunoprotetores potencialmente capazes de atuarem

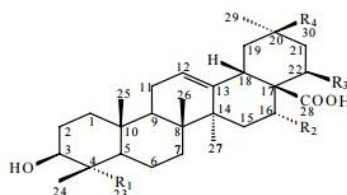
contra a LVC. Além disso, não induziu alterações clínicas ou adversas que contraindicassem seu uso, mostrando-se segura para imunoprofilaxia de cães (Giunchetti *et al.*, 2007).

Com os resultados promissores, em 2006, foi realizado depósito de patente da vacina LBSap no INPE e, a partir de então, outros estudos deram sequência para demonstrar o potencial protetor da LBSap. Em 2010, ensaio clínico vacinal de fase I e II foi realizado em cães empregando a vacina LBSap para demonstrar o potencial protetor em cães após o desafio experimental intradérmico. Os cães imunizados com LBSap apresentam uma variação de biomarcadores imunológicos criando um padrão de memória imunológica favorável a uma vacina protetora através da capacidade na apresentação de antígenos e ativação celular. Além disso, após o estímulo antigênico com antígeno vacinal e antígeno de *L. chagasi* dos cães vacinados apresentaram aumento da atividade linfoproliferativa e aumento da frequência de linfócitos TCD4⁺. Análise clínica revelou que os cães permaneceram assintomáticos durante o período avaliado de 435 dias após desafio intradérmico (Roatt *et al.*, 2010).

Aguiar- Soares (2010) também iniciou ensaio clínico vacinal de fase I e II em cães para avaliação comparativa da toxicidade, imunogenicidade e potência entre a vacina LBSap e as vacinas Leish-Tec®, Leishmune® e KMP-11 contra leishmaniose visceral canina. O estudo mostrou que os protótipos vacinais LBSap e KMP-11 assim como os imunobiológicos Leish-Tec®, Leishmune® foram capazes de estabelecer mecanismos imunoprotetores potencialmente capazes de atuarem contra infecção por *L. infantum*. Com relação à potência e eficácia vacinal, todas as vacinas testadas reduziram a carga parasitária após seis meses do desafio experimental. Quanto à toxicidade, nenhuma delas demonstrou alterações adversas que contraindicassem seu uso, apenas edema e dor no local da aplicação que desapareceram após 72h (Aguiar- Soares, 2010).

O adjuvante saponina que compõe a LBSap tem ação conhecida por estimular respostas celular e humoral e, portanto, potencializar a resposta imunológica (Campbell, J. B., & Peerbaye, Y. A., 1992; Giunchetti *et al.*, 2007). A saponina é obtida da casca da árvore *Quilaja saponaria* Molina possuindo estrutura complexa sendo constituído por uma mistura de mais de 50 saponinas triterpênicas que apresentam variações em sua estrutura (Figura 2). O ácido quiláico é a aglicona presente na maioria das saponinas

encontradas nessa espécie tendo como estrutura básica substituição no carbono 3 com di ou trissacarídeos e no C-28 com oligossacarídeos através de uma fucose. Nessa posição, o oligossacarídeo ainda pode se ligar a um ácido graxo por meio do carbono C-3 ou C-4 da fucose (Fleck, J.D., 2007)



AGLICONAS

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
ÁCIDO QUILAICO	CHO	OH	H	CH ₃
ÁCIDO 22β-HIDRÓXI-QUILAICO	CHO	OH	OH	CH ₃
ÁCIDO EQUINOCÍSTICO	CH ₃	OH	H	CH ₃
ÁCIDO FITOLACAGÊNICO	CH ₂ OH	H	H	COOCH ₃

□ **CADEIAS SACARÍDICAS LIGADAS AO C-3 DA AGLICONA:**

- β-D-galactopiranosil-(1→2)- β-D-glicuronopiranosil
- β-D-galactopiranosil-(1→2)- [α-L-ramnopiranosil-(1→3)]-β-D-glicuronopiranosil
- β-D-galactopiranosil-(1→2)- [β-D-xilopiranosil-(1→3)]-β-D-glicuronopiranosil

□ **CADEIAS SACARÍDICAS LIGADAS AO C-28 DA AGLICONA:**

- β-D-xilopiranosil-(1→4)-[β-D-glicopiranosil-(1→3)]-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-β-D-fucopiranosil
- β-D-apifuranosil-(1→3)-β-D-xilopiranosil-(1→4)-[β-D-glicopiranosil-(1→3)]-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-β-D-fucopiranosil
- β-D-apifuranosil-(1→3)-β-D-xilopiranosil-(1→4)-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-β-D-fucopiranosil

□ **ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES NA CADEIA OLIGOSSACARÍDICA LIGADA AO C-28 DA AGLICONA:**

- ácido (S)-2-metilbutanóico
- ácido (3S, 4S)-3-hidróxi-4-metilexanóico
- ácido 3,5-diidroxi-6-metiloctanóico

Figura 2: Variações estruturais observadas nas saponinas de *Q. saponaria*. (Fleck, J.D., 2007)

Dalsgaard (1978), em estudo para isolamento, caracterização e avaliação da atividade adjuvante da saponina, obteve um extrato enriquecido denominado de Quil-A. Essa mistura heterogênea demonstrou estimular a resposta celular e humoral, além de induzir a diferenciação de anticorpos (Dalsgaard *et al.*, 1977, 1978). Alguns autores sugerem que pela sua ação tensoativa as saponinas *Q. saponaria* poderiam interagir com a membrana das células apresentadoras de antígenos (APC), intercalando com o

colesterol da membrana celular formando poros, e assim, permitindo a entrada do complexo saponina-antígeno para o citoplasma (Glauert, A. M., *et al.*, 1962; Tsunoda, I., *et al.*, 1999). Estudos de relação estrutura atividade apontam que possivelmente o grupo aldeído em C-4 da aglicona forma uma base de Schiff com o amino livre das células apresentadoras de antígeno e assim estimularia a resposta do tipo Th1. Em C-28, o ácido graxo ligado seria o responsável pela toxicidade relatada das saponinas e também desencadearia produção de linfócitos T citotóxicos (Fleck, J.D., 2007).

1.5. Proteômica no controle de qualidade de amostras complexas

O termo Proteoma foi definido e introduzido por Wilkins em 1996 como o estudo de todos os grupos de proteínas codificados por um genoma. Com a disponibilização da informação acerca do sequenciamento dos genomas de vários organismos, a proteômica oferece informações complementares essenciais à genômica e transcricômica contribuindo para o entendimento dos processos bioquímicos. Diferentes técnicas proteômicas são empregadas no entendimento das interações entre as proteínas nos organismos, modo de ação de drogas, descoberta de marcadores de doenças, alvos potenciais para desenvolvimento de vacinas, mecanismos de resistência do parasito e interação parasito-hospedeiro (Cantacessi *et al.*, 2015; De, Jesus *et al.*, 2014)

Além dessas inúmeras aplicações, estudos apontam a necessidade da proteômica no controle de qualidade de diferentes tipos de amostras que apresentam grande complexidade composicional. Padrões de análise desses proteomas consistem na separação, visualização e identificação das proteínas. Rotinas laboratoriais para controle de qualidade empregam métodos de coloração e comparação com padrões mostrando-se muitas vezes ineficientes devido à alta complexidade e os métodos empregados avaliarem principalmente as proteínas de maior abundância (Tani, C. *et al.*, 2014).

Outras abordagens utilizam análises em gel 2D separando as proteínas por seu ponto isoelétrico e massa molecular, contudo com algumas limitações. A técnica mostra-se trabalhosa e demorada, havendo dificuldade de separação de certas proteínas dependendo de características físico químicas que elas apresentam. Geralmente apenas o

proteoma solúvel é avaliado, uma vez que, as proteínas de membrana não são solubilizadas pelos detergentes não iônicos empregados na técnica. Sendo assim, os *spots* que representam apenas parte do proteoma total são visualizados, não detectando as proteínas de baixa abundância (Issaq, H. J., & Veenstra, T. D., 2008; Beranova-Giorgianni, S., 2003).

Associado à separação e visualização, espectrometria de massas é empregada na identificação, caracterização e quantificação das proteínas e suas modificações pós traducionais com alta sensibilidade. Ferramentas modernas da proteômica são utilizadas para caracterização em larga escala de amostras complexas, avaliando a amostra como um todo. Essas abordagens associam Proteômica shotgun (*gel-free*), ferramentas de bioinformática e estatística para realização de análise composicional qualitativa e quantitativa (Tani, *et al.*, 2014; Garrido *et al.*, 2016).

Na área alimentar, uma nova abordagem denominada *Foodomics* aplica uma variedade de ferramentas “ômicas” para melhorar o conhecimento em qualidade dos alimentos através da identificação de marcadores para contaminantes, verificação de origem e autenticação alimentar. Além dos consumidores terem o direito de saber a composição dos alimentos que estão ingerindo, a grande procura por determinados tipos de alimentos tem levado à adulteração desses produtos, substituindo parcial ou totalmente alguns ingredientes por similares de baixo custo e de qualidade inferior. Suplementos nutricionais como *Whey Protein* que possuem grande popularidade e são amplamente utilizados pela população tem sido alvos de adulteração. Estudos detectaram a presença de compostos com alto conteúdo de nitrogênio, mas com baixo valor biológico, os quais mascaram os métodos de quantificação comumente utilizados. A introdução de ingredientes alimentares tais como produtos tóxicos ou alergênicos pode ser nocivo para a saúde do consumidor, representando assim um risco para a saúde pública (Ahmad, Ashfaq, 2011; Garrido *et al.*, 2016; Ortea *et al.*, 2016).

Durante as muitas fases da produção de alimentos, as proteínas podem atuar como indicadores ideais para muitas propriedades associada a qualidade, composição ou origem dos alimentos. Os métodos oficialmente aprovados para as análises empregam ferramentas tradicionais como imunoensaio, separação baseada em gel e focalização

isoeletrica (IEF). Abordagens mais sensíveis como espectrometria de massas e outras mais genéricas estão sendo avaliadas como ferramentas para serem executadas em conjunto para autenticação de vários grupos alimentares como leite, carne, peixes, vinhos, mel, gelatinas e muitos outros (Ortea, *et al.*, 2016).

Produtos lácteos como queijo à base de leite de cabra apresentam adulteração com pequenas porcentagens de leite de vaca para torná-lo mais barato sendo este um grande problema para indústria de alimentos. Os métodos de referência para determinação dessas adulterações baseiam-se na avaliação qualitativa pela detecção das bandas de caseína γ_2 e γ_3 presentes no leite de vaca através da IEF e coloração por *coomassie blue*. Em amostras que apresentam menos de 5% de leite de vaca, a técnica não é sensível. Outro problema relacionado é uma inadequada separação eletroforética das γ caseínas o que leva a uma identificação falso positiva. Técnicas como MALDI-TOF ou ESI-MS têm sido extensivamente utilizadas para detecção dessas fraudes na indústria de laticínios (Cozzolino *et al.*, 2001).

Resetar *et al* (2016) propôs método para diferenciação de 5 vinhos brancos croatas empregando espectrometria de massas por MALDI TOF em combinação com análise estatística. MALDI é uma técnica *soft* de ionização que permite a detecção sensível de moléculas de alta massa molecular, não voláteis e termolábeis por espectrometria de massas. A origem geográfica dos vinhos é um dos maiores parâmetros de qualidade pois adiciona valor ao produto e fornece melhores oportunidades de marketing aos produtores. Além da grande exigência em qualidade por parte dos consumidores e devido a fraudes relatadas, a produção de vinhos está sujeita a diretrizes e leis que definem as regras sobre suas descrições.

Gutiérrez *et al* (2009) desenvolveram o que chamaram de *antivenomic* obtido de uma mistura de proteínas de venenos identificadas por técnicas proteômicas e empregadas na imunização contra picada de serpentes. Segundo o grupo, existe uma variação ontogenética, interespecies e geográfica que ocasiona uma grande variabilidade na composição desses venenos podendo estar relacionado com os diferentes sintomas clínicos observados em vítimas humanas envenenadas por uma mesma espécie de

serpente em diferentes regiões geográficas. Devido a isso, aspectos importantes estão relacionados com a produção e a qualidade composicional desses venenos para imunização. Os *antivenomics* necessitam de uma grande representatividade sendo obtidos a partir de um *pool* de venenos colecionados de centenas de serpentes provenientes de uma ampla área geográfica. Quanto à qualidade, o antídoto apresentaria proteínas mais específicas para as toxinas causadoras do envenenamento uma vez que os métodos tradicionais de imunização apresentam proteínas tóxicas de baixa massa molecular que desencadeiam uma fraca resposta imune. Além disso, a presença de proteinases pode levar a degradação e desnaturação das proteínas no momento do armazenamento uma vez que a coleção é descongelada, homogeneizada e liofilizada rapidamente. Portanto, na produção do pool de venenos é preciso um protocolo efetivo quanto à coleta, preparação e estocagem sendo necessário a realização de controle de qualidade adequado. O grupo coloca a necessidade de realização de testes farmacológicos de dose letal mediana e testes bioquímicos envolvendo padrões cromatográficos, gel 2D, SDS-PAGE e técnicas proteômicas que garantam a efetividade desses antídotos (Gutiérrez *et al.*, 2009).

A vacina Bexsero® produzida pela Novartis para imunoprofilaxia da meningite, utiliza a análise por SDS PAGE e coloração das bandas de proteínas com *coomassie blue* para realizar o controle de qualidade da vacina. Tani *et al* (2014) propôs uma análise *shotgun* dessa vacina através da metodologia *label free* Hi3 LC-MS para caracterização molecular das vesículas de membrana externa extraídas com detergente (DOMVs) que são os constituintes antigênicos dessa vacina. Além de melhor caracterizar a composição dos lotes produzidos das DOMVs, o grupo conseguiu padronizar, por meio de ferramentas proteômicas, o meio fermentativo para obtenção das cepas de *Neisseria meningitidis* utilizadas no imunobiológico em escala industrial. O método empregado mostrou-se robusto, capaz de avaliar a composição total da vacina e a reprodutibilidade da sua produção na indústria (Tani *et al*, 2014).

Neste contexto, o trabalho desenvolvido propôs uma metodologia capaz de avaliar a composição da preparação vacinal LBSap produzida em escala industrial pela Indústria Ouro Fino e submetida a diferentes tratamentos como variação da formulação, filtração terminal do produto e temperatura de armazenamento, a fim de avaliar se essas variáveis

alteram a composição dessas preparações. Proteômica *shotgun* foi ferramenta de escolha para as análises em larga escala e dados de quantificação *label-free* permitiram definir um grupo de proteínas que poderiam vir a servir como marcadores potenciais para o controle de composição proteica da formulação LBSap.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a partir do emprego de métodos proteômicos a composição da vacina LBSap formulada em diferentes condições de produção.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1- Avaliar a capacidade extrativa de saponina (*Quilaja saponaria*) sobre o antígeno particulado de *Leishmania braziliensis*;

2.2.2- Determinar a composição molecular do antígeno particulado de *Leishmania braziliensis* a partir do emprego de análise proteômica em larga escala;

2.2.3- Detectar possíveis alterações na composição de LBSap quando submetida à diferentes temperaturas de armazenamento e filtração terminal do produto.

2.2.4- Avaliar o perfil de imunoreatividade por Western blotting das diferentes preparações em estudo frente ao soro de cães vacinados com LBSap;

3. METODOLOGIA

3.1. Formulação das preparações vacinais

O imunobiológico LBSap é elaborado a partir da cultura da cepa padrão de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) sendo mantida pelo criobanco do Laboratório de Imunopatologia (LIMP), do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas (NUPEB) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Segundo protocolo desenvolvido no LIMP as cepas são cultivadas em meio de cultura ágar sangue, Nicolle-Novy-Neal (NNN), associado ao *Liver Infusion Tryptose* (LIT) e armazenadas em estufa biológica refrigerada à temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ sendo homogeneizadas diariamente. Para a obtenção do antígeno vacinal faz-se um inóculo da cultura de promastigotas em fase de crescimento logarítmico em meio de cultura NNN/LIT sob condições estéreis e acondicionadas em temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 7 dias. Em seguida, três repiques da cultura são realizados, sempre avaliando a viabilidade e ausência de agentes contaminantes, a fim de obter a cultura de promastigotas na concentração de 10^7 a 10^8 promastigotas/mL. O meio de cultura é então substituído por LIT, para minimizar a contaminação da cultura vacinal por hemácias e mantido sob as mesmas condições descritas por mais 10 dias. Ao final desse período, obtém-se a cultura de promastigotas predominantemente metacíclicas (conforme protocolo pré-estabelecido no LIMP para curva de crescimento dessa espécie e cepa) contendo aproximadamente 10^8 promastigotas/mL. Em capela de fluxo laminar, a cultura é transferida para tubos estéreis de polipropileno (Falcon) e centrifugada a $900 \times g$ durante 15 minutos a 4°C . O sedimento de promastigotas é então ressuspensionado em solução salina estéril (NaCl a 0,85%), centrifugado para lavagem e remoção total do meio de cultura. Em seguida, a massa de promastigotas é congelada e mantida a -80°C até o momento do uso. Para o processo de rompimento, são adicionados um volume de PBS 1x suficiente para ressuspender a massa de promastigotas. O rompimento é realizado em ultra-som por 1 minuto a 40Watts em banho de gelo e, em seguida, o antígeno vacinal é alíquotado e congelado a -70°C (Giunchetti, 2007).

A cepa padrão e alíquotas do antígeno vacinal produzidos no LIMP foram fornecidos à Indústria Ouro Fino para formulação de algumas preparações vacinais as quais compreenderam dois lotes: 1/14 e 1/15. O lote 1/14 consistiu em cepas cultivadas e rompidas por sonicação no ano de 2013 pelo LIMP, sendo formuladas pela Ouro Fino no ano de 2014. O antígeno foi então formulado juntamente com saponina e timerosal. Em seguida, essa preparação foi dividida em duas partes. A primeira foi armazenada a 4°C e identificada como LBSap L1/14 4°C e, a outra, filtrada em membrana de celulose regenerada de 0,2µm da marca Sartorius e armazenado a 37°C recebendo a identificação LBSap L1/14 37°C Sart. Essa filtração teve por objetivo garantir a esterilização do produto. O segundo lote foi produzido em 2015 com a cepa padrão cultivada no ano de 2014 em fermentador industrial. As promastigotas foram ressuspendidas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e EDTA 10mM, rompidas por HAP (homogeneizador em alta pressão) e dividida em duas partes. A primeira foi formulada sem saponina, filtrada em membrana de celulose (Sartorius), armazenada a 4°C e identificada como AgLB L1/15 4°C Sart. A segunda parte foi apenas armazenada a 4°C, sem adição de saponina e recebeu a identificação AgLB 3/15 4°C.

Em 2015, novas alíquotas do antígeno vacinal foram preparadas pelo LIMP e fornecida ao Laboratório de Enzimologia e Proteômica (LEP) da UFOP para início do estudo em questão. A massa seca de promastigotas pré-congeladas foi ressuspendida em cerca de 5mL de PBS 1x e homogeneizada no LGC Vórtex Mixer. Em seguida, as promastigotas foram rompidas por sonicação utilizando processador ultrassônico SONICS Vibra-Cell™ modelo VCX 130 (BIOVERA). Após a sonicação, foram realizados dois controles de rompimento das promastigotas. Confeccionou-se algumas lâminas para observação do rompimento em microscópio óptico e incubou-se parte da amostra em meio de cultura NNN/LIT por 15 dias, a fim de garantir a ausência de promastigotas íntegras. O antígeno vacinal foi alíquotado em microtubos e congelado a -20°C recebendo a identificação Lisado LB. No total foram obtidas 5 preparações vacinais as quais estão resumidas na tabela 1.

Tabela 1: Descrição das preparações vacinais.

Identificação das amostras	Origem	Lote	Cultivo	Saponina	Filtração	Temp (°C)
1 LISADO LB	UFOP	2015	UFOP 2015	NÃO	NÃO	4°C
2 LBSAP L1/14 37°C SART	OF	1/14	UFOP 2013	SIM	SIM	37°C
3 LBSAP L1/14 4°C	OF	1/14	UFOP 2013	SIM	NÃO	4°C
4 AgLB L1/15 4°C SART	OF	1/15	FERMENTADOR OF 2014	NÃO	SIM	4°C
5 AgLB L3/15 4°C	OF	1/15	FERMENTADOR OF 2014	NÃO	NÃO	4°C

3.2. Avaliação da capacidade extrativa de saponina (*Quilaja saponaria*) sobre o antígeno particulado de *Leishmania braziliensis*.

3.2.1 – Obtenção dos extratos solúvel e de membrana para avaliação da atividade da saponina

Uma alíquota de 300 µL do Lisado LB descrito em 3.1 foi descongelada lentamente em banho de gelo e homogeneizada em vórtex. O homogenato foi centrifugado a 20.000 g por 30 minutos a 4°C (Centrifuga Mikro 200R, Hettich). O sobrenadante contendo as proteínas solúveis foi armazenado a -20°C para posterior análise em gel de poliacrilamida. O sedimento foi lavado uma vez com PBS 1x pH 7,5 e, em seguida, centrifugado a 20.000 g por mais 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o procedimento de lavagem repetido novamente. O sedimento resultante, contendo as proteínas de membrana, foi ressuscitado em 200 µL de PBS 1x e dividido em duas partes: à primeira parte foram acrescentados mais 100 µL de PBS 1x e, à outra parte, foi adicionado 100 µL de solução de saponina a 2 mg/mL (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) obtendo-se ao final dessa mistura uma concentração de saponina semelhante

à preparação vacinal administrada ao cão no momento da imunização (saponina a 1mg/mL). As amostras foram agitadas lentamente em homogeneizador ARSEC modelo OSC1 por 3 horas. Logo após, as amostras com e sem saponina foram centrifugadas a 20.000 g por 30 min a 4°C. Conforme esquematizado na figura 3, ao final desse procedimento foram obtidas cinco frações: extrato solúvel contendo as proteínas solúveis do Lisado LB (1A) e quatro frações contendo as proteínas de membrana (5A, 5B, 5C, 5D).

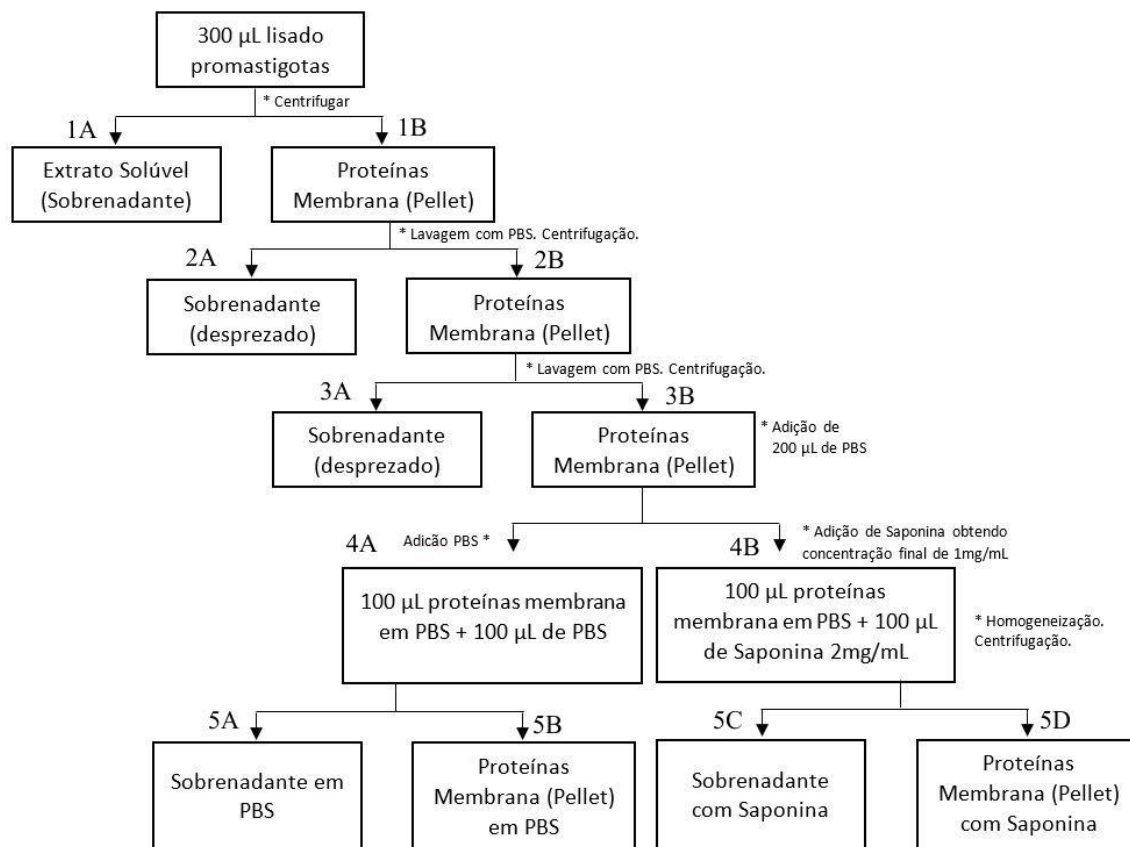


Figura 3: Esquema da obtenção das proteínas de membrana para avaliação da capacidade extrativa da saponina.

3.2.2- Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida

Para análise da capacidade extrativa da saponina, o extrato total do Lisado LB, extrato solúvel e as frações contendo proteínas de membrana obtidas no item 3.2.1, foram analisados por eletroforese unidimensional SDS PAGE 1D. Foram confeccionados géis

de 7 cm em sistema de eletroforese vertical (GE Healthcare®). O gel de concentração foi preparado a 5% de poliacrilamida sendo composto por solução de acrilamida:bisacrilamida (29:1), tampão Tris-HCl 0,125M pH 6,8, SDS a 0,1%, Temed e persulfato de amônio a 10%. Para o gel de separação, a concentração de poliacrilamida foi de 12%, utilizando os mesmos reagentes do gel de concentração, diferindo apenas na concentração do tampão Tris-HCl que foi de 0,375M pH 8,8.

Foram pipetados 12,5 µL das 4 frações de *pellet* e sobrenadante, com e sem saponina conforme mostrado na figura 3. A cada uma dessas amostras foram adicionados tampão de amostra contendo Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8, dodecil sulfato de sódio (SDS) a 2%, glicerol a 10%, ditioneitol (DTT) a 0,1% e de azul de bromofenol a 0,002% na proporção de 1:1. As amostras foram fervidas por 5 minutos para garantir total desnaturação das proteínas e, em seguida aplicadas nos géis para início da corrida eletroforética. O padrão de massa molecular *Molecular Weight Marker Kit* (Sigma Aldrich) foi utilizado para identificação da massa molecular relativa das proteínas após separação das bandas. Para eletroforese utilizou-se tampão de corrida (Tris-HCl 0,025M pH 8,3, glicina 0,192 M e SDS 0,1%) sob corrente constante de 20 mA por gel. Ao final da corrida, os géis resultantes foram corados pelo método do Coomassie Coloidal G-250 e, para as amostras que não reagiram a esse corante, empregou-se o método do nitrato de prata descritos nos itens 3.2.3 e 3.2.4.

3.2.3 – Coloração por coomassie coloidal

Ao final da eletroforese, os géis foram corados por coomassie coloidal G-250 (Sigma). Para tanto, os géis foram transferidos para solução fixadora contendo etanol a 30% (v/v) e ácido ortofosfórico a 2% (v/v) sob agitação em duas etapas de 30 minutos. Em seguida, os géis foram hidratados em solução de ácido ortofosfórico a 2% (v/v) em três etapas de 10 minutos cada. Após hidratação, os géis foram sensibilizados com solução de sulfato amônio a 15% (p/v), etanol a 18% (v/v) e ácido ortofosfórico a 2% (v/v) em duas etapas de 30 minutos. Por fim, adicionou-se a solução sensibilizadora *coomassie brilliant blue G-250* a 0,02% a qual permaneceu em contato com gel por 24 horas para

incorporação do corante. Após este tempo, os géis foram lavados com solução de etanol a 20% por cerca de 10 minutos para remoção do excesso de corante. Por fim, os géis foram hidratados em água destilada e digitalizados no ImageScanner III (GE Healthcare).

3.2.4 – Coloração por nitrato de prata

Os géis do item 3.2.3 que não apresentaram coloração frente ao emprego do coomassie coloidal G-250 foram corados com método mais sensível, o nitrato de prata. Os géis foram submetidos a total descoloração e fixação com solução descorante (metanol a 40% e de ácido acético glacial a 7%). Após fixação, os géis foram agitados por 30 minutos em solução de sensibilização contendo etanol a 30%, acetato de sódio a 6,8% e de tiosulfato de sódio a 0,2%. Os géis foram lavados em água ultrapura e agitados em solução de nitrato de prata a 0,25% por 20 minutos ao abrigo da luz. Lavou-se novamente os géis em água ultrapura para retirar o excesso de prata. Na revelação dos géis foi utilizada solução de carbonato de sódio a 2,5% e formaldeído a 5% até alcançar a intensidade adequada para visualização das bandas. A reação foi interrompida lavando-se o gel 5x com solução de descorante citada anteriormente.

3.3. Quantificação e análise eletroforética das preparações vacinais.

3.3.1- Avaliação de possíveis contaminantes na Saponina (S7900 – Sigma)

Para avaliação da presença de proteínas como contaminantes da saponina (S7900 – Sigma), a amostra foi submetida à precipitação de proteína com ácido trifluoroacético (TCA) conforme descrito a seguir. A uma solução de saponina na concentração de 5mg/mL foram adicionados acetona gelada e TCA 100% obedecendo a proporção 1:8:1, respectivamente. A solução foi armazenada em freezer a -20°C *overnight* e, após este tempo, foi centrifugada à 20.000 g, 4°C por 45 minutos (Centrifuga Mikro 200R, Hettich). O *pellet* foi analisado em gel SDS PAGE 1D a 12% conforme protocolo descrito

em 3.2.2. Nesse mesmo gel, outras soluções de saponina foram aplicadas em diferentes concentrações contendo o equivalente a 10, 20, 50 e 100 µg de saponina. O gel resultante foi corado pelo método da prata conforme procedimento descrito em 3.2.4.

3.3.2 - Quantificação de proteínas

A concentração protéica das cinco preparações vacinais foi avaliada pelo método do ácido bicinconínico (*BCA Protein Assay Kit*) conforme descrito pelo fabricante (Thermo Scientific®). O reagente de trabalho foi preparado misturando-se 1 parte do reagente B a 50 partes do reagente A. Para elaboração da curva padrão foi utilizado a solução estoque de albumina bovina (BSA) na concentração de 2mg/mL a qual foi diluída para concentrações que variaram de 0,025 a 1,5 mg/mL. Para dosagem das proteínas totais, as amostras foram homogeneizadas em vórtex antes de cada pipetagem devido as preparações serem altamente particuladas. Em uma microplaca, misturou-se 25 µL de amostra e 200 µL de reagente de trabalho recém preparado. A microplaca foi incubada por 30 minutos a 37°C e, em seguida, realizada leitura da absorbância a 562 nm no SpectraMax® 340PC 384. A concentração das amostras foi obtida através da curva padrão BSA empregando o equipamento Soft Max Pro 6.3 conectado ao SpectraMax® 340PC 384.

3.3.3 - Eletroforese unidimensional das preparações vacinais

O perfil eletroforético unidimensional das cinco preparações vacinais foi avaliado conforme descrito em 3.2.2. Tomando por base a dosagem de proteínas foram aplicados 5µg de proteínas de cada amostra nas canaletas do gel. Ao final da corrida, o gel resultante foi submetido ao procedimento de coloração por coomassie coloidal descrito no subitem 3.2.3. As preparações que continham saponina na formulação tiveram a dosagem de proteínas corrigida por densitometria utilizando o programa Quantity One.

3.4. Avaliação da interferência da saponina nos métodos de quantificação de proteínas por BCA, Lowry e Bradford.

Além do método do BCA empregado na rotina do laboratório para dosagem de proteínas, outras duas metodologias também foram avaliadas, Bradford e Lowry. Para técnica de Bradford empregou-se kit da Thermo Scientific seguindo procedimento informado pelo fabricante. O método de Lowry baseou-se no procedimento descrito por Hudson, L e Hay, F.C (1989). Padrão de albumina bovina (BSA) foi utilizado para construção da curva padrão obtendo-se 8 pontos de diluição conforme instruções do fabricante. As amostras foram preparadas conforme protocolo para imunoprofilaxia dos cães, obtendo-se um total de 8 amostras. As primeiras 5 amostras continham o equivalente a 600µg do lisado de promastigotas de *L. braziliensis* e variavam na concentração de saponina (1, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,0625 mg/mL). A sexta amostra continha apenas 600µg do lisado e, a sétima e oitava, apenas solução de saponina nas concentrações de 1,0 e 0,5 mg/mL, respectivamente. Todas as dosagens foram realizadas em triplicata e a absorbância medida em leitor de microplaca SpectraMax® 340PC 384 nos comprimentos de onda indicados para cada método.

3.5. Análise composicional do antígeno particulado de *Leishmania braziliensis* e das preparações vacinais submetidos a diferentes tratamentos.

3.5.1 Digestão em gel

As cinco preparações vacinais foram submetidas à digestão enzimática em gel. De acordo com a dosagem de proteínas e a correção da concentração por densitometria (item 3.3.2), aplicou-se o equivalente a 20 µg de proteínas de cada amostra no gel de poliacrilamida/bis-acrilamida preparado como descrito em 3.2.2, alterando apenas a concentração de poliacrilamida nos géis de concentração e separação e concentração que foram 5% e 10%, respectivamente. A corrida eletroforética foi interrompida assim que as

proteínas penetraram no gel de separação sendo a migração controlada por meio da visualização do padrão de bandas Collor Burst™ (Sigma). Em seguida, o gel foi fixado em solução descorante contendo etanol a 40%, ácido acético glacial a 7% em água ultrapura sob suave agitação durante 30 minutos. Em seguida, foi realizada coloração com solução de *coomassie blue R-250* (*coomassie blue R-250* a 0,025%, metanol a 40% e ácido acético a 7%) deixando-o sob agitação por 2 horas. As bandas foram excisadas e acondicionadas em microtubos. Para descoloração total das bandas foi utilizada solução descorante (ácido acético a 7% e metanol a 40%).

Após remoção total do corante, iniciou-se o procedimento de digestão em gel. As bandas foram lavadas 2 vezes com 1mL de água ultrapura a fim de remover totalmente o descorante. Foram adicionados a cada microtubo, 500 µL de DTT a 50 mM incubando-os a 65°C por 30 minutos para que ocorresse a redução dos resíduos de cisteína. O excesso de DTT foi removido e adicionados 300 µL de iodoacetamida a 100 mM que foram deixados ao abrigo da luz por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, a iodoacetamida foi removida e as bandas foram lavadas 3 vezes por 20 minutos com 500 µL de solução de NH₄HCO₃ a 20 mM e 50% de acetonitrila, removendo-se o excesso no final. As bandas foram secas em SpeedVac®. Para início da digestão, foram adicionados 15 µL de solução de tripsina contendo 5 µL de tripsina (Promega®), 7,5 µL de NH₄HCO₃ a 40 mM e 2,5 mL de água ultrapura. Essa etapa ocorreu à temperatura ambiente e após 20 minutos retirou-se o excesso de tripsina não absorvida pelo gel. As bandas excisadas foram cobertas com NH₄HCO₃ a 20 mM e incubadas por 24 horas a 37°C. Após esse tempo, o sobrenadante contendo peptídeos foi recuperado, transferido para novos microtubos e mantidos em geladeira. Aos fragmentos do gel, foram adicionados 50 µL de solução contendo ácido trifluoroacético a 0,1% e acetonitrila a 50%. Para extrair os peptídeos do interior do gel, as bandas permaneceram em contato com essa solução por 30 minutos à temperatura ambiente. Juntou-se o sobrenadante obtido ao primeiro e, em seguida, as soluções de peptídeos foram secas no SpeedVac®. As amostras foram mantidas em geladeira para posterior análise por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC MS/MS).

Antes de se iniciar a identificação dos peptídeos trípticos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC MS/MS) foi realizada

purificação dos peptídeos. Os peptídeos foram reconstituídos em 200 μ L de solução de ácido fórmico a 0,1% (v/v) e submetidos a cromatografia de afinidade. A cromatografia consistiu em aplicar as amostras em cartuchos de extração em fase sólida C-18 (Phenomenex) previamente regenerados com 1 mL de acetonitrila a 80% por duas vezes e condicionados com 1 mL solução de ácido fórmico a 0,1% (v/v) por três vezes. Antes do início da extração, os cartuchos foram lavados três vezes com 1 mL de solução de acetonitrila a 80%. Para eluição dos peptídeos, aplicou-se 250 μ L do eluente constituído de 50% de acetonitrila e 0,1% de ácido fórmico (v/v) por três vezes. O eluato foi coletado em microtubos novos e, posteriormente, secos em SpeedVac®.

3.5.2 - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

Os peptídeos trípticos purificados foram ressuspensos em ácido trifluoroacético 0,1% (TFA, Fluka®) e transferidos para *vial* com *insert* de 150 μ L. Logo após, o volume correspondente a 1.5 μ g de peptídeos foram injetados no sistema nanoUHPLC UltiMate® 3000 (Dionex®) equipado com coluna Nano-Trap Acclaim PepMap100 C18 (100 μ m i.d. \times 2 cm, 5 μ m, 100 Å; Thermo Scientific®) e coluna capilar Acclaim PepMap100 C18 RSLC (75 μ m i.d. \times 15 cm, 2 μ m, 100 Å; Thermo Scientific®). Ao início da injeção, utilizou-se fase móvel composta de acetonitrila (ACN) 2% com TFA 0,05%. Os peptídeos foram retidos na coluna guarda e, após 2 minutos, foram eluídos a uma vazão de 3 μ L/min. Uma vez eluídos, esses peptídeos foram separados por cromatografia em coluna C18 utilizando como fase móvel (A) ácido fórmico a 0,1% e, (B) ACN a 80%, ácido fórmico a 0,1% sob modo gradiente de 4 a 55% de B. A vazão foi de 0,300 μ L/min à 40°C por 40 min. O sistema nanoUHPLC está acoplado ao instrumento Q-Exactive (Thermo Scientific®, Bremen, Alemanha) por meio da fonte Nanospray Flex Ion (Thermo Scientific), para a análise por espectrometria de massas dos peptídeos eluídos. Esta fonte, equipada com *emitter* de aço-inoxidável nano-bore (150 μ m o.d. \times 30 μ m i.d., Proxeon, Thermo Scientific®), operou sob voltagem de 2,7 kV, no modo positivo e temperatura do capilar de 250°C. Realizou-se varredura no modo *scan* na faixa de 300-2.000 m/z à uma resolução de 70.000 com tempo máximo de injeção de 100 ms e acúmulo de íons no valor

de 3×10^6 . Neste equipamento a fragmentação dos íons ocorre na cela de *higher-energy collisional dissociation* (HCD) e, neste método selecionou-se os 12 íons mais intensos monitorados, com carga ≥ 2 e ≤ 5 , os quais foram isolados em uma faixa de 2 m/z antes de serem fragmentados, com energia de colisão normalizada em 30 V. A aquisição dos espectros MS/MS foi realizada com resolução de 17.500, tempo máximo de injeção de 150 ms e acúmulo de íons no valor de 5×10^5 íons. O tempo de exclusão utilizado foi de 40 milisegundos. Para cada amostra foram realizadas duplicatas técnicas.

3.5.3 – Análise dos dados

Os espectros de massas obtidos foram submetidos a análise pelos *softwares* Raw Meat e PEAKS Studio (versão 8.0). Os arquivos .raw foram carregados no programa Raw Meat o qual forneceu cromatogramas que demonstraram a performance das corridas e análise da distribuição de íons em cada amostra dando uma rápida análise da qualidade dos dados. Nas análises pelo software Peaks, os arquivos .raw foram filtrados em qualidade dos espectros de 0.65 e para realizar o sequenciamento *de novo*, utilizou-se os parâmetros padrões do software. Em seguida, o programa compara as sequencias do *de novo* com o banco da espécie em estudo fornecendo o nodo “DB search”. Ao final da análise, o PEAKS forneceu a identificação dos peptídeos e proteínas e a quantificação *label free* para a qual utilizou-se de até três peptídeos trípticos mais intensos. Além disso, o software forneceu a correlação de Pearson entre amostras e réplicas técnicas a fim de avaliar a semelhança e reprodutibilidade.

O banco de dados de *Leishmania braziliensis* cepa 2903 serviu como ferramenta de busca estando disponível na homepage do TrytripDB (<http://tritrypdb.org>) tendo 9.269 sequências e 5.004.642 resíduos. Os parâmetros de busca do nodo DB search para identificação dos peptídeos /proteínas no banco foram: (i) enzima: tripsina; (ii) número máximo de perda de sítios de clivagem = 2; (iii) modificações fixas: carbamidometilação; (iv) modificações variáveis: oxidação de metionina; (v) tolerância de massa de íons parentais: 10 ppm, (vi) tolerância de massa de íons fragmentados (MS/MS): 0,1 Da.

A quantificação por *label free* utiliza a média da área sob a curva dos picos cromatográficos de até 3 peptídeos únicos mais intensos de cada proteína. Para tal, os parâmetros de quantificação dos peptídeos foram: (i) tolerância de erro: 10.0 ppm; (ii) tolerância tempo de retenção: 3.0 minutos; (iii) False Discovery rate (FDR): 1%. A partir dos resultados da quantificação foi possível a comparação das diferentes formulações e, também, avaliação da reprodutibilidade das duplicatas técnicas através da correlação de Pearson. Das proteínas identificadas apenas as que apresentaram $\text{fold} \geq 1,5$, qualidade ≥ 1 , significância $\leq 0,01$ foram utilizadas para interpretação dos resultados. A análise estatística empregada pelo software foi Peaks Q que corresponde ao teste estatístico A/B.

3.6. Avaliação do perfil de imunoreatividade por *Western blotting* das diferentes preparações vacinais em estudo frente ao soro de cães vacinados com LBSap

Para avaliar o perfil de imunoreatividade, as cinco preparações vacinais em estudo foram analisadas por *Western blotting*. Primeiramente, confeccionou-se dois géis unidimensionais, servindo um para transferência das proteínas para membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) e outro para coloração como gel réplica. Os géis foram preparados conforme procedimento descrito no item 3.2.2, no entanto, apresentando 4% e 12% de poliacrilamida nos géis de concentração e separação, respectivamente. De acordo com a dosagem total de proteínas e correção por densitometria descrito nos itens 3.3.2, o equivalente a 2,5 μg de proteínas de cada amostra foram aplicadas nos géis e submetidas à eletroforese unidimensional (SDS PAGE 1D) ao mesmo tempo. Cerca de 4 μL do padrão pré corado Collor BurstTM (Sigma) foram aplicados para avaliar a eficiência da transferência das proteínas presentes no gel para membrana de PVDF.

Após corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF utilizando sistema mini VE (GE Healthcare[®]) e tampão de transferência contendo Tris-HCl a 25mM, glicina a 192mM, etanol a 20% e SDS a 10%. A transferência se deu a 200 mA durante 90 minutos em banho de gelo. Ao término da eletrotransferência, colocou-se a membrana de PVDF em contato com tampão de bloqueio contendo 5% de

leite em pó desnatado, 50 mM de Tris-HCl pH 7.5 e 0,3% de Tween 20, sob agitação durante toda a noite.

A membrana foi submetida a 3 lavagens de 5 minutos com solução de Tris-HCl a 10mM pH 7,5. Em seguida, adicionou-se tampão de *immunoblotting* constituído pelo tampão TBST (Tris-HCl a 50 mM pH 7,5, NaCl a 150 mM, Tween 20 a 0,05%) e leite em pó desnatado a 5% (p:v), sob agitação por 20 minutos. Após este tempo, adicionou-se o anticorpo primário na diluição 1:500 constituído por pool de soros de 7 cães obtidos 15 dias após a terceira imunização (T3) com LBSap fornecidos pelo Laboratório de Imunopatologia (LIMP). A incubação se deu por 3 horas sob agitação à temperatura ambiente. O anticorpo primário não ligado foi removido por meio de 3 lavagens de 5 minutos com solução Tris-HCl a 10mM pH 7,5. Logo após, colocou-se o tampão de *immunoblotting* em contato com a membrana por 20 minutos sob agitação e, em seguida, adicionou-se o anticorpo secundário, anti-IgG de cão (Sigma) conjugado à enzima fosfatase alcalina na diluição de 1:2000. A ligação do anticorpo secundário ocorreu durante 90 minutos à temperatura ambiente. Após remoção do anticorpo secundário não ligado, por meio de lavagens com solução de Tris-HCl a 10mM pH 7,5, as membranas foram reveladas com substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolifosfato/4-nitro azul de tetrazólio – BCIP/NBT (Sigma Aldrich®) em solução reveladora (Tris-HCl 50 mM pH 9,0, NaCl 150 mM e MgCl₂ 1 mM) na proporção 1:2, sob abrigo da luz. A reação foi interrompida após lavagem da membrana com excesso de água destilada. As membranas foram deixadas sobre papel de filtro à temperatura ambiente até secagem completa.

O procedimento descrito acima, também foi realizado utilizando pool de soro (pré-imune) dos mesmos 7 cães antes de iniciarem o protocolo de imunização com LBSap (T0), servindo como controle negativo do experimento.

4. RESULTADOS

4.1. Capacidade extrativa de saponina (*Quilaja saponaria*) sobre o antígeno particulado de *Leishmania braziliensis*.

A eletroforese unidimensional das frações obtidas conforme descrito em 3.2 permitiu avaliar o efeito extrativo da saponina sobre as proteínas de membrana do Lisado LB. O gel da figura 4 representa o perfil de bandas das amostras na presença e ausência de saponina obtidas conforme esquema representado na figura 3. Ao se comparar as canaletas contendo o sobrenadante dessas amostras (frações 5A e 5C), observa-se que a amostra não tratada com saponina (5A) possui um perfil com quantidade e intensidade de bandas menores quando comparado com a amostra submetida à ação da saponina (5C) (diferenças apontadas pelas setas vermelhas na figura 4). Além disso, comparando-se dentro da mesma fração, observam-se diferenças marcantes de composição entre o perfil do sobrenadante (5C) e *pellet* (5D) da amostra tratada com saponina.

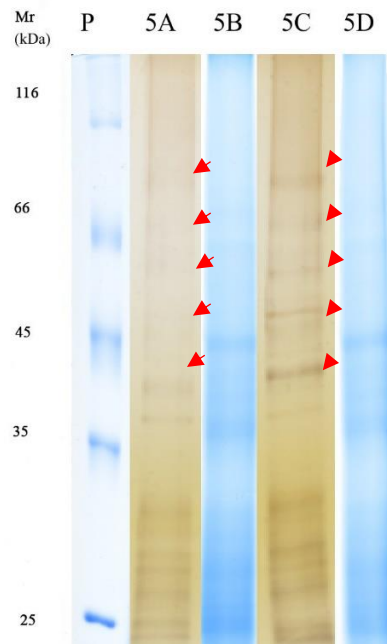


Figura 4: Capacidade extrativa da saponina sobre proteínas de membrana.

Gel de poliacrilamida representativo das frações solúveis contendo as proteínas de membrana submetidas à ação da saponina e sem saponina. Setas vermelhas indicam a diferença no perfil de bandas quando sobrenadante é tratado com saponina. (P: Padrão; 5A: sobrenadante em PBS; 5B:

pellet em PBS; 5C: sobrenadante com saponina; 5D: *pellet* com saponina, notação conforme figura 3). Coloração por *coomassie brilhante blue* e nitrato de prata.

4.2. Avaliação da presença de proteínas como contaminante na saponina S7900 (Sigma)

Antes de realizar a quantificação protéica das preparações vacinais, avaliou-se inicialmente a presença de proteínas como contaminante da preparação vacinal em estudo. O gel resultante da coloração pelo nitrato de prata obtido conforme descrito no item 3.3.1 está representado na figura 5. Duas bandas de baixa intensidade foram observadas na altura do padrão de massa molecular equivalente a 66 kDa. Além disso, foi observado entre 20 e 30 kDa um perfil eletroforético altamente difuso e de baixa intensidade. Esse resultado revelou que esta preparação comercial de saponina não contém quantidades significativas de proteínas vegetais em sua composição.

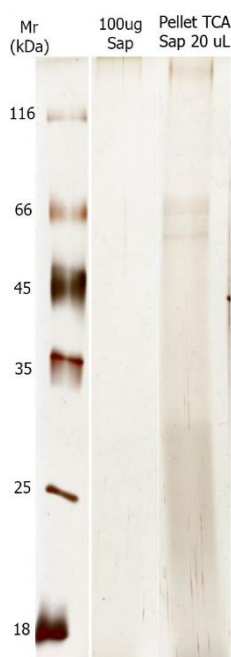


Figura 5: Gel representativo da precipitação de proteínas na amostra de saponina S7900 (Sigma). Solução contendo 100 µg de saponina e o *pellet* obtido após precipitação das proteínas por TCA foram analisados em SDS-PAGE 12%. Coloração por nitrato de prata.

4.3. Resultados da quantificação de proteínas e perfil eletroforético unidimensional das preparações vacinais.

O gel resultante do procedimento descrito no item 3.3.3, mostra o perfil de bandas referente às amostras AgLB 4°C L:1/15 Sart, AgLB 4°C 3/15, LBSap 4°C L:1/14 e LBSap 37°C L:1/14 (Figura 6). Para todas as amostras foram aplicados no gel o equivalente a 5µg de proteínas (a tabela 2 mostra os resultados de quantificação de proteínas obtidos). Nas amostras contendo saponina, observou-se uma quantidade de proteína inferior ao aplicado nas demais canaletas sendo necessário a correção por densitometria. Nas dosagens com saponina pelo método do BCA, a presença do adjuvante superestimou a concentração de proteínas. Comparando-se entre as amostras, é possível observar que a amostra AgLB 4°C L:1/15 Sart (canaleta 4) possui um perfil bem semelhante à AgLB 4°C 3/15 (canaleta 5) a qual não passou pela filtração. A amostra LBSap 37°C L1/14 (canaleta 2) apresentou menor quantidade de bandas coradas pelo coomassie coloidal quando comparada à LBSap 4°C L:1/14 (canaleta 3) produzida no mesmo ano, mas armazenada em temperatura diferente. As preparações vacinais produzidas nos anos de 2014 (canaletas 2 e 3) e 2015 (canaletas 4 e 5) também mostraram um perfil diferente sendo que as de 2014 possuem menor quantidade de proteínas.

Tabela 2: Resultado da quantificação de proteínas totais por BCA.

Amostra	Coefficiente de correlação	Dosagem (mg/mL)	Correção por densitometria
Lisado LB	0,9809	8,6697	-
LBSap L1/14 37°C SART		0,3904	0,1052
LBSap L1/14 4°C	0,9927	0,6203	0,2269
AgLB L3/15 4°C		0,4364	-
AgLB L1/15 4°C SART		0,3976	-

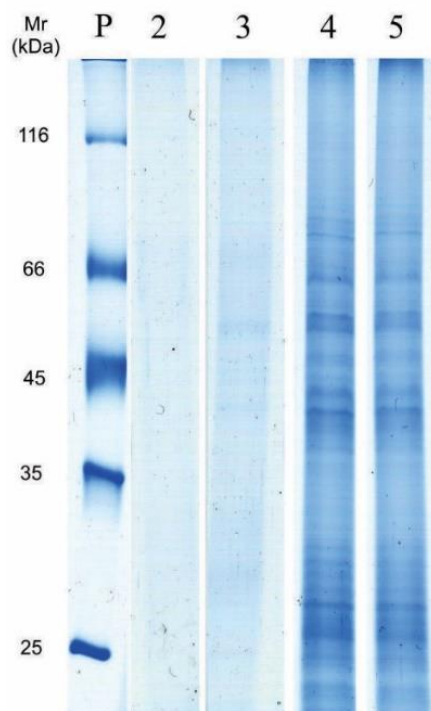


Figura 6: Perfil eletroforético das preparações vacinais produzidas pela Ouro Fino. (P: padrão; 2: LBSap 37°C L1/14 Sart; 3: LBSap 4°C L:1/14; 4: AgLB 4°C L:1/15 Sart; 5: AgLB 4°C 3/15). Coloração por coomassie coloidal.

4.4. Análise da interferência da saponina na quantificação de proteínas pelos métodos BCA, Bradford e Lowry

Amostras contendo a mesma quantidade de antígeno vacinal e variadas concentrações de saponina foram avaliados por três diferentes metodologias para dosagem de proteínas (tabela 3 e figura 7). Nos métodos de BCA e Lowry, observou-se que para concentrações crescentes de saponina, há um aumento crescente de absorvância superestimando a concentração proteica das amostras. O aumento observado não foi diretamente proporcional à concentração de saponina. As mesmas amostras foram dosadas por Bradford e não apresentaram leitura, apesar do método se mostrar adequado para dosagem de proteínas como mostra a curva padrão contendo albumina bovina que

apresentou $r^2 = 0,999$. O método de BCA se mostrou mais adequado para as dosagens sendo compatível com a quantidade de proteínas aplicadas nos géis de eletroforese.

Tabela 3: Resultados das dosagens com diferentes concentrações de saponina pelos métodos BCA, Bradford e Lowry.

Amostras	BCA $r^2=0,991$		Bradford $r^2 = 0,999$		Lowry $r^2 = 0,772$	
	Conc	CV	Conc	CV	Conc	CV
1,0 mg/mL sap + 600 μ g	1,156	8,5	0,062	4,2	0,782	2,3
0,5 mg/mL sap + 600 μ g	0,866	12,8	0,071	18,8	0,766	16,1
0,25 mg/mL sap + 600 μ g	0,742	9,0	0,112	23,6	0,645	10,1
0,125 mg/mL sap + 600 μ g	0,588	12,3	0,054	6,3	0,581	10,0
0,0625 mg/mL sap + 600 μ g	0,38	5,9	0,075	11,8	0,457	14,1
0,0 mg/mL sap + 600 μ g	0,507	9,1	0,071	10,9	0,354	6,0
1,0 mg/mL sap	0,579	11,8	0,035	24,3	0,595	0,8
0,50 mg/mL sap	0,275	9,0	0,031	9,9	0,227	7,3

Sap = Saponina, Conc = concentração, CV= coeficiente de variação

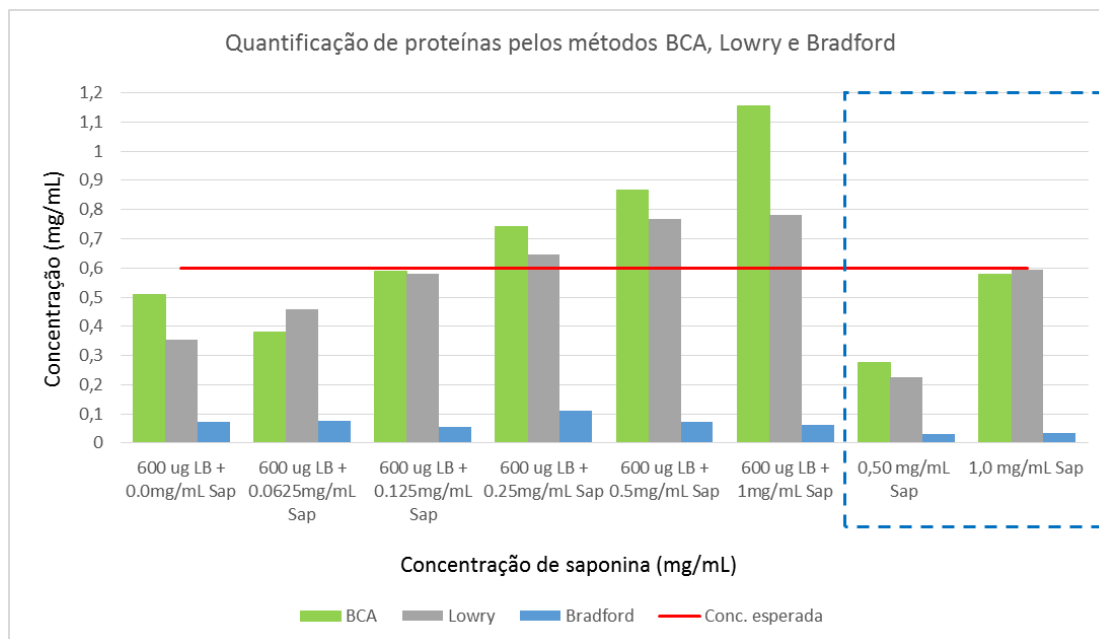


Figura 7: Dosagem de proteína totais pelos métodos BCA, Bradford e Lowry.

4.5. Nanocromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e análise proteômica quantitativa em larga escala

Os arquivos.raw obtidos foram carregados no programa Raw Meat para avaliar exatidão e reprodutibilidade das corridas pelo LC-MS/MS. O programa forneceu o cromatograma TIC (*total ion current*) o qual utiliza a soma das intensidades de todos os picos espectrais daquela corrida. Os perfis dos cromatogramas das cinco amostras em estudos foram superpostos como representado na figura 8 demonstrando a uniformidade do perfil composicional das amostras.

Ao longo de toda a corrida, foi realizado a monitorização de um íon presente no ambiente com m/z igual a 445.121. Esse íon foi detectado durante toda a análise cromatográfica indicando a exatidão em massa ao longo da corrida.

Além dessas análises foi possível avaliar o grau de complexidade das amostras. O programa realizou a análise dos íons mais intensos durante todo o gradiente. No intervalo de tempo retenção de 20 a 40 minutos, o equipamento operou majoritariamente realizando análise dos 12 íons mais intensos, denominados como TOP 12 da corrida (Anexo I).

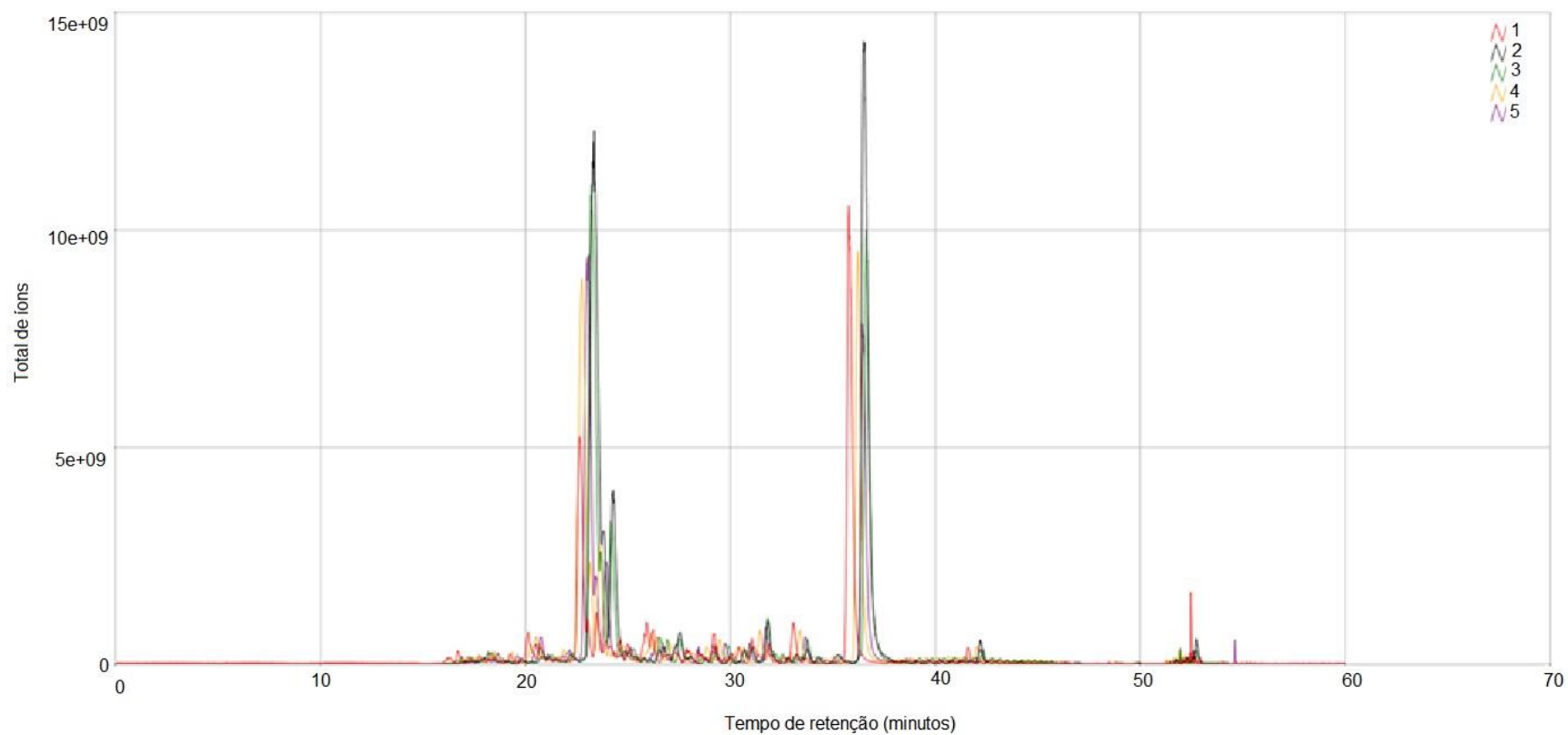


Figura 8: Representação do TIC (*total ion current*). Os cromatogramas das 5 amostras analisadas foram sobrepostos demonstrando a performance das corridas.

O software PEAKS comparou as sequências do *de novo* com o banco de *L. braziliensis* fornecendo identificação de 7.191 sequências de peptídeos e 1.654 grupos de proteínas. A interferência dos diferentes processos sobre as amostras foi avaliada através da quantificação *label free* na qual obteve-se a combinação dos dados espectrais das cinco amostras analisadas. Para tal, as identificações entre as réplicas técnicas foram combinadas baseando-se no resultado da correlação de Pearson (valores superiores a 0,9) que mostraram alta similaridade entre elas (figura 9 e Anexo II). Avaliou-se também, a correlação entre as cinco amostras em estudo que apresentaram boa relação linear (correlação de Pearson superior a 0,8) representados no anexo III.

Após a combinação dos dados espectrais, a quantificação identificou 1.425 grupos de proteínas representados através do *Heat Map* (Anexo IV e material suplementar em mídia). Para análise da diferença composicional entre amostras, considerou-se *fold* $\geq 1,5$, qualidade ≥ 1 , significância $\leq 0,01$ como filtro para peptídeos e proteínas, obtendo-se 451 grupos de proteínas diferencialmente identificadas (figura 10). Observa-se que houve grande diferença nas abundâncias das proteínas entre os lotes de 2014 e 2015. As preparações LBSap L1/14 37°C Sart (2) e LBSap L1/14 4°C demonstraram um perfil muito diferente em relação às demais, demonstrando diminuição dos níveis proteicos para a maioria das moléculas identificadas (verde). Já as amostras AgLB L3/15 4°C e AgLB L1/15 4°C Sart demonstraram um perfil de expressão bem semelhante como pode ser observado por toda extensão do *heat map*.

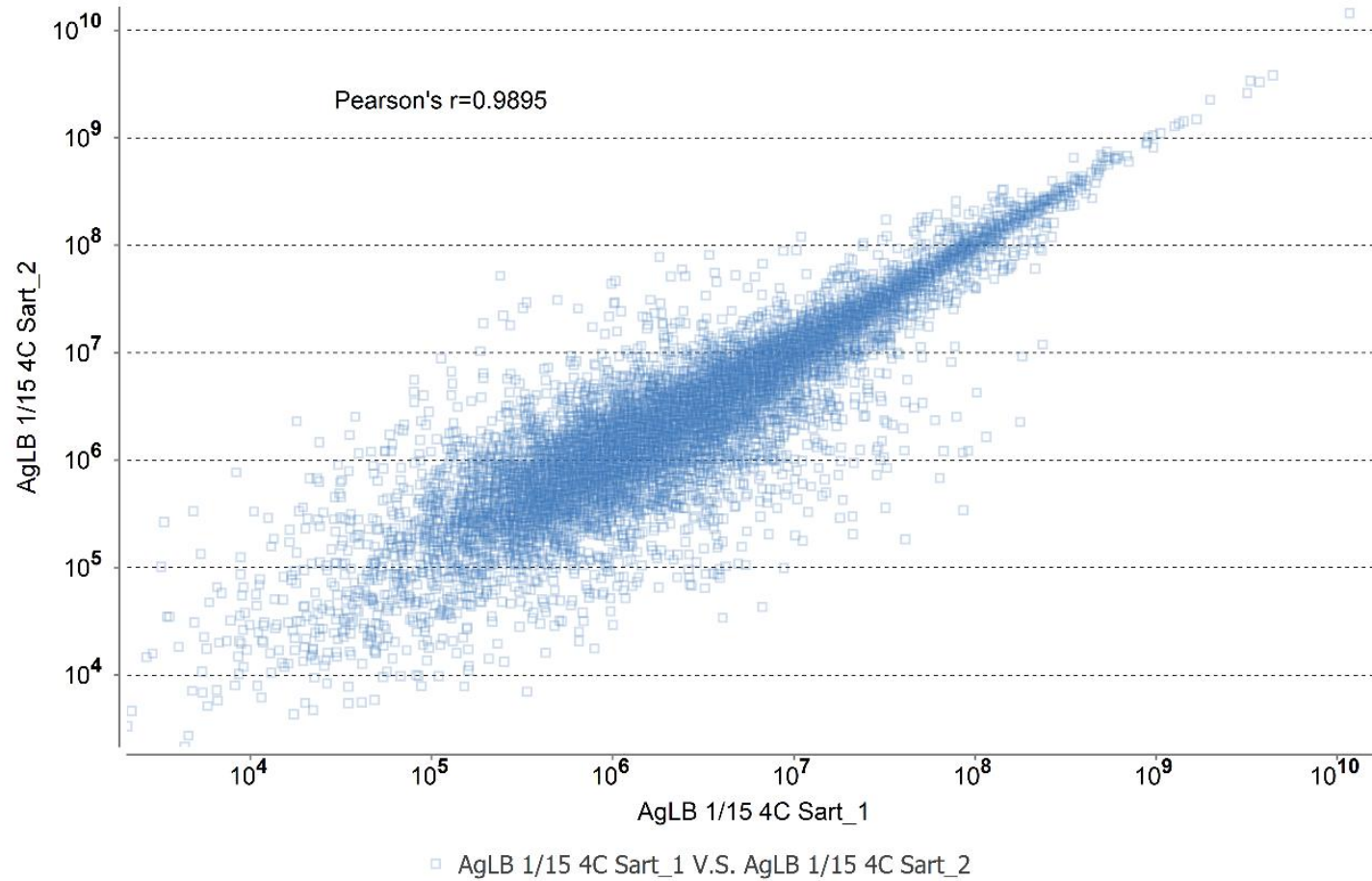


Figura 9: Correlação de Pearson entre réplicas.

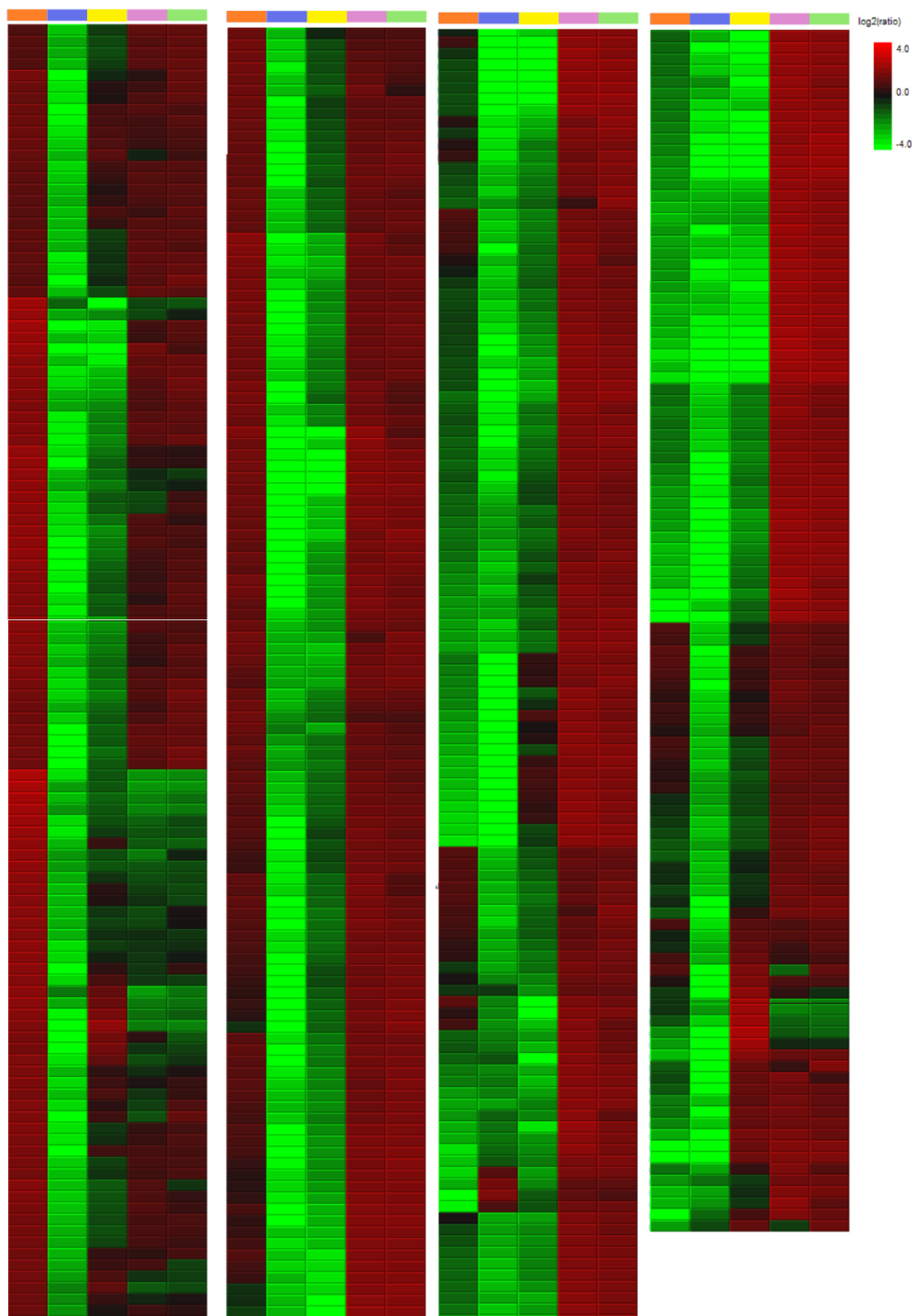


Figura 10: Total de 451 grupos de proteínas diferencialmente identificadas após aplicação dos filtros para peptídeos e proteínas. Filtros: $fold \geq 1,5$, qualidade ≥ 1 , significância $\leq 0,01$. Identificação das amostras: alaranjado = Lisado; azul = LBSap 1/14 37C Sart; amarelo: LBSap 1/14 4C; rosa: AgLB 1/15 4C Sart; verde: AgLB 3/15.

Após análise dos espectros MS/MS, o Peaks forneceu o número de PSM (*peptide spectrum match*) o qual se refere ao número de peptídeos tripticos observados na amostra que apresentaram *match* total com as proteínas de origem presentes no banco de dados da espécie em estudo (figura 11). As amostras mais conservadas apresentaram um número maior de PSM sendo que a amostra armazenada a 37°C apresentou menor quantidade de peptídeos identificados.

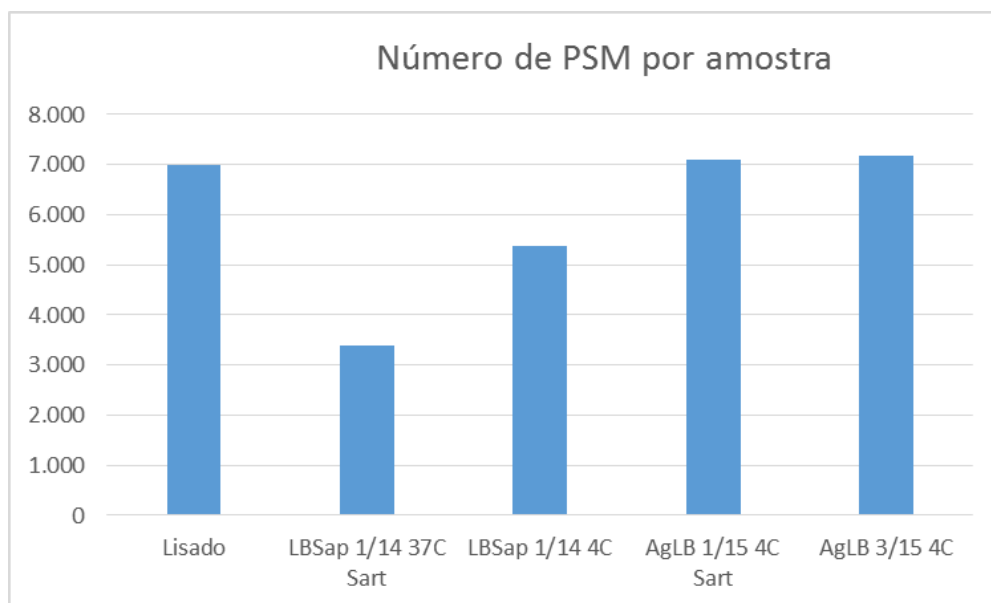


Figura 11: Total de PSM (*peptide spectrum match*) por amostra.

A avaliação do processo de filtração em membrana de 0,22 μm foi possível comparando-se as amostras AgLB L1/15 4°C SART e AgLB L3/15 4°C. Para tal, novo *Heat Map* foi gerado considerando-se apenas essas duas amostras. A nova quantificação *label free* forneceu 1.063 grupos de proteínas e mostrou um perfil composicional bastante similar para a maioria das proteínas identificadas sendo que pequenas diferenças foram observadas nas proteínas do início e final desse *Heat map* (figura 12). A partir do gráfico volcano foi possível observar o alto grau de semelhança entre essas amostras (Figura 13). Para interpretação da diferença entre AgLB L1/15 4°C SART e AgLB L3/15 4°C, aplicou-se filtros para proteínas considerando apenas as que possuíam significância $\leq 0,01$ obtendo-se apenas 2 proteínas diferencialmente expressas com significância estatística (Tabela 4).

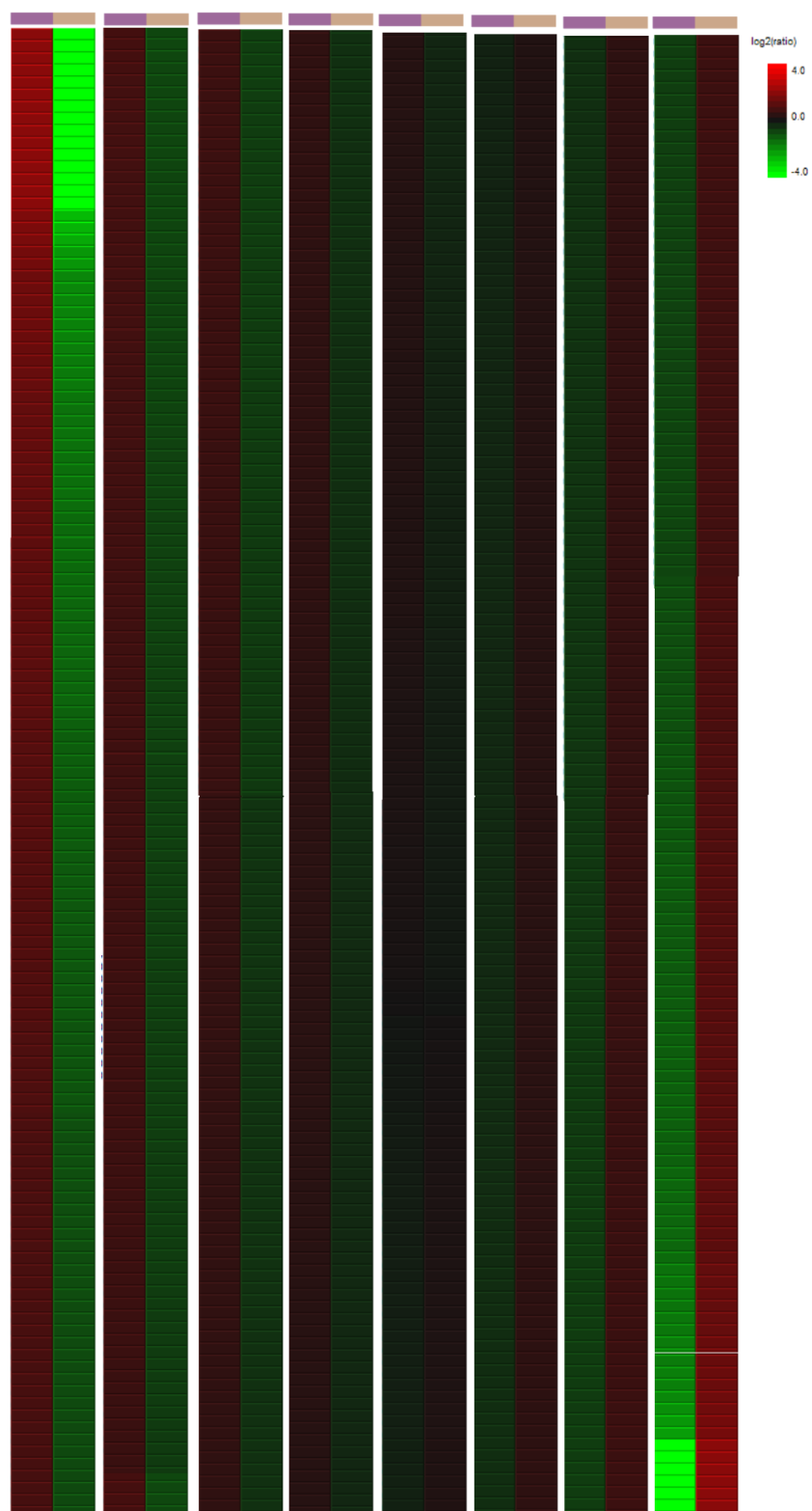


Figura 12: *Heat Map* representando as 1.063 proteínas comuns as amostras AgLB L1/15 4°C SART (amostra filtrada) e AgLB L3/15 4°C (não filtrada).

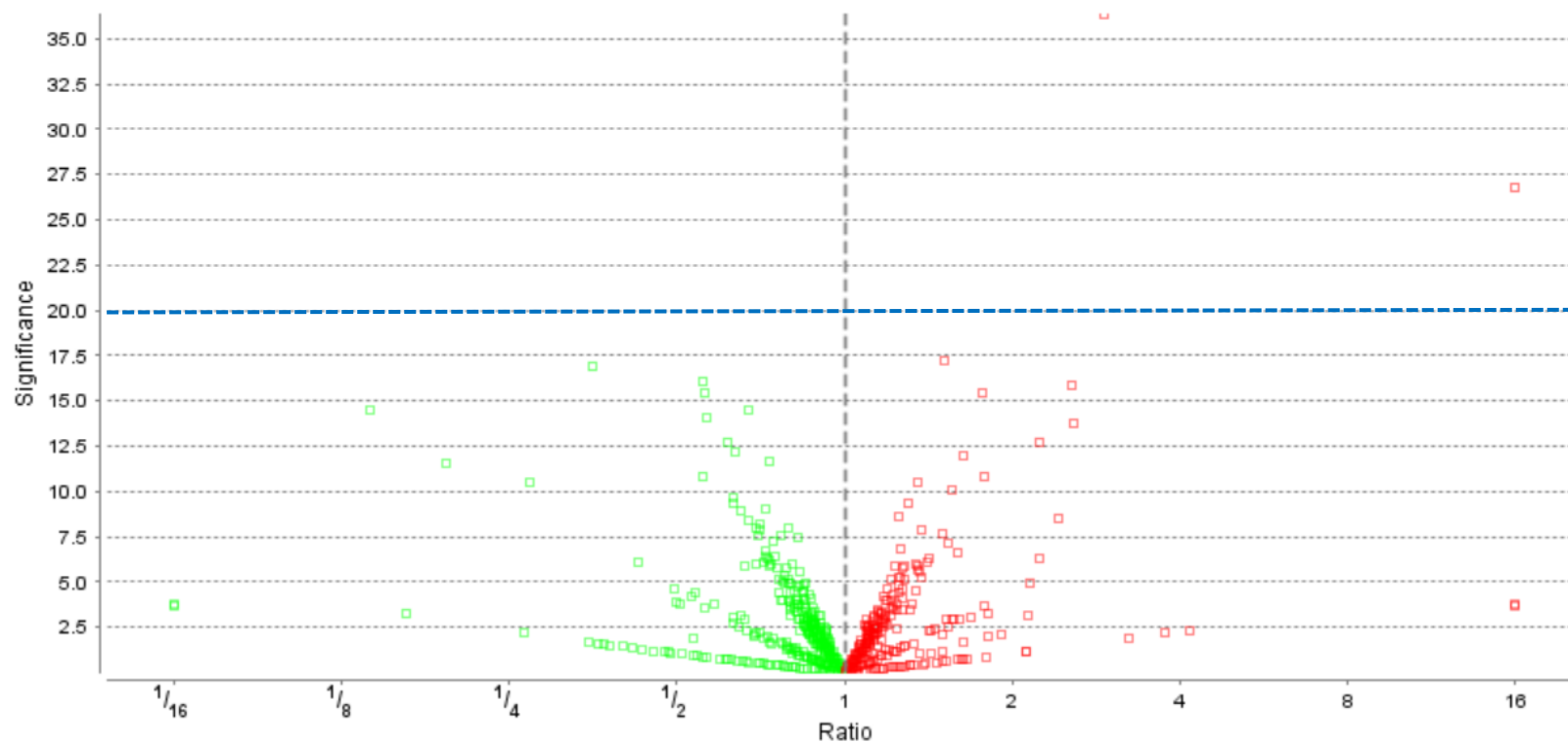


Figura 13: Gráfico Volcano das 1.063 proteínas identificadas das amostras AgLB L1/15 4°C SART e AgLB L3/15 4°C, sem aplicação dos filtros. (O programa PEAKS calcula para o gráfico acima a significância como $-10\log P$, dessa forma, significância 20 no gráfico corresponde a $p = 0,01$).

Tabela 4: Proteínas diferencialmente identificadas entre as amostras AgLB L1/15 4°C SART e AgLB L3/15 4°C.

Número de acesso	Descrição	kDa
LBRM2903_110012700	<i>Start domain containing protein, putative</i>	37,2
LBRM2903_230020500	<i>Hypothetical protein</i>	11,06

Considerando-se apenas as amostras mais conservadas LBSap 1/14 4C, AgLB 3/15 e AgLB 1/15 Sart, elaborou-se diagrama de Venn mostrando que 937 proteínas são comuns entre essas amostras (Figura 14). Baseado nisso, calculou-se a variação das proteínas dentro desse grupo, obtendo-se 167 proteínas com variação menor que 20% (Tabela 5).

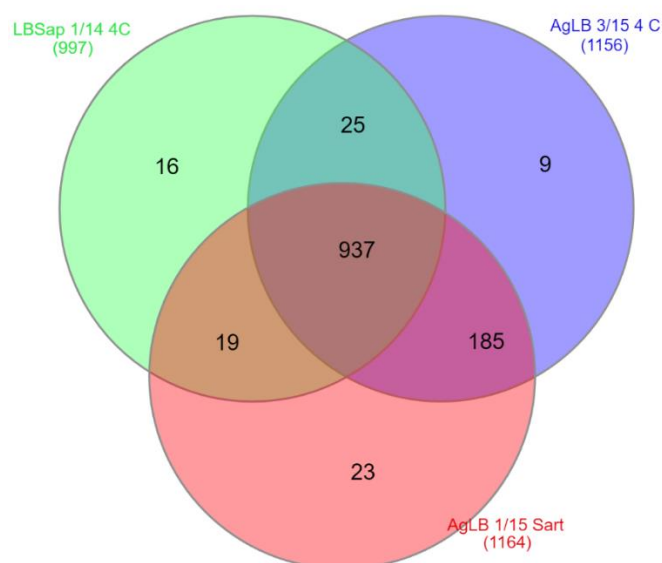


Figura 14: Diagrama de Venn entre as amostras LBSap 1/14 4C, AgLB 3/15 e AgLB 1/15 Sart.

Tabela 5: Relação das proteínas com CV < 20%.

Código de acesso ao banco <i>L. braziliensis</i>	LBSap 1/14 4C Area	AgLB 1/15 4C Sart Area	AgLB 3/15 4C Area	CV<20%	Fold	Massa	Descrição
LBRM2903_100011300	6,33E+07	6,45E+07	6,34E+07	1,04	0.98:1.00:0.98	14019	Leishmanolysin putative
LBRM2903_130010300	1,94E+06	1,98E+06	1,98E+06	1,17	0.98:1.00:1.00	66638	palmitoyl acyltransferase 6 putative
LBRM2903_350032800	1,94E+08	1,90E+08	1,94E+08	1,20	1.02:1.00:1.02	49892	tyrosine aminotransferase (TAT)
LBRM2903_330014300	8,43E+09	8,41E+09	8,19E+09	1,60	1.00:1.00:0.97	49744	beta tubulin
LBRM2903_220005400	1,52E+08	1,48E+08	1,53E+08	1,75	1.03:1.00:1.04	21589	60S ribosomal protein L11 (L5 L16) (RPL11)
LBRM2903_090015300	7,43E+08	7,13E+08	7,04E+08	2,84	1.04:1.00:0.99	16825	calmodulin putative
LBRM2903_020009300	1,54E+07	1,62E+07	1,62E+07	2,90	0.95:1.00:1.00	44286	casein kinase II alpha chain putative
LBRM2903_160014400	1,30E+07	1,39E+07	1,34E+07	3,36	0.94:1.00:0.97	603862	N-terminal region of Chorein a TM vesicle-mediated sorter putative
LBRM2903_280028000	8,92E+06	9,46E+06	9,46E+06	3,36	0.94:1.00:1.00	84671	Leucine Rich repeat putative
LBRM2903_220019500	5,99E+07	6,39E+07	6,08E+07	3,41	0.94:1.00:0.95	16498	centrin putative
LBRM2903_090022100	1,75E+07	1,85E+07	1,74E+07	3,42	0.94:1.00:0.94	13154	cytochrome b5-like protein putative
LBRM2903_030014900	1,14E+08	1,19E+08	1,11E+08	3,52	0.96:1.00:0.93	46711	eukaryotic initiation factor 2a putative
LBRM2903_120009200	1,87E+07	1,96E+07	1,83E+07	3,53	0.96:1.00:0.94	39545	p1/s1 nuclease 3'-nucleotidase/nuclease putative
LBRM2903_290016000	4,83E+07	4,49E+07	4,66E+07	3,65	1.08:1.00:1.04	20130	ADP-ribosylation factor-like protein 3A putative (arl3a)
LBRM2903_140020200	1,20E+08	1,26E+08	1,30E+08	4,02	0.95:1.00:1.03	58284	inositol-3-phosphate synthase (INO1)
LBRM2903_300029600	4,06E+07	3,86E+07	3,75E+07	4,04	1.05:1.00:0.97	19964	ADP-ribosylation factor-like protein
LBRM2903_300040800	2,69E+08	2,86E+08	2,92E+08	4,23	0.94:1.00:1.02	21576	60S ribosomal protein L9 putative
LBRM2903_320021300	1,26E+07	1,32E+07	1,38E+07	4,55	0.95:1.00:1.04	119660	RNA guanylyltransferase putative
LBRM2903_160024600	3,20E+06	3,40E+06	3,10E+06	4,72	0.94:1.00:0.91	70899	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma putative (EIF4G3)
LBRM2903_130016400	5,88E+08	5,42E+08	5,91E+08	4,79	1.09:1.00:1.09	30638	40S ribosomal protein S4 putative
LBRM2903_270028400	1,34E+08	1,43E+08	1,30E+08	4,91	0.94:1.00:0.91	687415	calpain-like cysteine peptidase putative
LBRM2903_060017300	1,47E+08	1,58E+08	1,44E+08	4,93	0.93:1.00:0.91	14986	protein disulfide isomerase (PDI-1)
LBRM2903_070005800	4,53E+07	4,84E+07	5,00E+07	4,99	0.94:1.00:1.03	29962	cytochrome c1 heme protein mitochondrial precursor putative
LBRM2903_250031100	1,31E+07	1,29E+07	1,19E+07	5,09	1.01:1.00:0.92	34258	Parkin co-regulated protein putative
LBRM2903_200025300	2,25E+06	2,45E+06	2,47E+06	5,09	0.92:1.00:1.01	30588	pyroglutamyl-peptidase I (C15 family) (PPI)
LBRM2903_160012300	5,82E+07	5,32E+07	5,30E+07	5,38	1.10:1.00:1.00	205861	carbamoyl-phosphate synthase putative
LBRM2903_300014500	1,55E+07	1,48E+07	1,39E+07	5,44	1.05:1.00:0.94	125597	Armadillo/beta-catenin-like repeats putative
LBRM2903_240030700	5,65E+06	6,34E+06	5,99E+06	5,76	0.89:1.00:0.94	20025	hypothetical protein conserved
LBRM2903_340046900	2,98E+07	2,90E+07	3,24E+07	5,85	1.03:1.00:1.12	16139	60S ribosomal protein L27A/L29 putative
LBRM2903_200044400	2,12E+07	2,36E+07	2,36E+07	6,08	0.90:1.00:1.00	50273	ruvb-like 1 DNA helicase putative
LBRM2903_300013700	2,30E+06	2,52E+06	2,25E+06	6,10	0.91:1.00:0.89	17998	nuclear movement protein putative
LBRM2903_350063500	1,97E+08	1,95E+08	1,76E+08	6,12	1.01:1.00:0.90	27526	40S ribosomal protein SA putative
LBRM2903_180019400	1,17E+07	1,30E+07	1,31E+07	6,20	0.90:1.00:1.01	33750	Mitochondrial carrier protein putative
LBRM2903_270014600	8,93E+06	9,18E+06	8,09E+06	6,54	0.97:1.00:0.88	10758	glutaredoxin-like protein
LBRM2903_130007500	6,59E+09	6,12E+09	5,78E+09	6,60	1.08:1.00:0.95	49683	alpha tubulin
LBRM2903_060012000	2,33E+06	2,66E+06	2,50E+06	6,61	0.88:1.00:0.94	111955	Putative Phosphatase/Protein of unknown function DUF89 putative
LBRM2903_350086800	4,30E+06	4,91E+06	4,67E+06	6,64	0.88:1.00:0.95	27172	hypothetical protein
LBRM2903_250023400	1,87E+08	2,00E+08	2,15E+08	6,98	0.94:1.00:1.08	24240	GTP-binding protein putative
LBRM2903_330038900	1,74E+07	1,63E+07	1,89E+07	7,44	1.07:1.00:1.16	47920	transcription elongation factor-like protein
LBRM2903_320010100	3,68E+08	4,24E+08	4,17E+08	7,57	0.87:1.00:0.98	28896	40S ribosomal protein S2
LBRM2903_300037000	6,61E+07	6,00E+07	5,70E+07	7,60	1.10:1.00:0.95	60489	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7-like protein
LBRM2903_050006300	1,53E+07	1,78E+07	1,70E+07	7,64	0.86:1.00:0.95	74431	nucleolar RNA helicase II putative
LBRM2903_060016400	5,39E+05	4,85E+05	5,67E+05	7,86	1.11:1.00:1.17	175796	Domain of unknown function (DUF3883) putative
LBRM2903_310025700	1,04E+07	1,15E+07	1,22E+07	7,98	0.91:1.00:1.06	24031	ABC transporter putative
LBRM2903_090010900	4,32E+06	5,07E+06	4,85E+06	8,12	0.85:1.00:0.96	86660	hypothetical protein conserved
LBRM2903_270032400	5,61E+06	6,60E+06	6,31E+06	8,24	0.85:1.00:0.96	44018	GTP binding protein putative
LBRM2903_310006100	1,54E+08	1,31E+08	1,48E+08	8,27	1.17:1.00:1.13	14696	40S ribosomal protein S15A putative
LBRM2903_330034900	4,19E+06	4,86E+06	4,25E+06	8,36	0.86:1.00:0.87	57539	hypothetical protein conserved
LBRM2903_350019800	5,04E+08	4,26E+08	4,68E+08	8,38	1.18:1.00:1.10	22065	ribosomal protein S4 putative

Código de acesso ao banco <i>L. braziliensis</i>	LBSap 1/14 4C Area	AgLB 1/15 4C Sart Area	AgLB 3/15 4C Area	CV<20%	Fold	Massa	Descrição
LBRM2903_350021000	8,43E+07	9,25E+07	1,00E+08	8,51	0.91:1.00:1.09	87286	Transitional endoplasmic reticulum ATPase putative
LBRM2903_340017600	1,17E+07	1,30E+07	1,10E+07	8,53	0.90:1.00:0.84	28125	short chain dehydrogenase putative
LBRM2903_150013900	6,56E+08	7,60E+08	7,67E+08	8,54	0.86:1.00:1.01	24472	40S ribosomal protein S3 putative
LBRM2903_090009900	8,12E+06	7,15E+06	6,93E+06	8,56	1.14:1.00:0.97	50872	Plus-3 domain/Zinc finger C3HC4 type (RING finger) containing protein putative
LBRM2903_350086300	3,62E+08	4,05E+08	3,43E+08	8,59	0.90:1.00:0.85	52391	protein disulfide isomerase (PDI-2)
LBRM2903_350070000	2,16E+06	2,53E+06	2,21E+06	8,73	0.85:1.00:0.87	28745	CAP/Srv2p putative
LBRM2903_340043800	9,69E+06	8,18E+06	9,36E+06	8,75	1.19:1.00:1.14	24326	Pre-rRNA-processing protein PNO1 putative (PNO1)
LBRM2903_270011500	4,54E+07	5,04E+07	4,23E+07	8,88	0.90:1.00:0.84	177970	calpain-like cysteine peptidase putative
LBRM2903_170012600	7,05E+07	5,90E+07	6,47E+07	8,88	1.20:1.00:1.10	10564	Acyl CoA binding protein putative
LBRM2903_270019500	3,11E+07	3,39E+07	3,72E+07	8,96	0.92:1.00:1.10	35221	WD domain G-beta repeat putative
LBRM2903_350040300	6,31E+07	5,38E+07	6,35E+07	9,13	1.17:1.00:1.18	43933	succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain putative
LBRM2903_340011000	3,18E+08	3,54E+08	3,82E+08	9,13	0.90:1.00:1.08	20752	60S ribosomal protein L18a putative
LBRM2903_220021400	8,76E+07	8,19E+07	9,80E+07	9,16	1.07:1.00:1.20	20071	60S ribosomal protein L14 putative
LBRM2903_230009900	7,43E+07	6,28E+07	7,38E+07	9,25	1.18:1.00:1.17	38305	NADP-dependent alcohol dehydrogenase putative
LBRM2903_340005600	1,26E+08	1,41E+08	1,52E+08	9,34	0.89:1.00:1.08	50664	pyruvate kinase (PYK)
LBRM2903_340015400	3,38E+07	2,80E+07	3,00E+07	9,63	1.21:1.00:1.07	45211	cell cycle sequence binding phosphoprotein (RBP33) putative
LBRM2903_350017000	2,01E+07	2,36E+07	2,42E+07	9,78	0.85:1.00:1.02	13305	Plectin/S10 domain containing protein putative
LBRM2903_300016900	1,23E+07	1,46E+07	1,47E+07	9,79	0.84:1.00:1.01	114604	ubiquitin conjugation factor E4 B putative
LBRM2903_040020500	1,29E+08	1,41E+08	1,57E+08	9,87	0.91:1.00:1.11	42207	actin (ACT)
LBRM2903_180018800	4,98E+07	6,04E+07	5,79E+07	9,89	0.82:1.00:0.96	80272	bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase putative prolyl-tRNA synthetase putative
LBRM2903_130021400	6,77E+07	8,18E+07	7,95E+07	9,91	0.83:1.00:0.97	58804	chaperonin TCP20 putative
LBRM2903_190006900	2,14E+07	1,90E+07	1,75E+07	10,19	1.13:1.00:0.92	52899	seryl-tRNA synthetase putative
LBRM2903_210017600	1,66E+08	1,84E+08	2,05E+08	10,55	0.90:1.00:1.11	15918	40S ribosomal protein S23 putative
LBRM2903_200034000	2,45E+08	2,78E+08	3,03E+08	10,57	0.88:1.00:1.09	17950	40S ribosomal protein S19-like protein 40S ribosomal protein S19 protein putative
LBRM2903_320016600	4,58E+07	3,95E+07	3,75E+07	10,58	1.16:1.00:0.95	59309	chaperonin containing t-complex protein putative
LBRM2903_340060700	2,10E+06	2,11E+06	2,52E+06	10,68	1.00:1.00:1.19	19414	hypothetical protein conserved
LBRM2903_280030100	1,79E+07	1,86E+07	2,18E+07	10,70	0.96:1.00:1.17	72127	hypothetical protein conserved
LBRM2903_350057400	5,77E+07	4,66E+07	5,45E+07	10,79	1.24:1.00:1.17	15054	60S ribosomal protein L22 putative
LBRM2903_340046200	3,20E+06	3,98E+06	3,70E+06	10,90	0.80:1.00:0.93	27289	Peroxisomal biogenesis factor 11 (PEX11) putative
LBRM2903_200055000	2,51E+07	2,02E+07	2,18E+07	11,17	1.24:1.00:1.08	33077	1 2-Dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase putative
LBRM2903_270019600	3,56E+07	4,46E+07	4,09E+07	11,21	0.80:1.00:0.92	57739	T-complex protein 1 beta subunit putative
LBRM2903_080008200	5,75E+07	5,76E+07	4,70E+07	11,27	1.00:1.00:0.82	26110	iron superoxide dismutase (FESODA)
LBRM2903_200046400	2,39E+08	2,74E+08	3,01E+08	11,46	0.87:1.00:1.10	18031	60S ribosomal protein L21 putative
LBRM2903_350019900	4,14E+08	5,00E+08	5,16E+08	11,51	0.83:1.00:1.03	40845	fructose-1 6-bisphosphate aldolase (ALD)
LBRM2903_170017300	3,14E+07	3,78E+07	3,08E+07	11,64	0.83:1.00:0.82	48406	META domain containing protein (META2)
LBRM2903_050005200	4,88E+07	6,17E+07	5,47E+07	11,73	0.79:1.00:0.89	21702	ras-like small GTPases putative
LBRM2903_260006600	2,25E+08	2,52E+08	2,85E+08	11,83	0.89:1.00:1.13	27449	60S ribosomal protein L7 putative
LBRM2903_340024600	7,10E+07	6,07E+07	7,74E+07	12,09	1.17:1.00:1.27	24424	ribosomal protein L15 putative
LBRM2903_340040100	4,30E+08	5,30E+08	5,40E+08	12,17	0.81:1.00:1.02	44613	cystathione gamma lyase putative

Código de acesso ao banco <i>L. braziliensis</i>	LBSap 1/14 4C Area	AgLB 1/15 4C Sart Area	AgLB 3/15 4C Area	CV<20%	Fold	Massa	Descrição
LBRM2903_330008100	1,09E+06	1,36E+06	1,36E+06	12,27	0.80:1.00:1.00	74175	ATP-binding cassette sub-family F member 1 putative (ABCF1)
LBRM2903_100019900	6,91E+08	8,58E+08	7,04E+08	12,37	0.80:1.00:0.82	14759	histone H3 putative histone H3
LBRM2903_230023100	1,26E+08	1,62E+08	1,47E+08	12,47	0.78:1.00:0.91	60335	T-complex protein 1 gamma subunit putative
LBRM2903_350016300	2,12E+08	1,66E+08	1,82E+08	12,51	1.28:1.00:1.09	17452	40S ribosomal protein S18 putative
LBRM2903_040016800	5,49E+08	6,48E+08	7,06E+08	12,52	0.85:1.00:1.09	24613	60S ribosomal protein L10 putative
LBRM2903_340009400	5,39E+08	6,44E+08	6,92E+08	12,52	0.84:1.00:1.07	30058	40S ribosomal protein S3A putative
LBRM2903_220012100	5,27E+07	4,10E+07	4,63E+07	12,55	1.28:1.00:1.13	47129	hypothetical protein conserved
LBRM2903_340041200	1,82E+08	1,97E+08	2,32E+08	12,60	0.92:1.00:1.18	52372	6-phosphogluconate dehydrogenase decarboxylating putative
LBRM2903_350030500	6,33E+07	8,15E+07	7,66E+07	12,76	0.78:1.00:0.94	30557	COP-coated vesicle membrane protein erv25 precursor putative
LBRM2903_340006800	5,05E+07	5,53E+07	6,51E+07	13,06	0.91:1.00:1.18	14457	hypothetical protein conserved
LBRM2903_320005800	1,09E+07	1,05E+07	1,33E+07	13,09	1.04:1.00:1.26	38204	protein transport protein SEC13 putative
LBRM2903_240014400	7,67E+06	1,00E+07	8,79E+06	13,21	0.76:1.00:0.88	94456	Mitochondrial SSU ribosomal protein putative
LBRM2903_100007800	1,17E+07	1,41E+07	1,10E+07	13,25	0.83:1.00:0.78	14085	COPI associated protein putative
LBRM2903_120006200	1,78E+08	1,36E+08	1,58E+08	13,35	1.30:1.00:1.16	99631	FYVE zinc finger containing protein putative
LBRM2903_180020300	1,00E+08	1,17E+08	1,31E+08	13,38	0.86:1.00:1.13	42937	pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit putative
LBRM2903_040012500	2,44E+07	3,19E+07	2,96E+07	13,42	0.76:1.00:0.93	23224	hypothetical protein conserved
LBRM2903_160011700	1,48E+08	1,25E+08	1,14E+08	13,45	1.19:1.00:0.91	49708	orotidine-5-phosphate decarboxylase/orotate phosphoribosyltransferase putative
LBRM2903_290030900	6,36E+06	5,03E+06	6,48E+06	13,51	1.26:1.00:1.29	82325	3'5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase putative
LBRM2903_350029100	7,83E+06	7,76E+06	9,78E+06	13,56	1.01:1.00:1.26	35177	chaperonin HSP60 mitochondrial precursor chaperonin HSP60 mitochondrial precursor putative
LBRM2903_100022000	5,32E+07	6,31E+07	7,02E+07	13,73	0.84:1.00:1.11	24375	Ras-related protein RabX1 putative (RABX1)
LBRM2903_180013700	1,52E+07	1,44E+07	1,87E+07	14,20	1.06:1.00:1.30	51627	Elongation factor Tu mitochondrial putative (EF-Tu)
LBRM2903_320014500	3,35E+07	4,35E+07	3,53E+07	14,24	0.77:1.00:0.81	55884	hypothetical protein conserved
LBRM2903_210020000	7,94E+07	8,57E+07	1,04E+08	14,25	0.93:1.00:1.21	36616	adenylate kinase putative
LBRM2903_030006600	2,98E+06	3,72E+06	3,95E+06	14,28	0.80:1.00:1.06	82325	ATP-binding cassette protein subfamily F member 1 putative (ABCF1)
LBRM2903_330009000	3,85E+05	5,06E+05	4,90E+05	14,28	0.76:1.00:0.97	104397	DNA mismatch repair protein MSH2 putative (MSH2)
LBRM2903_320042200	2,52E+08	3,02E+08	3,38E+08	14,53	0.83:1.00:1.12	47642	ribosomal protein L3 putative
LBRM2903_210014800	2,43E+07	3,24E+07	2,75E+07	14,54	0.75:1.00:0.85	26913	xanthine phosphoribosyltransferase (XRPT)
LBRM2903_130009200	7,96E+07	1,07E+08	9,76E+07	14,70	0.75:1.00:0.92	15964	40S ribosomal protein S12 putative
LBRM2903_340030400	4,77E+07	6,43E+07	5,76E+07	14,77	0.74:1.00:0.90	76592	poly(A)-specific ribonuclease PARN putative
LBRM2903_350008700	8,73E+07	1,05E+08	1,18E+08	14,90	0.83:1.00:1.12	62278	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L putative
LBRM2903_320009500	4,01E+08	5,02E+08	5,40E+08	14,94	0.80:1.00:1.07	65902	ATP-dependent RNA helicase putative
LBRM2903_310034900	3,59E+07	4,26E+07	4,88E+07	15,20	0.84:1.00:1.15	20481	ADP-ribosylation factor putative
LBRM2903_340047300	1,55E+08	2,10E+08	1,96E+08	15,29	0.74:1.00:0.94	14971	60S ribosomal protein L23 putative
LBRM2903_300031800	1,55E+08	2,05E+08	2,05E+08	15,33	0.75:1.00:1.00	21966	reticulin domain protein 22 kDa potentially aggravating protein (pape22) (PAPLE22)
LBRM2903_260022300	8,11E+06	6,20E+06	6,34E+06	15,47	1.31:1.00:1.02	9716	40S ribosomal protein S33 putative
LBRM2903_100006200	7,48E+06	9,85E+06	7,66E+06	15,84	0.76:1.00:0.78	83052	hypothetical protein conserved
LBRM2903_150007300	1,99E+08	2,64E+08	2,68E+08	15,90	0.75:1.00:1.01	25366	60S ribosomal protein L13a putative
LBRM2903_330034500	7,11E+05	9,83E+05	9,20E+05	16,34	0.72:1.00:0.94	62972	ras-like small GTPases putative
LBRM2903_070009900	1,40E+07	1,58E+07	1,93E+07	16,47	0.88:1.00:1.22	12687	hypothetical protein

Código de acesso ao banco <i>L. braziliensis</i>	LBSap 1/14 4C Area	AgLB 1/15 4C Sart Area	AgLB 3/15 4C Area	CV<20%	Fold	Massa	Descrição
LBRM2903_340057200	1,01E+06	8,38E+05	1,17E+06	16,50	1.20:1.00:1.40	34775	PACRGB
LBRM2903_320042000	7,35E+07	5,50E+07	5,68E+07	16,52	1.34:1.00:1.03	103937	Serine hydrolase (FSH1)/RWD domain/50S ribosome-binding GTPase/GTPase of unknown function C-terminal putative
LBRM2903_280031500	6,30E+07	8,76E+07	7,29E+07	16,61	0.72:1.00:0.83	46347	eukaryotic translation initiation factor putative
LBRM2903_330020900	1,37E+07	1,03E+07	1,42E+07	16,67	1.33:1.00:1.38	46454	glutamine aminotransferase putative (GlnAT)
LBRM2903_250026100	3,11E+07	2,25E+07	2,52E+07	16,74	1.39:1.00:1.12	37913	pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit putative
LBRM2903_260021100	5,01E+08	6,32E+08	7,07E+08	17,00	0.79:1.00:1.12	43483	Glutaredoxin putative
LBRM2903_070019400	2,29E+07	3,20E+07	3,05E+07	17,14	0.72:1.00:0.95	34532	nucleolar RNA-binding protein putative
LBRM2903_160007600	1,20E+07	9,65E+06	8,61E+06	17,22	1.25:1.00:0.89	19454	protein tyrosine phosphatase-like protein
LBRM2903_010009300	6,08E+08	6,75E+08	8,45E+08	17,22	0.90:1.00:1.25	23809	ribosomal protein S7 putative
LBRM2903_330025000	3,14E+07	4,44E+07	4,10E+07	17,32	0.71:1.00:0.92	101223	hypothetical protein conserved
LBRM2903_340007800	6,19E+07	4,86E+07	6,91E+07	17,37	1.27:1.00:1.42	11399	60S ribosomal protein L30
LBRM2903_140011900	3,07E+08	4,32E+08	4,09E+08	17,39	0.71:1.00:0.95	32367	fatty acid elongase putative (ELO1.2)
LBRM2903_340009000	1,98E+08	2,79E+08	2,65E+08	17,50	0.71:1.00:0.95	46389	ATP-dependent DEAD-box RNA helicase putative
LBRM2903_270014200	1,68E+08	2,28E+08	2,35E+08	17,51	0.74:1.00:1.03	22281	ras-related protein RAB1A putative (Rab1A)
LBRM2903_350037900	2,31E+07	2,97E+07	3,33E+07	18,02	0.78:1.00:1.12	18530	acetyltransferase-like protein
LBRM2903_320047900	3,94E+07	5,62E+07	5,31E+07	18,04	0.70:1.00:0.94	16990	hypothetical protein conserved
LBRM2903_240007700	9,93E+06	1,33E+07	1,42E+07	18,04	0.75:1.00:1.07	75320	dynein intermediate-chain-like protein
LBRM2903_280029100	7,54E+06	8,10E+06	1,05E+07	18,05	0.93:1.00:1.29	60022	mitochondrial DEAD box protein putative
LBRM2903_330035100	1,29E+07	1,83E+07	1,78E+07	18,27	0.70:1.00:0.97	113577	hypothetical protein conserved
LBRM2903_050005400	8,41E+07	1,04E+08	1,22E+08	18,34	0.81:1.00:1.18	95332	hypothetical protein conserved
LBRM2903_340018200	7,04E+06	9,95E+06	9,91E+06	18,61	0.71:1.00:1.00	39884	ATPase family associated with various cellular activities (AAA) putative
LBRM2903_100007300	2,98E+07	4,35E+07	3,86E+07	18,61	0.68:1.00:0.89	29102	hypothetical protein conserved
LBRM2903_310041400	1,36E+08	1,89E+08	1,95E+08	18,73	0.72:1.00:1.03	20174	ADP-ribosylation factor putative
LBRM2903_110016100	8,46E+06	7,16E+06	1,04E+07	18,80	1.18:1.00:1.45	122576	protein transport protein SEC31 putative
LBRM2903_300017200	3,44E+07	3,96E+07	4,97E+07	18,87	0.87:1.00:1.26	29351	hypothetical protein conserved
LBRM2903_310009600	3,04E+06	4,35E+06	3,39E+06	18,88	0.70:1.00:0.78	69524	nucleolar protein putative
LBRM2903_320009800	3,73E+07	4,63E+07	5,47E+07	18,88	0.81:1.00:1.18	19009	60S ribosomal protein L17 putative
LBRM2903_320037100	1,41E+08	1,91E+08	2,06E+08	18,98	0.74:1.00:1.08	15309	ribosomal protein L27 putative
LBRM2903_290014100	5,88E+07	4,77E+07	4,03E+07	19,03	1.23:1.00:0.84	92982	heat shock protein 90 putative (LPG3)
LBRM2903_200036300	2,33E+05	3,22E+05	3,39E+05	19,10	0.72:1.00:1.05	72233	selenocysteine-specific elongation factor putative
LBRM2903_330028100	6,25E+07	9,08E+07	8,67E+07	19,12	0.69:1.00:0.95	51242	peptidase m20/m25/m40 family-like protein cytosolic nonspecific dipeptidase putative succinyl-diaminopimelate desuccinylase-like protein
LBRM2903_180019200	8,06E+06	1,19E+07	1,02E+07	19,14	0.68:1.00:0.85	34303	Mitochondrial carrier protein putative
LBRM2903_320026400	1,34E+08	1,98E+08	1,70E+08	19,17	0.67:1.00:0.86	21661	iron superoxide dismutase putative
LBRM2903_140007600	5,90E+06	8,69E+06	7,93E+06	19,21	0.68:1.00:0.91	20137	hypothetical protein conserved
LBRM2903_350017800	2,73E+07	4,04E+07	3,34E+07	19,45	0.68:1.00:0.83	14571	ribosomal protein L24 putative
LBRM2903_110016300	5,12E+07	7,24E+07	7,46E+07	19,56	0.71:1.00:1.03	58711	eukaryotic release factor 3 putative
LBRM2903_140007000	2,20E+08	3,12E+08	2,32E+08	19,64	0.71:1.00:0.74	22205	Thioredoxin-like putative
LBRM2903_220005800	1,90E+06	1,28E+06	1,55E+06	19,72	1.49:1.00:1.21	84742	transcription factor-like protein
LBRM2903_010008400	9,80E+06	1,41E+07	1,42E+07	19,78	0.70:1.00:1.01	23536	hypothetical protein conserved
LBRM2903_200066000	4,12E+07	6,17E+07	5,50E+07	19,86	0.67:1.00:0.89	39334	1 2-Dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase putative

4.6 Avaliação do perfil de imunoreatividade por *Western blotting* das diferentes preparações em estudo frente ao soro de cães vacinados com LBSap

O perfil de imunoreatividade das diferentes preparações vacinais foi avaliado por meio da técnica de *Western blotting*. A figura 15 mostra o perfil do imunoblotting resultante das diferentes amostras quando submetido à ligação de anticorpos presentes no pool de soro de 7 cães que receberam as três doses da vacina (15 dias após a terceira imunização) em experimento conduzido por Aguiar-Soares em 2010. Pode-se observar que ocorreu preferencialmente reação dos anticorpos com proteínas de baixa massa molecular. Também, é notável a diferença no perfil de resposta entre as cinco amostras analisadas. As preparações contendo saponina na formulação, armazenadas a 37°C e produzidas no ano de 2014 apresentaram menor reatividade frente aos anticorpos presentes no soro dos cães em comparação com as formulações sem saponina obtidas no ano de 2015. As amostras de 2015, as quais diferiram apenas no processo de filtração, não demonstraram diferenças marcantes. No controle negativo do experimento não foi observada nenhuma reação proteína – anticorpo.

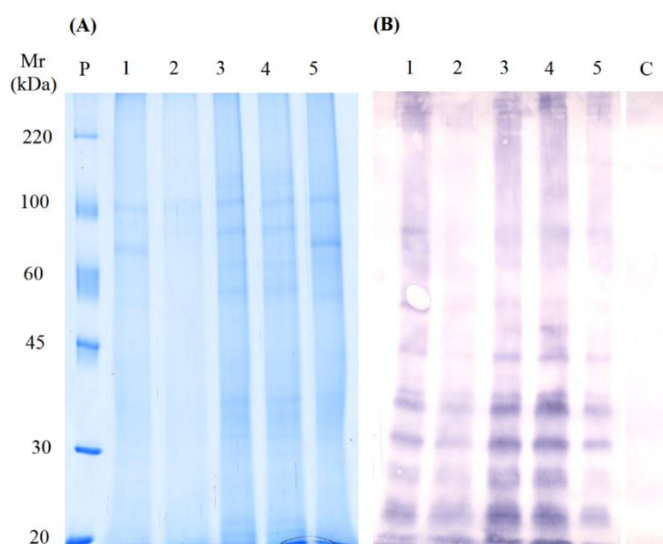


Figura 15: Perfil de reatividade do soro dos cães imunizados (T3) frente as preparações vacinais de LBSap. (A) As cinco preparações vacinais (1= LBSap 4C 1/14, 2 = LBSap 37C 1/14, 3 = AgLB 4C 3/15, AgLB 4C 1/15 Sart, 5 = Lisado) foram separadas por SDS-PAGE 12% e transferidas para membrana de PVDF. (B) Incubação com pool de soro de cães imunizados com 3 doses da vacina (T3). O controle negativo do experimento (C) foi realizado com as cinco amostras, incubando-as com pool de soro dos cães pré-ímmunes (T0).

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de vacinas tem sido estratégia muito incentivada para conter o avanço da leishmaniose visceral canina. Uma vez desenvolvidas, a produção em larga escala exige metodologias que garantam a reprodutibilidade sendo necessário a realização do controle de qualidade dessas vacinas. Atualmente, técnicas de proteômica como eletroforese uni e bidimensional têm sido empregadas trazendo algumas informações sobre o estudo dessas amostras complexas mas mostram-se ineficientes. Proteômica em larga escala é capaz de fornecer dados mais abrangentes quanto à composição total ao empregar ferramentas mais robustas e sensíveis nas análises. Nesse sentido, o trabalho propôs uma metodologia capaz de avaliar variações na composição da preparação vacinal LBSap produzida em escala industrial e submetida a processos como filtração e diferentes temperaturas de armazenamento. Além disso, foi possível avaliar a capacidade extrativa da saponina e sua interferência nos métodos de dosagem de proteínas.

A primeira abordagem consistiu na avaliação da saponina S7900 da marca Sigma utilizada nas preparações vacinais. A possível presença de proteínas vegetais como contaminante poderia levar ao erro de dosagem das proteínas totais nas preparações vacinais em estudo. Para verificar essa possibilidade, uma solução de saponina foi submetida à precipitação de proteínas com ácido trifluoroacético. Os resultados mostraram a presença de um arraste de bandas de baixa intensidade na faixa de 20 a 30 kDa. Tal fato se deve ao método de coloração pela prata ser bastante sensível para detecção de proteínas em baixas concentrações (Miller, Crawford, Gianazza, 2006). Esse perfil de bandas observado não é indicativo de quantidades significativas de proteínas na amostra de saponina S7900 da Sigma. Também foram visualizadas duas bandas de baixa intensidade na altura do padrão de massa molecular equivalente a 66 kDa as quais podem corresponder a um artefato devido ao excesso de DTT presente no tampão de amostra o qual não reagiu devido à baixa concentração de proteínas.

Seguido da avaliação de possíveis contaminantes, determinou-se a concentração de proteínas totais das cinco preparações vacinais em estudo. O método de escolha foi BCA devido à maior sensibilidade do ensaio, os reagentes serem mais estáveis e o cromóforo formado ser altamente específico (Brown *et al.*, 1989). Além disso, a

preparação vacinal LBSap é altamente particulada e os carbonatos presentes nos reagentes do kit BCA poderiam causar uma melhor solubilização das proteínas presentes na preparação, fornecendo maior acurácia nas dosagens. A análise eletroforética mostrou que nas amostras contendo saponina, o perfil de bandas era menor do que nas demais, sendo esperado que tivessem a mesma intensidade. Além disso, as amostras do ano de 2014 apresentaram menor quantidade de proteínas indicando uma possível degradação dessas amostras, o que ainda estava mais pronunciado na amostra que foi armazenada à 37°C. As amostras produzidas no ano de 2015, mesmo com o fator filtração envolvido, apresentaram perfis de bandas bem semelhantes.

Partindo da observação de que a saponina interfere na dosagem de proteínas, testes empregando outros métodos de dosagem foram realizados, sendo eles, BCA, Lowry e Bradford. Trabalhou-se com três tipos de amostras: antígeno puro (1), concentração fixa do antígeno associado a diluições seriadas de saponina (2) e amostra contendo apenas saponina (3). Nenhum método detectou a concentração esperada, além de que, obteve-se variação nos resultados entre os testes o que está associado aos princípios e interferentes de cada método. Lowry é um método muito empregado para determinação protéica em amostras biológicas, mas apresenta alta instabilidade dos reagentes e muitas substâncias como detergentes e sais de tampão interferem na técnica. Em estudo para determinação dos interferentes nos métodos de Lowry e BCA, detectou-se que EDTA em qualquer concentração diminui a absorvância no método de Lowry e apenas a 10 mM não causa efeito na intensidade de cor pelo BCA. EDTA é agente quelante, podendo quelar o cobre presente nos reagentes e causar redução da formação de cor, assim como tampões que podem causar mudança no pH e alterar a determinação das proteínas (Smith, 1985). Nas amostras do ano de 2015, o antígeno vacinal foi ressuspendido em tampão constituído por Tris 50 mM e EDTA 10 mM não sendo indicado a dosagem pelo método de Lowry.

Apesar dessas diferenças entre os métodos, a concentração apenas do antígeno foi determinada em cada teste permitindo avaliar o comportamento das dosagens na presença de saponina em variadas concentrações. Nos testes com BCA e Lowry, as amostras contendo saponina se comportaram da mesma maneira. À medida que se aumenta a concentração de saponina observa-se aumento da absorvância das amostras, superestimando a concentração das proteínas totais. Brown em 1989, observou o mesmo

comportamento ao avaliar a interferência da glicose, mercaptanol e DTT pelo método de BCA. Segundo estudo, essas substâncias provocam aumento da absorbância em 562 nm. Diferentemente, sulfato de amônio e 2-D Pharmalyte® (pH 3-10) suprimiriam o desenvolvimento de cor. A diferença no aumento ou diminuição da intensidade de cor pode estar relacionado com os grupos orgânicos responsáveis pela redução do cobre e ligação ao BCA para formação do cromóforo. Essas substâncias reduziram Cu^{2+} a Cu^+ , logo, o BCA se ligaria a todos os Cu^+ disponíveis resultando no superdesenvolvimento de cor. Uma alternativa para eliminar essas interferências é a precipitação de proteínas com TCA ou deoxicolato antes da reação com BCA (Brown *et al.*, 1989).

Uma das grandes limitações dos métodos de dosagem de proteínas é a presença de lipídeos e detergentes nas amostras. A interferência dos lipídeos no método de Lowry é bem documentado e a dosagem por BCA é mais tolerante a maiores concentrações desses compostos (Smith, 1985). Estudo realizado por Kessler & Fanestil (1986) avaliou a interferência de fosfolipídeos no ensaio de BCA e Lowry. Os resultados indicaram que a presença de quantidades apreciáveis de lipídeos em amostras pode causar um erro significativo na análise da proteína produzindo um pico de absorção semelhante ao produzido pela proteína, encontrando valores erroneamente elevados no ensaio por BCA. Sobre os detergentes, segundo fabricante do *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific), o ensaio é bem tolerante a altas concentrações desses compostos. O ácido desoxicólico e *octyl- β -glucoside* listados na bula como limitantes do método, são aceitos numa concentração de até 5%. Esses dois detergentes apresentam semelhança estrutural com a saponina. Apesar do teste realizado de interferência da saponina nos métodos de dosagem não ter detectado uma concentração mínima dessa interferência, essa semelhança estrutural pode indicar que o método possa suportar alguma concentração desse composto.

Os resultados mostraram que Bradford não é método adequado para essas dosagens. O método é bastante empregado para determinação protéica por se obter resultados dentro de 5 minutos, mas apresenta algumas desvantagens. O ensaio é baseado na formação de um complexo insolúvel entre os resíduos de aminoácidos específicos, arginina, lisina e histidina com o corante *Coomassie brilliant blue G-250* (CBB) A ausência de peptídeos com baixo conteúdo de arginina e/ou compostos aromáticos ao

serem dosados por Bradford influenciam nas determinações por diminuir a interação proteína-corante (Lu *et al.*, 2010). Durante a realização da dosagem do antígeno particulado com saponina, observou-se que havia grande quantidade de partículas. Estudo de Marshall & Williams (1992), mostrou a perda total de rendimento de cor nos respectivos sobrenadantes e filtrados de diversas proteínas (ovoalbumina, hemoglobina, pepsina, α -caseína, dentre outras) dosados após adição do corante CBB. Albumina bovina, pepsina, ovoalbumina também foram dosadas antes e após centrifugação pelos métodos de Lowry, BCA e biureto, não apresentando perda de rendimento de cor do sobrenadante. Isto indica que os complexos formados entre *coomassie brilliant blue* e as proteínas são insolúveis no momento da medição da absorbância. A solubilidade das proteínas no corante CBB pode ditar a variação de resposta do ensaio a diferentes proteínas. Lu *et al.* (2010), sugere que, ao selecionar uma técnica específica para a quantificação da proteína, a composição da proteína-alvo e tampões que foram utilizados na obtenção da amostra devem ser levados em conta.

Sobre a possibilidade de envase do antígeno da preparação vacinal LBSap juntamente com o adjuvante saponina vários estudos apontam que na presença de água as saponinas são altamente instáveis. A fração QS-21 presente nesta espécie de saponina são aciladas e estudos também sugerem que este grupo seja responsável pela intensa indução de resposta Th1 e Th2 (Sun, Xie & Ye, 2009). Entretanto, apresentam alta instabilidade em soluções aquosas levando à sua desacilação. Kensil e colaboradores (1996) verificaram que quando desaciladas, as saponinas não estimularam níveis elevados de anticorpos contra o antígeno experimental albumina de ovo (OVA), nem resposta T citotóxica (Jacobsen, Fairbrother, Kensil, 1996). A análise eletroforética demonstrou a capacidade extrativa da saponina sobre as proteínas de membrana do antígeno particulado. Alguns estudos sugerem que saponina é capaz de intercalar na membrana, criando poros e extraíndo as proteínas, além de que, possui caráter anfipático, atuando como detergente sobre as membranas (Glauert *et al.*, 1962; Hostettmann & Marston, 2005). Esses achados sugerem a impossibilidade do envase único da saponina com o antígeno vacinal em solução.

Numa segunda abordagem, empregou-se a análise proteômica shotgun para análise composicional das cinco preparações vacinais. As amostras foram submetidas a

digestão enzimática em gel e os peptídeos trípticos gerados foram separados e analisados por nanocromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Os espectros de massas obtidos foram analisados pelos *softwares* Raw Meat que revelou a qualidade dessas análises e pelo PEAKS que forneceu a identificação dos peptídeos, sequenciamento das proteínas e quantificação *label free*.

O Raw Meat forneceu cromatograma TIC que revelou a uniformidade do perfil composicional das amostras que juntamente com resultados da correlação de Pearson nas réplicas técnicas e entre amostras indicaram a boa reprodutibilidade das análises. O programa ainda gerou análise da quantidade de íons durante todo gradiente, classificando-os graficamente como TOP N. A análise revelou a grande complexidade das amostras mostrando que o equipamento operou majoritariamente realizando análise dos 12 íons mais abundantes (TOP 12) nas amostras.

No total, 1.654 proteínas foram identificadas pelo sequenciamento *de novo* e comparação com banco de *L. braziliensis* realizado pelo *software* PEAKS o que representa a cobertura de 20% do proteoma de *L. braziliensis* composto por 8.274 genes (Dumonteil, 2009). Com a análise *label free* foram identificadas 1.425 proteínas comuns às cinco preparações vacinais gerando o *Heat map* que permitiu a análise composicional e sua variação. Analisando o comportamento geral das proteínas no *Heat map*, as proteínas identificadas nas amostras LBSap 37°C L1/14 e LBSap 1/14 4°C apresentaram menor abundância quando comparada com as amostras AgLB 1/15 4°C Sart e AgLB 3/15 4°C. Após sequenciamento *de novo* os dados de PSM (*peptide spectrum match*) de cada amostra serviram para informar sobre conservação da amostra. A preparação vacinal armazenada à 37°C apresentou menor número de identidades com relação às demais amostras sugerindo uma degradação associada à temperatura de armazenamento. A análise de *Western blotting* também demonstrou essa degradação. Após revelação com anticorpo secundário observou-se que as amostras produzidas no ano de 2014 apresentaram menor reatividade. Apesar da baixa reatividade, todas as amostras apresentaram um perfil de imunoreatividade semelhante. Esse resultado demonstrou que mesmo preparações sabidamente apresentando alto grau de degradação ainda podem conter quantidades significativas de proteínas imunogênicas capazes de serem reconhecidas por anticorpos. Além disso, como o número de bandas imunoreativas é

bastante limitado frente à complexidade molecular da preparação torna-se bastante complicado prever sobre a capacidade de conferir proteção de determinada preparação vacinal baseando-se exclusivamente no perfil de *immunoblotting*. Partindo da necessidade de se obter informações mais precisas sobre a composição dessas preparações vacinais, apenas uma análise por *Western blotting* juntamente com resultados de perfil eletroforético não se mostram adequados para realização do controle de qualidade de amostras complexas e validação de lotes industriais. A análise de proteômica em larga escala, empregando uma abordagem do tipo *shotgun* forneceu dados composicionais importantes quanto à presença de proteínas alvos que sofrem grande ou pouca variação na intensidade e que poderiam servir como controle dos lotes produzidos e avaliação da influência de diferentes tratamentos industriais.

A análise das amostras AgLB L1/15 4°C SART e AgLB L3/15 4°C permitiu avaliar a influência da filtração em membrana 0,22 µm, de interesse no processo de esterilização terminal do produto. O perfil eletroforético unidimensional e quantificação *label free* demonstraram a grande similaridade entre as proteínas identificadas. Após aplicar os filtros para as 1.063 proteínas submetidas a quantificação *label free*, considerando $p < 0,01$, obteve-se apenas 2 proteínas com diferença significativa na abundância, sendo elas, *Start domain containing protein, putative* e *hypothetical protein*. Essas proteínas estão envolvidas nos processos metabólicos e de manutenção celular estando em grandes quantidades na célula não sendo indicativo de que essa diferença observada possa impactar de maneira significativa no desencadeamento da resposta imune provocada pela vacina. Várias proteínas estão sendo estudadas por apresentar grande potencial para desencadear a resposta imune. Além dos antígenos de superfície, como GP63, pode-se citar grupos de proteínas como a proteína induzível pelo estresse 1, família das HSP, histonas, *kinesin*, proteínas ribossomais, entre outras (Dumonteil, 2009).

E por último, a análise da variância permitiu identificar um conjunto de proteínas comuns às amostras LBSap 1/14 4C, AgLB 1/15 4C Sart e AgLB 3/15 das quais 167 proteínas apresentaram variação menor que 20%, sugerindo que estas seriam um grupo mínimo de proteínas que devem constar nos lotes produzidos. Segundo recomendações da FDA (Food and Drug Administration), Geyer, *et al*, (2016) propôs uma análise do perfil proteômico do plasma sanguíneo empregando como aceitável a variação de

proteínas como sendo inferiores a 20% para ensaios validação analítica. Em outro estudo, foi possível determinar, através da técnica MALDI-TOF-MS, 16 peptídeos em amostras de leite para avaliar o impacto dos processos de aquecimento e estocagem sobre a composição dessas amostras. Observou-se que o aumento de temperatura altera significativamente a quantificação relativa de alguns peptídeos como *β-casein* provocando aumento de intensidade. A estocagem demonstrou uma relevante atividade proteolítica das enzimas levando à degradação da amostra (Ebner, Baum, & Pischetsrieder, 2016). Dessa forma, o estudo aqui desenvolvido mostra-se bastante promissor para análise das preparações vacinais podendo-se determinar um grupo de proteínas que serviriam como controle das formulações auxiliando na validação do processo de fabricação industrial dessas preparações vacinais.

6. CONCLUSÃO

- O trabalho conseguiu propor uma metodologia shotgun capaz de avaliar o proteoma total de uma amostra altamente complexa composta por lisado de *L. brasiliensis* produzido laboratorial e industrialmente, apontando variações que podem comprometer a composição dessas preparações.
- O processo de filtração terminal do produto não influenciou de modo significativo nas preparações vacinais em estudo.
- A temperatura de armazenamento a 37°C levou à degradação de proteínas reduzindo o número de identidades o que pode ser confirmado pelas análises *label-free* e *Western blotting*.
- O envase do antígeno vacinal juntamente com a saponina poderia reduzir custos de fabricação da vacina, mas é inviável. O estudo demonstrou que a saponina possui capacidade extrativa sobre as proteínas de membrana e, segundo a literatura, as saponinas tornam-se desaciladas e instáveis quando em meio aquoso.
- O método de BCA mostrou-se mais eficiente para quantificação das proteínas totais frente ao ensaio de Lowry, suportando maior variação de interferentes e se mostrando mais estável. O método de Bradford não apresentou leitura de absorbância das proteínas não sendo indicado para análise dessas preparações vacinais.
- Através da análise *label-free* foi possível determinar um grupo mínimo de proteínas com variação menor que 20% que poderia servir como controle da produção em larga escala.

7. PERSPECTIVAS

- Baseado na análise de variância das proteínas, realizar seleção de proteínas alvos para análise do tipo *target* dentro do grupo de proteínas que apresentam CV menor ou igual a 20% para servir como controle da produção em larga escala.

- Realizar estudo detalhado de cinética de degradação da preparação vacinal.

8. REFERÊNCIAS

Ahmad, S & Ashfaq, A. (2011). Detection of microbial contamination in foods with advanced techniques. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*, 13, 263-266.

Alexander, J., & Bryson, K. (2005). T helper (h) 1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. *Immunology letters*, 99(1), 17-23.

Alvar, J., Croft, S. L., Kaye, P., Khamesipour, A., Sundar, S., & Reed, S. G. (2013). Case study for a vaccine against leishmaniasis. *Vaccine*, 31, B244-B249.

Balandrin, M. F. (1996). Commercial utilization of plant-derived saponins: an overview of medicinal, pharmaceutical, and industrial applications. In *Saponins used in traditional and modern medicine* (pp. 1-14). Springer US.

Beranova-Giorgianni, S. (2003). Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(5), 273-281.

Blum, H., Beier, H., & Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *electrophoresis*, 8(2), 93-99.

Bomford, R., Stapleton, M., Winsor, S., Beesley, J. E., Jessup, E. A., Price, K. R., & Fenwick, G. R. (1992). Adjuvanticity and ISCOM formation by structurally diverse saponins. *Vaccine*, 10(9), 572-577.

Borja-Cabrera, G. P., Pontes, N. C., Da Silva, V. O., De Souza, E. P., Santos, W. R., Gomes, E. M., ... & de Sousa, C. P. (2002). Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). *Vaccine*, 20(27), 3277-3284.

Brown, R. E., Jarvis, K. L., & Hyland, K. J. (1989). Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Analytical biochemistry*,

180(1), 136-139.

Campbell, J. B., & Peerbaye, Y. A. (1992). Saponin. *Research in immunology*, 143(5), 526-530.

Cantacessi, C., Dantas-Torres, F., Nolan, M. J., & Otranto, D. (2015). The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. *Trends in parasitology*, 31(3), 100-108.

Cheeke, P. R. (2000). Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. In *Saponins in food, feedstuffs and medicinal plants* (pp. 241-254). Springer Netherlands.

Cox, J. C., & Coulter, A. R. (1997). Adjuvants—a classification and review of their modes of action. *Vaccine*, 15(3), 248-256.

Cozzolino, R., Passalacqua, S., Salemi, S., Malvagna, P., Spina, E., & Garozzo, D. (2001). Identification of adulteration in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry*, 36(9), 1031-1037.

da Silva, V. O., Borja-Cabrera, G. P., Pontes, N. N. C., de Souza, E. P., Luz, K. G., Palatnik, M., & de Sousa, C. B. P. (2000). A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto, RN). *Vaccine*, 19(9), 1082-1092.

Dalsgaard, K., Jensen, M. H., & Sorensen, K. J. (1976). Saponin adjuvants. IV. Evaluation of the adjuvant quil A in the vaccination of cattle against foot-and-mouth disease. *Acta veterinaria Scandinavica*, 18(3), 349-360.

Dalsgaard, K. (1978). A study of the isolation and characterization of the saponin quil A: evaluation of its adjuvant activity, with a special reference to the application in the vaccination of cattle against foot-and-mouth disease. *Acta Veterinaria Scandinavica. Supplementum* (Denmark). no. 69.

De Jesus, J. B., Mesquita-Rodrigues, C., & Cuervo, P. (2014). Proteomics advances in the study of Leishmania parasites and leishmaniasis. In *Proteins and proteomics of Leishmania and Trypanosoma* (pp. 323-349). Springer Netherlands.

De Oliveira, Aguiar-Soares, R.D. (2014). Ensaio clínico vacinal de fase I e II para avaliação comparativa da toxicidade, imunogenicidade e potência das vacinas Leishmune®, Leish-Tec®, KMP-11 e LBSap contra leishmaniose visceral canina. (Tese de doutorado em Ciências Biológicas). Ouro Preto: Instituto de Ciências Biológicas / Núcleo de Pesquisa em Ciência Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, 139p.

Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 27(5), 305-318.

Dumonteil, E. (2009). Vaccine development against Trypanosoma cruzi and Leishmania species in the post-genomic era. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(6), 1075-1082.

Ebner, J., Baum, F., & Pischetsrieder, M. (2016). Identification of sixteen peptides reflecting heat and/or storage induced processes by profiling of commercial milk samples. *Journal of proteomics*, 147, 66-75.

Fernandes, A. P., Costa, M. M. S., Coelho, E. A. F., Michalick, M. S. M., de Freitas, E., Melo, M. N., ... & Gazzinelli, R. T. (2008). Protective immunity against challenge with Leishmania (Leishmania) chagasi in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine*, 26(46), 5888-5895.

Fraga, J., Montalvo, A. M., De Doncker, S., Dujardin, J. C., & Van der Auwera, G. (2010). Phylogeny of Leishmania species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(2), 238-245.

Fleck, J.D. Constituição química, avaliação da atividade imunoadjuvante e estudos de propagação de Quillaja brasiliensis. 2007 Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2007.

Foroughi-Parvar, F., & Hatam, G. (2014). Vaccines for canine leishmaniasis. *Advances in preventive medicine*, 2014.

Garrido, B. C., Souza, G. H., Lourenço, D. C., & Fasciotti, M. (2016). Proteomics in quality control: Whey protein-based supplements. *Journal of proteomics*, 147, 48-55.

Geyer, P. E., Kulak, N. A., Pichler, G., Holdt, L. M., Teupser, D., & Mann, M. (2016). Plasma proteome profiling to assess human health and disease. *Cell systems*, 2(3), 185-195.

Glauert, A. M., Dingle, J. T., & Lucy, J. A. (1962). Action of saponin on biological cell membranes. *Nature*, 196(4858), 953-955.

Giunchetti, R. C. (2007). Avaliação da imunogenicidade de dois novos imunobiológicos candidatos a vacina contra leishmaniose visceral canina. (Tese de Doutorado em Ciências Biológicas). Ouro Preto: Instituto de Ciências Biológicas / Núcleo de Pesquisa em Ciência Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, 203p.

Giunchetti, R. C., Corrêa-Oliveira, R., Martins-Filho, O. A., Teixeira-Carvalho, A., Roatt, B. M., de Oliveira Aguiar-Soares, R. D., ... & de Lana, M. (2007). Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. *Vaccine*, 25(44), 7674-7686.

Gour, J. K., Kumar, V., Singh, N., Bajpai, S., Pandey, H. P., & Singh, R. K. (2012). Identification of Th1-responsive leishmanial excretory–secretory antigens (LESAs). *Experimental parasitology*, 132(3), 355-361.

Gutiérrez, J. M., Lomonte, B., León, G., Alape-Girón, A., Flores-Díaz, M., Sanz, L., & Calvete, J. J. (2009). Snake venomomics and antivenomics: proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *Journal of proteomics*, 72(2), 165-182.

Heberle, H.; Meirelles, G. V.; da Silva, F. R.; Telles, G. P.; Minghim, R. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics* 16:169 (2015).

Hostettmann, K., & Marston, A. (2005). Saponins. Cambridge University Press.

Issaq, H. J., & Veenstra, T. D. (2008). Two-dimensional polyacrylamide gel

electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives. *Biotechniques*, 44(5), 697.

Jacobsen, N. E., Fairbrother, W. J., Kensil, C. R., Lim, A., Wheeler, D. A., & Powell, M. F. (1996). Structure of the saponin adjuvant QS-21 and its base-catalyzed isomerization product by ¹H and natural abundance ¹³C NMR spectroscopy. *Carbohydrate research*, 280(1), 1-14.

Jain, K., & Jain, N. K. (2013). Novel therapeutic strategies for treatment of visceral leishmaniasis. *Drug Discovery Today*, 18(23), 1272-1281.

Jain, K., & Jain, N. K. (2015). Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. *Journal of immunological methods*, 422, 1-12.

Johnson, I. T., Gee, J. M., Price, K., Curl, C., & Fenwick, G. R. (1986). Influence of saponins on gut permeability and active nutrient transport in vitro. *The Journal of nutrition*, 116(11), 2270-2277.

Kaye, P., & Scott, P. (2011). Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, 9(8), 604-615.

Kensil, C. R. (1996). Saponins as vaccine adjuvants. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 13(1-2), 1-55.

Kessler, R. J., & Fanestil, D. D. (1986). Interference by lipids in the determination of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 159(1), 138-142.

Khamesipour, A., Rafati, S., Davoudi, N., Maboudi, F., & Modabber, F. (2006). Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. *Indian Journal of Medical Research*, 123(3), 423.

Kumar, R., & Engwerda, C. (2014). Vaccines to prevent leishmaniasis. *Clinical & Translational Immunology*, 3(3), 13.

Lainson, R., Shaw, J.J. (1987). Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, Killick – Dendrick. *The leishmaniasis in biology and medicine*; London, Academic Press, 1:1-20.

Lu, T.-S., Yiao, S.-Y., Lim, K., Jensen, R. V., & Hsiao, L.-L. (2010). Interpretation of biological and mechanical variations between the Lowry versus Bradford method for protein quantification. *North American Journal of Medical Sciences*, 2(7), 325–328. <http://doi.org/10.4297/najms.2010.2325>

Marshall, T., & Williams, K. M. (1992). Coomassie blue protein dye-binding assays measure formation of an insoluble protein-dye complex. *Analytical biochemistry*, 204(1), 107-109.

Miller, I., Crawford, J., & Gianazza, E. (2006). Protein stains for proteomic applications: which, when, why?. *Proteomics*, 6(20), 5385-5408.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2016). NOTA TÉCNICA N° 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA. Site: <http://www.sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2016/09/nota-tecnica.pdf>

Ministério da Saúde (2008) Portaria Interministerial nº 1.426/2008, Brasília. Site: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri1426_11_07_2008.html

Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San-Andres, M., Gonzalez, F., Castillo, J. A., ... & Alvar, J. (1994). Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(4), 491-493.

Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R., & Saravia, N. G. (2005). Advances in leishmaniasis. *The Lancet*, 366(9496), 1561-1577.

O'Hagan, D. T., & Valiante, N. M. (2003). Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(9), 727-735.

Oliveira, R., Bethony, J., ... & Nascimento, E. (2008). Antigenicity of a whole parasite vaccine as promising candidate against canine leishmaniasis. *Research in veterinary science*, 85(1), 106-112.

Ortea, I., O'Connor, G., & Maquet, A. (2016). Review on proteomics for food

authentication. *Journal of proteomics*, 147, 212-225.

Osman, O. F., Kager, P. A., & Oskam, L. (2000). Leishmaniasis in the Sudan: a literature review with emphasis on clinical aspects. *Tropical Medicine & International Health*, 5(8), 553-562.

Palatnik-de-Sousa, C. B., dos Santos, W. R., Franca-Silva, J. C., da Costa, R. T., Reis, A. B., Palatnik, M., ... & Genaro, O. (2001). Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 65(5), 510-517.

Rajput, Z. I., Hu, S. H., Xiao, C. W., & Arijo, A. G. (2007). Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. *Journal of Zhejiang University Science B*, 8(3), 153-161.

Ramos, I., Alonso, A., Marcen, J. M., Peris, A., Castillo, J. A., Colmenares, M., & Larraga, V. (2008). Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response. *Vaccine*, 26(3), 333-344.

Reithinger, R., Dujardin, J. C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., & Brooker, S. (2007). Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet infectious diseases*, 7(9), 581-596.

Resende, L. A., Roatt, B. M., de Oliveira Aguiar-Soares, R. D., Viana, K. F., Mendonca, L. Z., Lanna, M. F., ... & Carneiro, C. M. (2013). Cytokine and nitric oxide patterns in dogs immunized with LBSap vaccine, before and after experimental challenge with *Leishmania chagasi* plus saliva of *Lutzomyia longipalpis*. *Veterinary parasitology*, 198(3), 371-381.

Rešetar, D., Marchetti-Deschmann, M., Allmaier, G., Katalinić, J. P., & Pavelić, S. K. (2016). Matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry linear time-of-flight method for white wine fingerprinting and classification. *Food Control*, 64, 157-164.

Roatt, B. M. (2010). Imunogenicidade e eficácia da vacina LBSap em cães após desafio intradérmico com *Leishmania chagasi* e extrato de glândula salivar de *Lutzomyia*

longipalpis. (Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas). Ouro Preto: Instituto de Ciências Biológicas / Núcleo de Pesquisa em Ciência Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, 114p.

Roatt, B. M., de Oliveira Aguiar-Soares, R. D., Vitoriano-Souza, J., Coura-Vital, W., Braga, S. L., Corrêa-Oliveira, R., ... & Marques, M. J. (2012). Performance of LBSap vaccine after intradermal challenge with *L. infantum* and saliva of *Lu. longipalpis*: immunogenicity and parasitological evaluation. *PLoS One*, 7(11), e49780.

Rodríguez-Cortés, A., Ojeda, A., López-Fuertes, L., Timón, M., Altet, L., Solano-Gallego, L., & Alberola, J. (2007). Vaccination with plasmid DNA encoding KMPII, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. *Vaccine*, 25(46), 7962-7971.

Ross, R. (1903). Further notes on Leishman's bodies. *British medical journal*, 2(2239), 1401.

Singh, M., & T O'Hagan, D. (2003). Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *International journal for parasitology*, 33(5), 469-478.

Soares, M. (2012). Análise proteômica do secretoma de *Leishmania infantum* e ensaios preliminares para a descoberta de biomarcadores da Leishmaniose Visceral Canina. (Dissertação de Mestrado em Biotecnologia). Ouro Preto: Programa de Pós Graduação em Biotecnologia do Núcleo de Pesquisa em Ciência Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, 101p.

Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., ... & Baneth, G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary parasitology*, 165(1), 1-18.

Solbach, W., & Laskay, T. (1999). The host response to *Leishmania* infection. *Advances in immunology*, 74, 275-317.

Stebut, E. V. (2015). Leishmaniasis. *Journal of the German Society of Dermatology*, 13, 191–201.

Sun, H. X., Xie, Y., & Ye, Y. P. (2009). Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine*, 27(12), 1787-1796.

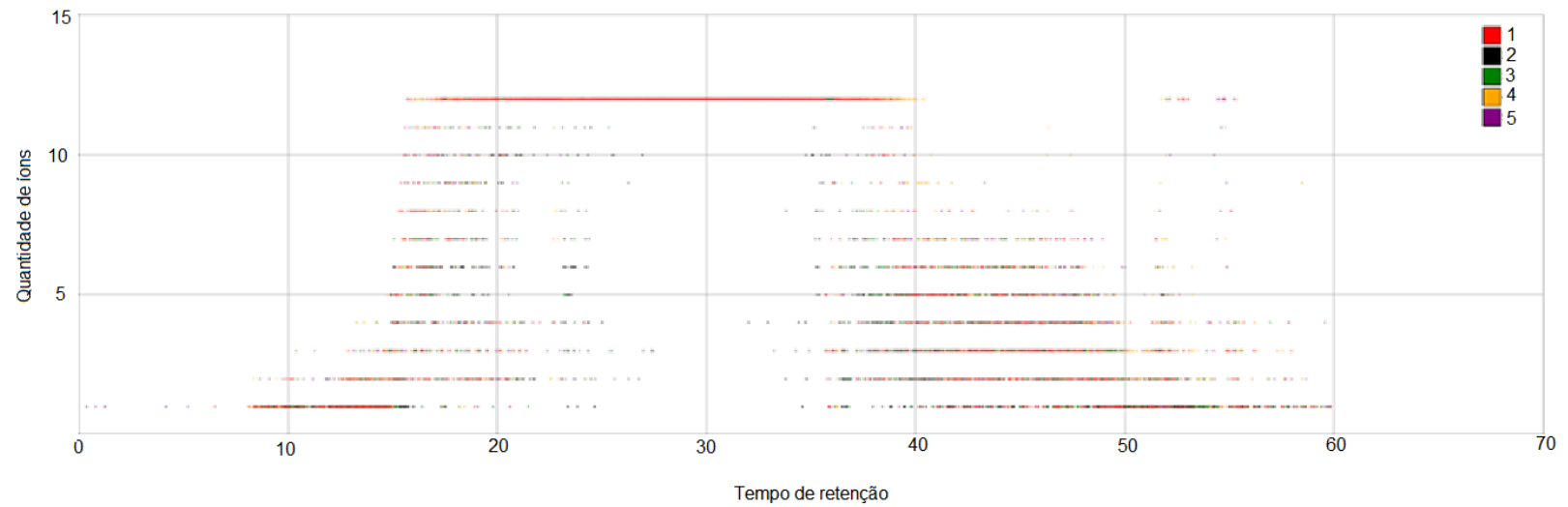
Tani, C., Stella, M., Donnarumma, D., Biagini, M., Parente, P., Vadi, A., ... & Norais, N. (2014). Quantification by LC–MS E of outer membrane vesicle proteins of the Bexsero® vaccine. *Vaccine*, 32(11), 1273-1279.

Wilkins, M. R., Pasquali, C., Appel, R. D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J. C., & Williams, K. L. (1996). From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Nature Biotechnology*, 14(1), 61-65.

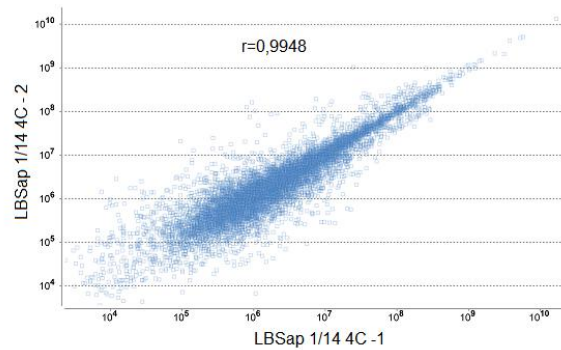
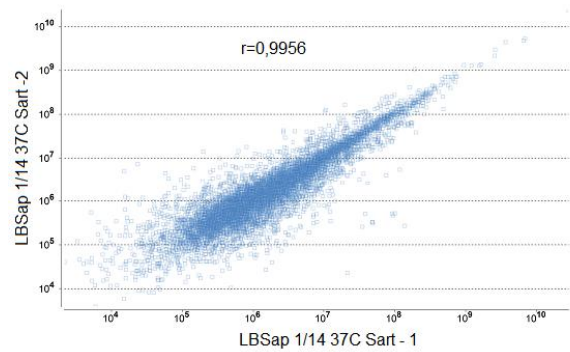
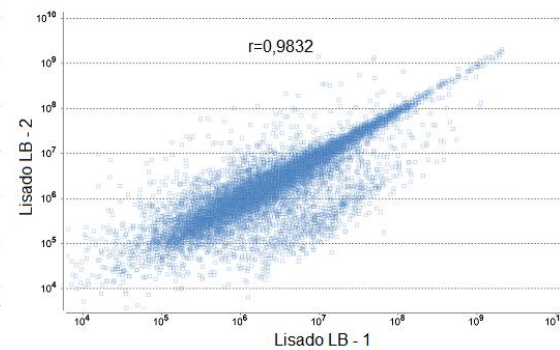
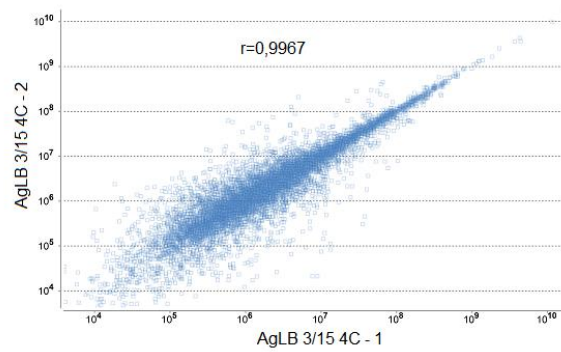
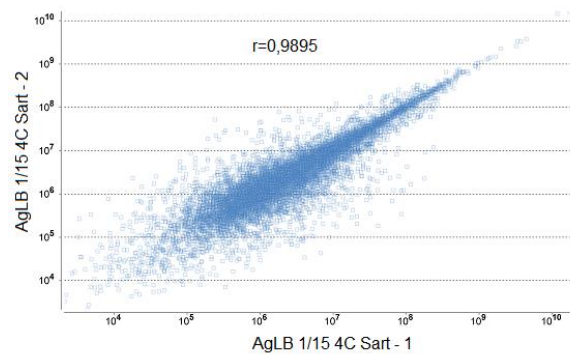
ANEXOS

9. ANEXOS

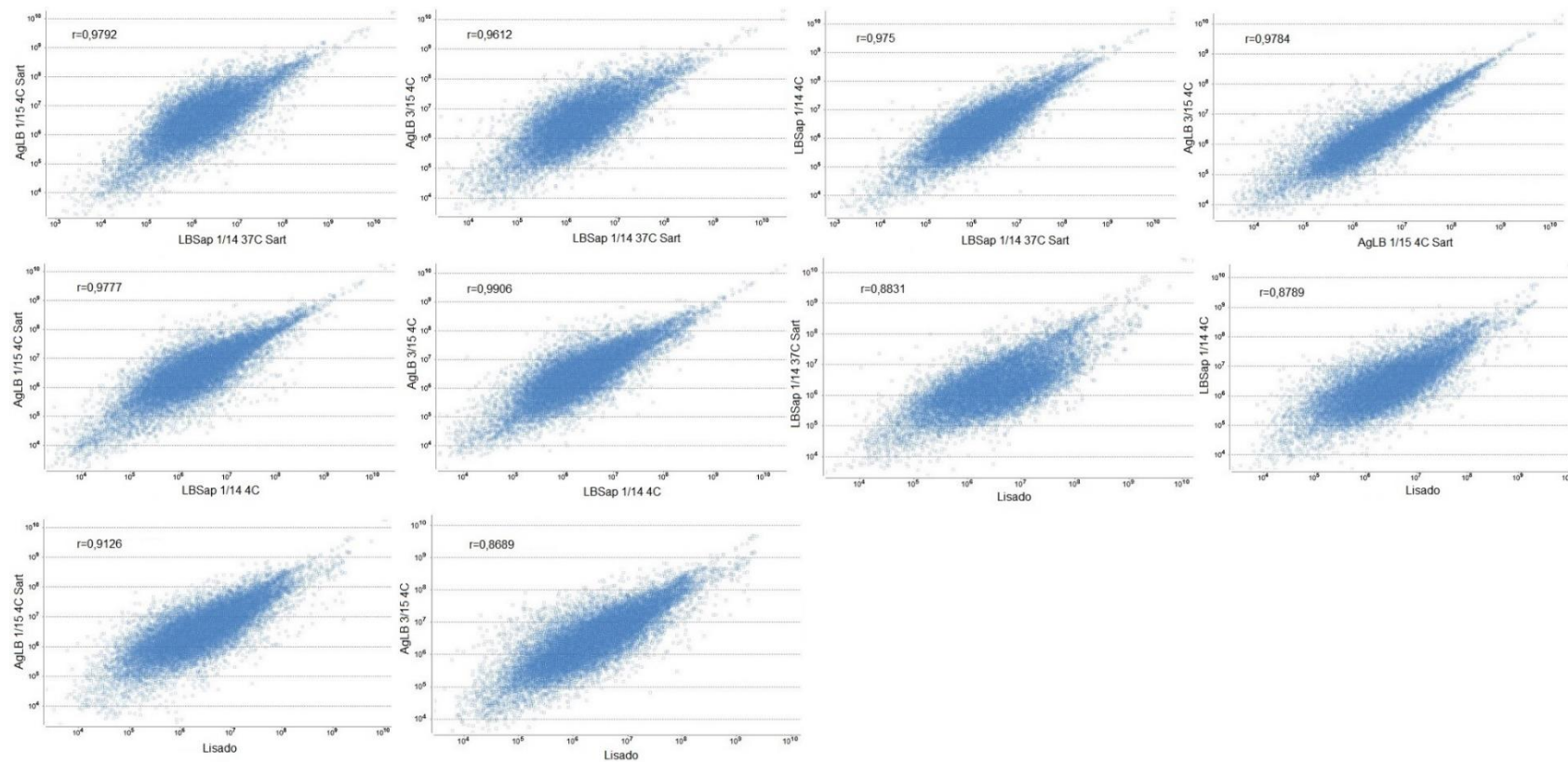
Anexo I: Gráfico TOP N representando da quantidade de íons analisados durante todo gradiente realizado. No intervalo de 20 a 40 minutos, o equipamento operou realizando majoritariamente a análise de 12 íons mais abundantes (TOP 12), indicando a complexidade das amostras.



Anexo II: Correlação entre réplicas técnicas.



Anexo III: Correlação de Pearson entre as cinco preparações vacinais.



Anexo IV: *Heat map* das 1.425 proteínas identificadas entre as cinco preparações vacinais. (Alaranjado = Lisado; azul = LBSap 1/14 37C Sart; amarelo: LBSap 1/14 4C; rosa: AgLB 1/15 4C Sart; verde: AgLB 3/15)

