

“REATIVIDADE DE SOROS CANINOS A PROTEÍNAS TOTAIS DE *LEISHMANIA* *MAJOR* – DADOS PRELIMINARES”

Brandão, R. C.¹, Pereira, D.², Mittmann, J.².

1 Faculdade de Ciências da Saúde, Curso Biomedicina,
Universidade do Vale do Paraíba, Brasil, CEP 12244000
Fone: 12 3947 1000, Fax: 12 3947 1015

2 Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento- Univap- Av; Shishima Hifumi,
2911- Urbanova – São José dos Campos- São Paulo

Resumo- A Leishmaniose Visceral (LV), também conhecida como Calazar é uma doença crônica que apresenta aspectos clínicos e epidemiológicos característicos para cada região onde ocorre. O calazar canino é considerado mais importante que a doença humana, pois a grande quantidade de animais infectados com o parasitismo cutâneo serve como fonte de infecção para o inseto vetor *L. longipalpis*. Apesar do diagnóstico parasitológico ser o método de certeza, existem também testes sorológicos que visam detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, principalmente IgG, porém muitos destes testes variações em sensibilidade e especificidade. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a reatividade de soros de cães de áreas endêmicas e indenes a proteínas totais de *Leishmania major* através de ELISA e *Western Blot*. Os resultados obtidos até o momento, utilizando 14 soros de cães oriundos de Campos dos Goytacazes (RJ) demonstram que os soros de dois animais apresentam reatividade a antígenos totais de leishmania com absorvâncias acima de 0,5 em diluição do soro de 1:20.

Palavras-chave: Leishmaniose, ELISA, *Western Blot*, IgG.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde

Introdução

A Leishmaniose Visceral (LV), também conhecida como Calazar, palavra de origem indiana (Kala-Azar) que significa “doença negra”, é uma doença crônica, grave, de alta letalidade quando não tratada, apresenta aspectos clínicos e epidemiológicos característicos para cada região onde ocorre.

Segundo a Organização Mundial de saúde, no Brasil, a Leishmaniose Visceral é uma doença endêmica, mas ocorrem surtos com alguma frequência. Está distribuída em 17 dos 27 estados com maior incidência no Nordeste com 92% do total de casos, seguido pela região Sudeste (4%), a região Norte (3%), e, finalmente, a região Centro-Oeste (1%). Tem-se registrado em média menos de 2000 casos por ano com uma taxa de letalidade, que vêm sendo anotadas, chegam a 10% em alguns locais. (Neves, 2005).

Cães domésticos vêm assumindo um importante papel como elos de transmissão da doença em humanos por serem reservatórios potenciais para parasitas do gênero *Leishmania* (GOMES; NEVES, 1998, MONTEIRO; SILVA; COSTA, 2005). No Brasil, sob o ponto de vista epidemiológico, o calazar canino é considerado mais importante que a doença humana, pois a grande quantidade de animais infectados com o

parasitismo cutâneo serve como fonte de infecção para o inseto vetor *L. longipalpis* (Neves, 2005). O desaparecimento das florestas devido à crescente urbanização próxima aos limites dos focos naturais altera a condição de exposição do homem e do cão ao parasito (GOMES e NEVES, 1998). O cão vem sendo portanto apontado como potencial hospedeiro doméstico, sendo o mais importante reservatório natural relacionado com casos humanos de leishmaniose (MONTEIRO et al. 2005).

Como o calazar humano, o canino é uma doença sistêmica com amplo aspecto de características clínicas. Segundo os trabalhos de Marzochi e cols., 1985, no Brasil, entre os cães inoculados pelos insetos vetores, há uma população de 40% a 60% infectada que permanece assintomática (citado por Neves, 2005).

No diagnóstico do calazar canino, considera-se a origem epidemiológica do cão e o conjunto de sintomas apresentados. Como existe um grande número de animais assintomáticos e de baixa especificidade de sintomas, o laboratório se torna um grande aliado. O diagnóstico parasitológico, baseado na demonstração do parasito é o método de certeza. A presença de

parasitos em esfregaço sanguíneo é rara, porém utilizando-se a separação de células nucleadas o parasito pode ser mais bem demonstrado em meios de cultura. Há também testes sorológicos que visam detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, principalmente da classe IgG. Porém os testes sorológicos apresentam variações na sensibilidade e especificidade (Neves, 2005), o que demonstra a necessidade de novos trabalhos que visem contribuir para a busca de novos antígenos e métodos eficientes e de rápido diagnóstico.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a reatividade de soros de cães a proteínas totais de *Leishmania major* através de ELISA e *Western Blot*.

Metodologia

Cultivo dos parasitas. Os parasitas da cepa *Leishmania major* (LV39) foram cultivados em meio de cultura BHI, complementado com Soro Fetal Bovino a 10% e mantidos a 28°C.

Extração de proteínas totais. Culturas nas fases exponenciais foram centrifugadas e os parasitas lavados três vezes por centrifugação à 2.000 rpm em solução tampão fosfato (PBS) com pH de 7.2, por 10 minutos. O sedimento formado na centrifugação foi ressuspenso em 20 volumes de PBS (4^o C), contendo inibidor de protease (aprotinina e EDTA). Feito isso foram realizados três ciclos de 20 segundos a 40Hz em banho de gelo no sonicador, intercalados por congelamento (nitrogênio líquido) e descongelamento (Banho-maria a 37° C). O material lisado foi centrifugado a 13.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas foi mensurada pelo método de Bradford.

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

Microplacas de 96 poços foram sensibilizadas com 2 ng/poço com as proteínas totais de *Leishmania* 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 e 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 duplicata em diluição seriada na base dois iniciada em 1:10.

Os poços foram, novamente lavados duas vezes e incubados por 1 hora a 37°C com 100 µL/poço de proteína A conjugado a peroxidase (Sigma) segundo proposto por Lima e colaboradores (2005) 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 soros caninos que apresentaram reatividade positiva contra proteínas recombinantes His₆-GP63 e His₆-LACK (PEREIRA, D. et. al. 2007). Os resultados foram plotados em gráficos.

Western Blot: As proteínas separadas por SDS-PAGE foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose de 0,45µm (Bio-Rad Laboratories, Richmond, EUA), segundo metodologia descrita por Towbin *et al.*, (1979). As membranas foram incubadas com TST-20 1X contendo 0,2% leite desnatado em pó por 16 h a 4°C. Essas membranas foram, em seguida, lavadas em TST-20 1X e incubadas com diferentes soros (anticorpo primário), anticorpos policlonais anti-LACK e anti-GP63, ambos diluídos 1:1000 e soros de cães em diferentes diluições (1:50, 1:100, 1:150 e 1:200). Todos os soros foram diluídos em TST-20 1X acrescido de 0,2% leite desnatado. As membranas foram incubadas com os soros durante 16h a 4 °C. O reagente secundário foi proteína A conjugada a peroxidase diluída 1:5.000 em TST-20 1X com 0,2% leite desnatado em pó. Após incubação as membranas foram lavadas 3x com TST-20 1X. Os anticorpos capturados foram revelados pela adição da solução de revelação contendo 1mg/ml do cromógeno diaminobenzidina (DAB) (Sigma Co. St. Louis, EUA) mais o substrato H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) na concentração final de 0,03%. A reação foi terminada pela lavagem da membrana com água destilada. (Mittmann, 2004).

Resultados

Os resultados preliminares obtidos por *Western blot* mostram que o antígeno predominante na fração solúvel é a proteína GP63, como demonstrado na figura 1. Não houve reatividade para o anticorpo anti-LACK. Dos cinco soros caninos testados por *Western blot* nenhum apresentou resultado positivo (dados não mostrados).

Nos ensaios de ELISA foram testados 14 soros em diluição seriada (1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560, 1:5120 e 1:10240).

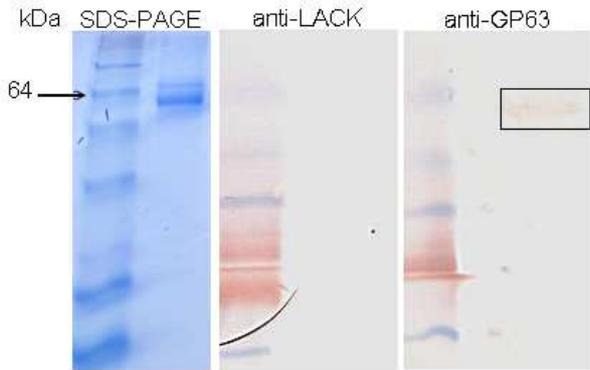


Figura 1: Gel SDS-PAGE resultado da extração de proteínas totais corado por Azul de Coomassie e Imunodeteção por *Western Blot* da proteína GP63.

O gráfico da figura 2 indica média da absorvância dos soros controles (39 e 04) e soro considerado negativo (54), sendo que foi possível verificar que os soros controle, tiveram valores de absorvância elevados em relação ao soro 54, indicando maior reatividade dos mesmos as proteínas totais de *Leishmania major*.

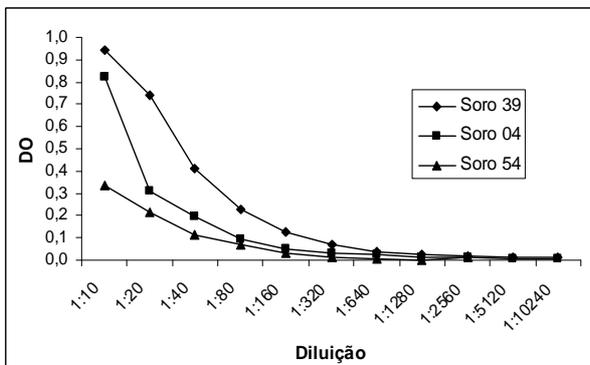


Figura 2: Gráfico de comparação das médias de absorvância dos soros 39, 04 e 54 testados pelo método de ELISA.

Os demais soros testados apresentaram reatividade variada (Figuras 3 a 5). Os soros com as menores absorvâncias foram os soros 17 e 69 (figura 3) variando entre 0,2 e 0,3 e o soros 30 e 16 (figura 5) que variou entre 0,1 e 0,2. As maiores absorvâncias foram observadas nos soros 90 e 75 com absorvâncias entre 0,6 e 0,8 (Figura 3) e os soros 51 e 19 com os valores de absorvância entre 0,5 e 0,6 (Figura %). Os demais soros tiveram uma variação entre 0,2 e 0,8 (Figura 4).

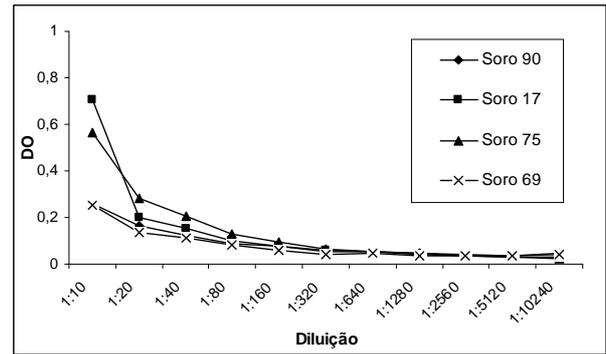


Figura 3: Gráfico de comparação de médias de absorvância dos soros testados por ensaio de ELISA.

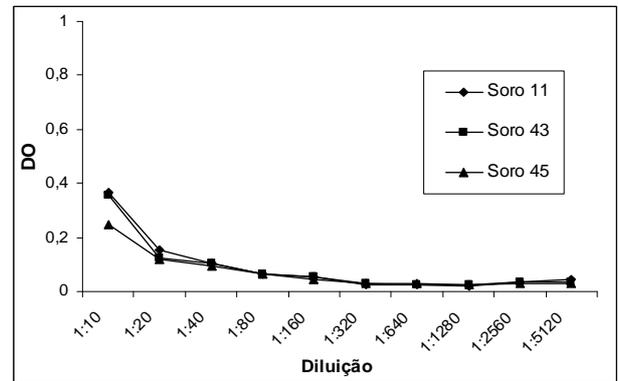


Figura 4: Gráfico de comparação de médias de absorvância dos soros testados por ensaio de ELISA.

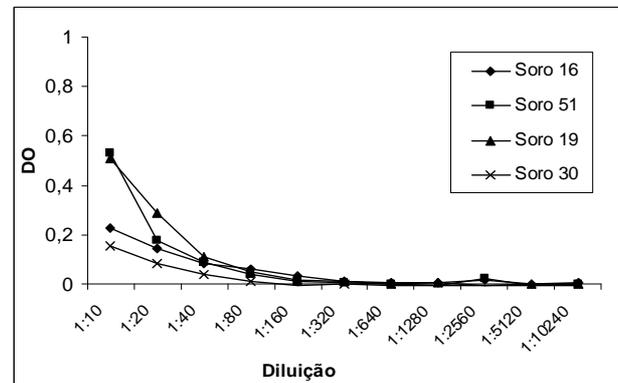


Figura 5: Gráfico de comparação de médias de absorvância dos soros testados por ensaio de ELISA.

Discussão

Os resultados preliminares obtidos por *Western Blot* mostram que a proteína presente no gel SDS-PAGE é possivelmente a proteína GP63, pois a imunodeteção por *Western Blot*, utilizando a anti-GP63 como segundo anticorpo, apresentou resultado positivo para proteína GP63. Sendo esta a proteína majoritária neste lisado de *Leishmania major*. A proteína LACK não foi detectada utilizando anticorpo policlonal anti-

LACK. Como a proteína GP63 é a proteína majoritária da superfície do parasito, o protocolo de obtenção do lisado foi eficiente para a obtenção dessa proteína, mas não da proteína LACK, que é uma proteína intra-celular e expressa em baixas concentrações quando comparada a expressão de GP63.

A prova definitiva para a presença do parasito de leishmaniose é a demonstração microscópica, porém tal exame é realizado através de biópsia de baço, linfonodos e fígado que são utilizados para a obtenção de aspirados para a realização do diagnóstico. Tal método invasivo não apresenta alta sensibilidade já que os parasitas não estão homoganeamente distribuídos pelo tecido, por isso métodos sorológicos são essenciais para diagnóstico de infecções de leishmaniose (BOARINO, *et al.*, 2005).

O teste de ELISA apresenta uma ótima alternativa no diagnóstico da leishmaniose canina, devido sua facilidade de padronização, possibilidade de diagnóstico em grande escala e melhor leitura e interpretação dos resultados. Sendo que a sensibilidade e especificidade do teste dependem diretamente do tipo de antígeno utilizado (BOARINO A., *et al.* 2008).

Dos soros caninos analisados, dois apresentaram absorvância maior em relação aos demais (soros 4 e 39), indicando maior reatividade destes em relação aos antígenos totais de *Leishmania major*. Pereira *et al.* (2007) analisando estes mesmos soros caninos, utilizando como antígenos proteínas recombinantes HIS₆-GP63 e HIS₆-LACK, também detectaram maior absorvância destes soros em relação aos antígenos, o que nos fornece ainda mais indícios do contato desses cães com o parasita, apesar de não possuímos dados clínicos sobre os animais testados.

Conclusão

Dados presentes neste trabalho demonstram que a proteína majoritária extraída dos lisados totais de *Leishmania major*, foi a proteína (GP63). Dentre os soros testados os soros controles também foram positivos para este ensaio pode 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 os soros testados neste estudo corroboram os dados obtidos pelo grupo de pesquisa PEREIRA e colaboradores, (2007) utilizando antígenos recombinantes. Sugerindo fortemente o contato dos animais com o parasito, podendo estes estar contribuindo como reservatórios importantes para este parasito.

Referências

-BARINO, A., *et al.* Application of a recombinant protein for the serological diagnosis of canine leishmaniasis. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 2008.

-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.

-LIMA, Valéria Marçal Felix de *et al.* Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by an enzyme immunoassay using protein A in naturally infected dogs. *Pesq. Vet. Bras.*, Dec 2005, vol.25, no.4, p.215-218.

-MITTMANN, J. Obtenção e produção de partículas virais quiméricas do vírus do mosaico do feijão-de-corda como apresentadoras de epitopos do protozoário patogênicos *Leishmania chagasi*. 2004 140f. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) – Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos de Goytacases/RJ, 2002.

-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.

-NEVES, David Pereira. Parasitologia dinâmica. São Paulo: Atheneu, 2005.

-PEREIRA, D. B. Utilização da Proteína recombinante His₆-GP63 de *Leishmania chagasi* como antígeno para diagnóstico de leishmaniose canina. 2006 Trabalho de conclusão de curso, graduação em ciências biológicas, Universidade do Vale do Paraíba, Jacareí-SP.

- PEREIRA, D. B., *et al.* 2007 Reatividade de soros caninos a proteínas recombinantes HIS₆-GP63 e HIS₆-LACK DE *Leishmania chagasi*.