

REATIVIDADE DE SOROS CANINOS A PROTEÍNAS RECOMBINANTES HIS₆-GP63 E HIS₆-LACK DE *Leishmania chagasi*.

¹Pereira, D., ¹Silva, A. C., ²Medina-Acosta, E., ¹Mittmann, J.

¹Laboratório de Biologia Molecular/ IP&D- UNIVAP; Av. Shishima Hifumi, 2911, São José dos Campos/SP - Brasil. E-mail: ddavipereira@yahoo.com.br

²Laboratório de Biotecnologia/ CBB- UENF; Av. Alberto Lamêgo, 2000, Campos dos Goytacases/RJ- Brasil E-mail: quique@uenf.br

Resumo- Cães domésticos são importantes reservatórios de parasitas do gênero *Leishmania* causador de lesões viscerais e tegumentares em hospedeiros vertebrados. O diagnóstico sorológico eficiente é um aspecto importante tanto em formas humanas de leishmaniose como em caninas, a fim de se obter um plano de controle epidemiológico e reconhecer casos certamente positivos. A tecnologia do DNA recombinante associada à caracterização de antígenos de *Leishmania* permitiu o desenvolvimento de imunoenaios mais sensíveis e específicos para detecção da doença. Este estudo objetivou avaliar a utilização das proteínas recombinantes His₆-GP63 e His₆-LACK como antígenos potenciais no diagnóstico da leishmaniose canina. Foram realizados ELISAs de trinta soros caninos provenientes do município de Campos dos Goytacases/RJ. Destes, dois soros apresentaram alta reatividade às duas proteínas recombinantes, sugerindo prévio contato dos cães com os antígenos.

Palavras-chave: leishmaniose canina, GP63, LACK, diagnóstico, ELISA.

Área do conhecimento: Ciências Biológicas.

Introdução.

A leishmaniose é uma doença zoonótica causada por protozoários digenéticos do gênero *Leishmania*, transmitidos por insetos vetores da subfamília Phlebotominae. A doença é caracterizada por lesões cutâneas ou viscerais e atinge cerca de dois milhões de pessoas por ano em todo o mundo, fato este que fez a Organização Mundial de Saúde apontar a leishmaniose como uma das principais doenças tropicais (<http://www.opas.org.br/>, último acesso em 26/07/2007).

Cães domésticos vêm assumindo um importante papel como elos de transmissão da doença em humanos por serem reservatórios potenciais para parasitas do gênero *Leishmania*, sendo este fato agravado pela crescente urbanização que modifica o ambiente alterando a exposição do homem e do cão ao parasita (GOMES; NEVES, 1998, MONTEIRO; SILVA; COSTA, 2005).

O controle da leishmaniose depende além do controle do vetor, de métodos eficientes de diagnóstico tanto no hospedeiro humano como nos seus reservatórios. Para tanto é necessário que métodos eficientes e de baixo custo sejam desenvolvidos. A produção de antígenos específicos através da tecnologia do DNA recombinante, que possam ser usados no diagnóstico rápido e seguro da leishmaniose, podem contribuir para a implementação de políticas públicas de controle de cães efetivamente infectados evitando mortes desnecessárias de

cães falso-positivos (ROCHA *et al.* 2002, IKONOMOPOULOS *et al.*, 2003).

As proteínas GP63 e LACK são proteínas expressas em todos os estágios de desenvolvimento em *Leishmania*, envolvidos na virulência e resistência do parasita em hospedeiros mamíferos. Evidências experimentais demonstram que as proteínas de superfície GP63 e LACK são boas candidatas para utilização em diagnóstico e com potencial para a produção de vacinas contra leishmaniose (MEDINA-ACOSTA *et al.*, 1989, RAMIRO, *et al.*, 2003).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a reatividade de soros de cães às proteínas recombinantes His₆-GP63 e LACK, expressas em *Escherichia coli*.

Material e métodos.

A reatividade dos soros foi testada por ELISA utilizando proteínas recombinantes denominadas His₆-GP63 e His₆-LACK, produzidas em sistema heterólogo de expressão (MOURA; MITTMANN; MEDINA ACOSTA. 2001). As proteínas foram cedidas pelo Dr^o Enrique Medina Acosta do Laboratório de Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, foi utilizado o método de ELISA.

Os 30 soros caninos testados foram coletados e cedidos pela Vigilância Epidemiológica de Campos dos Goytacases/RJ em área de ocorrência de caso autóctone de leishmaniose tegumentar americana.

Microplacas de 96 poços foram sensibilizadas com 2 ng/poço das proteínas recombinantes His₆-

GP63 e His₆-LACK, diluídas em tampão carbonato 50 mM, pH 9.6. As placas foram incubadas à 4°C por 16 horas.

Após este período, os micropoços foram lavados duas vezes com solução de lavagem contendo 0,15M NaCl e Tween 20 0,05% e os sítios livres bloqueados com 1% de leite desnatado diluído em 1x PBS Tween 20 0,05% durante 1 hora à 37°C. Os poços foram novamente lavados por duas vezes incubados por 2 horas à 37°C contendo 100 µL/poço de soros caninos diluídos em leite desnatado 0,2% preparado em PBS 1X Tween 20 0,05% em duplicada em diluição seriada na base 2 iniciada em 1:10.

Os poços foram, então, novamente lavados duas vezes e incubados por 1 hora a 37°C com 100 µL/poço do anticorpo secundário anti-IgG de cachorro conjugado a peroxidase (Sigma) na diluição de 1:10.000, preparados em PBS 1X Tween 20 0,05% contendo leite desnatado a 0,2%. Após a incubação os micropoços foram lavados 4 vezes com a mesma solução descrita acima e incubados por 30 minutos, em ambiente escuro, com 100µL de tampão citrato 0,1 M, pH 5,0, contendo o cromógeno ABTS na concentração de 0,4 mg/mL mais o substrato H₂O₂ para a enzima peroxidase. A absorbância de cada poço foi averiguada em espectrofotômetro (Espectra Count™, Packard) a 405 nm.

Como controles positivos da reação foram utilizados anticorpos policlonais produzidos em coelhos contra His₆-GP63 e His₆-LACK (MITTMAN, 2004), também cedidos pelo Drº. Enrique Medina Acosta. O anticorpo secundário utilizado foi proteína A conjugada a peroxidase (Sigma) diluída 1:15.000.

Os resultados foram plotados em gráficos e realizado teste *t* (*p* = 0,05%) para comparação das médias dos soros caninos reativos às proteínas aos demais soros.

Resultados

Os soros foram testados em diluição seriada, de 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560, 1:5120 e 1:10240.

Os resultados obtidos na titulação dos soros são para apresentados nas figuras 1 para a proteína His₆-GP63 e na figura 2 para His₆-LACK. Os gráficos indicam média da absorbância dos trinta soros testados para cada uma das diluições testadas, sendo que foi possível identificar dois soros (3 e 11) que tiveram respostas diferentes, com valores de absorbância elevados em relação aos demais soros para ambos antígenos, indicando maior reatividade dos mesmos as duas proteínas de *Leishmania* spp diferentes.

O teste *t* demonstrou com 95 % de confiabilidade que há diferença significativa entre as médias dos soros 3 e 11 com a média dos

demais soros caninos, indicando portanto uma maior reatividade dos soros caninos 3 e 11 com as proteínas recombinantes His₆-GP63, e His₆-LACK. Cabe ressaltar ainda que os ensaios foram realizados de forma independente.

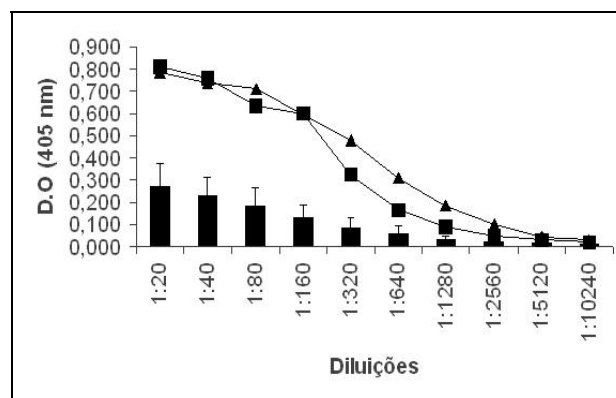


Figura 1: Gráfico de comparação da médias dos soros caninos (■) com os soros caninos 3 (■) e 11 (▲).

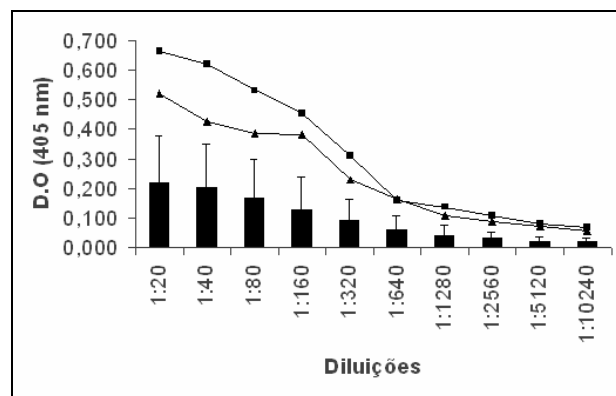


Figura 2: Gráfico de comparação das médias dos soros caninos (■) em relação aos soros 3 (■) e 11 (▲).

Discussão

Vários antígenos de *Leishmania* vêm sendo geneticamente e antigenicamente caracterizados. A tecnologia do DNA recombinante vem sendo utilizada no desenvolvimento e aprimoramento de imunoenaios baseados em novos antígenos, para o diagnóstico sorológico de infecções ativas, atividades subclínicas, e casos assintomáticos de leishmaniose (BOARINO, *et al.*, 2005). Além das proteínas GP63 e LACK, outras proteínas têm sido alvo de pesquisas em relação a diagnósticos de leishmanioses, como a K39 e LDP23. Muitos destes antígenos empregam o uso de uma proteína recombinante ou subunidades protéicas.

A demonstração da presença do parasito é a prova definitiva para o diagnóstico de leishmaniose, entretanto o mesmo é realizado através de biópsia de baço, fígado e linfonodos onde se obtém aspirados para realização do

diagnóstico. Além de ser um método invasivo, não apresenta alta sensibilidade, já que os parasitas não se apresentam de forma homogênea no tecido. Devido a esta dificuldade na detecção direta do parasita e elevada proporção de casos assintomáticos da doença, métodos sorológicos são essenciais para o diagnóstico de infecções como a leishmaniose. Diagnósticos moleculares como o PCR, apresentam alta sensibilidade e especificidade na detecção de parasitas, contudo, seu alto custo e necessidade de pessoal qualificado para realização do teste, limitam a utilização desta técnica na rotina em laboratórios.

A utilização de proteínas recombinantes no diagnóstico por ELISA tem mostrado maior especificidade e sensibilidade em relação a outros imunoenaios, como o IFI, além da possibilidade de aplicação em larga escala em inquéritos sorológicos epidemiológicos (BOARINO, *et al.*, 2005, IKONOMOPOULOS *et al.*, 2003).

Dos soros analisados e de acordo com o teste t e pelo valor de absorvâncias obtidas, foi possível demonstrar que nos soros caninos 3 e 11 existem anticorpos capazes de reconhecer as proteínas recombinantes His₆-GP63 e His₆-LACK. Esta reação é de alta especificidade por tratarem-se de proteínas recombinantes e apesar de não dispormos de dados clínicos sobre os indivíduos, estas amostras foram reativas para antígenos específicos de *Leishmania*. Levando em consideração que estes soros foram coletados no local de ocorrência de caso autóctone de leishmaniose tegumentar americana, nos permite sugerir contato prévio dos cães com estas proteínas, provavelmente com parasitos do gênero *Leishmania*.

Novos estudos são necessários a fim de avaliar o potencial uso destas proteínas para diagnóstico, analisando soros de regiões endêmicas e indenes para leishmaniose canina, comparando também a sensibilidade e especificidade do teste ELISA com outros imunoenaios.

O diagnóstico da leishmaniose envolvendo proteínas recombinantes vem se mostrando eficaz, com aumento da especificidade sem perda de sensibilidade, onde apenas anticorpos específicos àquela proteína serão capturados no teste, diminuindo as chances de ocorrerem reações cruzadas quando da utilização de antígenos totais (ANDRADE; MOURA; ANDRADE, 1993; BOARINO *et al.* 2005).

Os estudos em andamento para a elucidação dos mecanismos da resposta imune em cães em relação à leishmaniose canina possibilitarão a identificação de novos determinantes antigênicos que possam ser expressos em vetores de clonagem e reconhecidos por anticorpos presente no soro de indivíduos infectados.

Conclusão

Dados presentes neste trabalho demonstram que as proteínas recombinantes utilizadas, His₆-GP63 e His₆-LACK podem ser reconhecidas por anticorpos produzidos por cães, devido ao potencial antigênico das mesmas demonstrado em outros modelos animais. Os dados preliminares obtidos neste estudo sugerem que as proteínas recombinantes testadas têm potencial para uso futuro como ferramenta para o desenvolvimento de imunoenaios que possam ser utilizados em inquéritos sorológicos, auxiliando em programas de prevenção e controle da leishmaniose.

Agradecimentos

Laboratório de Biologia Celular e Tecidual - IP&D/UNIVAP; Laboratório de Cultura de Células - IP&D/UNIVAP.

Referências

-ANDRADE, Paulo P.; MOURA, Patrícia M. M. F.; ANDRADE, Cynthia R. *Leishmania* recombinant heat shock protein in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. In: I Workshop on Leishmaniasis Da UFPe, 1993, Recife, PE. Anais, Recife: UFPe, 1993. p. 199-206.

-BOARINO, A. *et al.* Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*; 12(5), 2005. p.647-653.

-GOMES, Almério de Castro, NEVES, Vera Lúcia Fonseca de Camargo. Estratégia e perspectivas de controle da leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* vol. 31, nº.6, nov./dez. 1998. p.549-552.

-IKONOMOPOULOS, J., *et al.* Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs: Comparative application of traditional diagnostic methods and proposed assay on clinical samples. *Veterinary Parasitology*, 113, 2003. p. 99-113.

-MEDINA-ACOSTA, Enrique, *et al.* The promastigote surface protease (gp63) of *Leishmania* is expressed but differentially processed and localized in the amastigote stage. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 37, 1989. p.263-274.

-MITTMANN, J. Obtenção e produção de partículas virais quiméricas do vírus do mosaico do feijão-de-corda como apresentadoras de epitopos do protozoário patogênico *Leishmania chagasi*. 2004. 140 f. Tese (Doutorado em Biociências e

Biotecnologia)-Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacases/RJ, 2004.

-MONTEIRO, Érika Michalsky, SILVA, João Carlos França, COSTA, Roberto Teodoro, Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. vol. 38, nº 2, mar/abr 2005. p.147-152.

-MOURA, R.S.; MITTMANN, J.; MEDINA- COSTA, E. Production of *Leishmania chagasi* GP63 antigen in a heterologue expression system. In: XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, Foz do Iguaçu (ed., S.B.M.), 2001, p.99.

-Organização Mundial de Saúde. Disponível em www.opas.org.br. Acesso em 26/07/2007.

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

-ROCHA, Roberta Dias Rodrigues *et al.* Anticorpos antipromastigotas vivas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, detectados pela citometria de fluxo, para identificação da infecção ativa na leishmaniose tegumentar americana. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., vol. 35, nº.6, nov./dez. 2002, p.551-562.