

EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS META-2, LRR17, TSA E LBSTI-1 EM ISOLADOS DE *Leishmania (Viannia) braziliensis* OBTIDOS DE PACIENTES COM LESÕES CUTÂNEAS OU MUCOSAS

Lucilla Ribeiro ÁVILA¹, Milton Adriano Pelli de OLIVEIRA¹, Clayson Moura GOMES¹, Fernanda Dias TOMÉ¹, Marina Clare VINAUD¹, Ledice Inácia de Araújo PEREIRA¹, Fernanda Bugalho DUARTE³, Fátima RIBEIRO-DIAS¹, Sílvia Reni Bortolin ULIANA³, Miriam Leandro DORTA¹

¹ Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás;² Hospital Unique, Goiânia, Goiás, Brasil, ³ Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

1. Mestranda - lucilla.avila@gmail.com
2. Orientador - mapoliv@iptsp.ufg.br

PALAVRAS-CHAVE: TSA, STI, Meta-2, *Leishmania (Viannia) braziliensis*
SUPPORTO FINANCIERO: CNPq, FUNAPE, FAPEG

INTRODUÇÃO:

A leishmaniose é uma doença endêmica no Brasil cuja incidência aumentou nos últimos 20 anos e vários surtos têm ocorrido em diversas regiões do país, sendo a *L. (V.) braziliensis* a causa mais freqüente de leishmaniose cutânea no Brasil (Ministério-da-saúde-do-Brasil 2007). Na maioria das vezes esta enfermidade se manifesta como uma única úlcera de pele que normalmente se desenvolve no local do inoculo.

Cerca de 1 a 10% dos pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis* desenvolvem uma forma da doença chamada leishmaniose mucosa ou leishmaniose muco-cutânea, as quais são progressivas e destrutivas. Uma das possíveis causas das reações exacerbadas é a resistência de alguns parasitos à eliminação pelo sistema imune e a persistência de antígenos que induzem uma intensa hipersensibilidade do tipo tardio (Avila et al. 1984).

Alguns genes que aumentam a virulência do parasito podem estar relacionados com este aumento na resistência dos parasitos frente à resposta imune do hospedeiro, permitindo o aparecimento de metástases nas mucosas. O gene META-2 está envolvido na resistência ao choque térmico e estresse oxidativo, como parte de um dos mecanismos da Leishmânia para os passos iniciais na infecção do hospedeiro (Uliana et al. 1999).

O gene LRR17, que também apresenta expressão regulada durante o ciclo de vida dos parasitos apresenta-se em maior abundância em formas amastigotas. A seqüência de aminoácidos deduzida apresenta similaridade com a proteína NOD3 humana e contém, em sua região carboxi-terminal, 6 repetições ricas em leucina (LRR)(Franco 2008). A proteína NOD3 humana faz parte de uma família de proteínas conhecidas como proteínas NACHT-LRR (NLRs) (Chamaillard et al. 2003). Dada a semelhança desta proteína com uma proteína componente do sistema imune inato, sugere-se que esta proteína esteja envolvida em adaptações do parasito ao ambiente intracelular ou poderia interagir com proteínas da célula hospedeira, possivelmente modulando sua resposta à infecção.

Alguns estudos realizados mostraram um possível papel da proteína TSA (thiol-specific antigen) na virulência do parasito. A produção de uma proteína secretada antioxidante poderia conferir vantagens dentro do fagolissoma do macrófago (Webb et al. 1998). Por outro lado, a proteína TSA recombinante mostrou-se, junto a outra proteína recombinante, LmSTI1 (*Leishmania major* Stress inducible protein 1), ser altamente imunogênica, sendo que, além da vacinação genética, outros estudos com esses dois antígenos (TSA e LmSTI1) estão sendo utilizados em estratégias de imunização as quais induzem uma forte resposta do tipo Th1(Coler et al. 2002;Mendez et al. 2001).

MATERIAL E MÉTODOS:

As formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* foram selecionadas aleatoriamente do estoque de parasitos do Leishbank (Banco de leishmânias da região Centro Oeste/UFG/Goiás). Foram utilizados 3 isolados de parasitos oriundos de pacientes com lesões mucosas e 3 isolados de pacientes com lesões cutâneas. Para obtenção da forma amastigota, as leishmanias, recém descongeladas, foram inoculadas no coxim plantar de camundongos desprovidos do gene de IFN γ (Oliveira et al. 2010) e, após a lesão atingir 3mm, os animais foram sacrificados e as formas amastigotas foram purificadas em gradiente de Percoll. Para obter formas promastigotas estacionárias, os parasitos foram cultivados em meio Grace suplementado com 20% de soro bovino fetal inativado, em placas de 24 poços a 26°C, sendo a cultura iniciada com 1 x 10⁶ parasitos/mL. Foram utilizadas leishmanias com 8 dias de cultura. As proteínas extraídas de *L. (V.) braziliensis* foram fracionadas em gel de poliacrilamida-SDS, e depois transferidas para membranas de nitrocelulose usando

“Trans-blot SD-Semidry Transfer Cell” (BioRad). Estas membranas foram bloqueadas com TBST-leite desnatado 5% e incubadas com soro imune (anti-LbSTI-1; anti-LRR17; anti-TSA; anti-META2; anti-GAPDH) diluído em TBST com leite desnatado 1%. Em seguida, a membrana foi lavada com TBST e incubada com soro anti-imunoglobulinas totais de camundongo ou coelho conjugado a peroxidase. A membrana foi lavada com TBST e uma última vez com PBS 1%. A revelação foi feita com o kit “SuperSignal West Pico Trial” (PIERCE) e a exposição através de filmes de Raio X em diferentes tempos. As bandas protéicas foram quantificadas utilizando o programa ImageJ e os resultados comparados quanto a significância dos mesmos pelo método de análise não paramétrica do teste t com correlação de Welch’s usando o programa Graph-Pad Prism Software 5.0 (Inc. San Diego, CA, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A expressão das proteínas META2, LRR17, LbSTI-1 e TSA dos diferentes isolados de *L. (V.) braziliensis* foi detectada através do ensaio ‘immunoblotting’. Primeiramente, foi avaliada a expressão destas proteínas na formas promastigotas de fase estacionária de 3 isolados oriundos de pacientes com lesões cutâneas (JCJ8c, RPL5c e SMB7c) e de 3 com lesões mucosas (ASL9m, JBC8m e PPS6m). A expressão de Meta2, LRR17 e LbSTI-1 foi variável entre os isolados, não havendo diferença significativa entre o grupo de isolados com lesões cutâneas e mucosas (dados não mostrados). A expressão de TSA, por sua vez, foi estatisticamente significativa entre os dois grupos analisados ($p=0,04$), sendo a sua expressão 62,5 maior em isolados com lesões mucosas (Fig. 1). Foi demonstrado em *S. cerevisiae*, que a proteína TSA protege contra danos oxidativos no fagolisossoma do macrófago, sendo essa proteção mediada pela redução do peróxido de hidrogênio (Chae et al. 1993; Netto et al. 1996). Está bem documentado que espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio e ânion superóxido fazem parte de um processo conhecido como explosão respiratória, onde há um alto consumo transitório de oxigênio (Foman & Torres 2002; James & Nacy 1993). Uma vez que, a proteína TSA pode atuar na redução do peróxido de hidrogênio, isso pode ser a explicação para uma maior sobrevivência dos parasitos de lesões mucosas que sobrevivem em um local com uma resposta Th1 exacerbada.

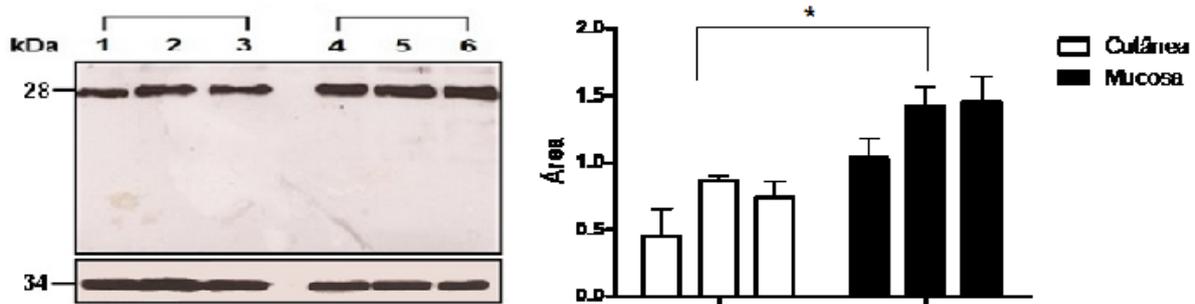


Figura 1. Expressão da proteína TSA em extratos protéicos totais de promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. 'Immunoblot' para expressão da proteína TSA de três isolados oriundos de indivíduos portadores de lesões cutâneas (1, JCJ8c; 2, RPL5c e 3, SMB7c) e de três com lesões mucosas (4, ASL9m; 5, JBC8m e 6, PPS6m). A proteína TSA possui aproximadamente 28 kDa e o anticorpo normalizador 34 kDa.

A fim de verificar se os parasitos na forma amastigota também apresentariam diferenças em relação à expressão protéica nos mesmos isolados de lesões cutâneas e mucosas, o mesmo ensaio foi realizado para avaliar a expressão das diferentes proteínas. Não houve diferença significativa na expressão das proteínas LRR17, LbSTI-1 nos grupos analisados e, embora a expressão de TSA tenha sido maior em isolados de lesões mucosas, a diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,39$) (dados não mostrados).

CONCLUSÕES:

A proteína TSA obteve maior expressão em isolados oriundos de lesões mucosas, sendo isso uma possível explicação para a maior resistência dos parasitos e lesões mais exacerbadas neste tipo de doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Avila JL,Rojas M,Rieber M 1984. Antibodies to laminin in American cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun*, 43, 402-406.
- Chae HZ,Kim IH,Kim K,Rhee SG 1993. Cloning, sequencing, and mutation of thiol-specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 268, 16815-16821.
- Chamaillard M,Girardin SE,Viala J,Philpott DJ 2003. Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol*, 5, 581-592.

Coler RN,Skeiky YA,Bernards K,Greenson K,Carter D,Cornellison CD,Modabber F,Campos-Neto A,Reed SG 2002. Immunization with a polyprotein vaccine consisting of the T-Cell antigens thiol-specific antioxidant, *Leishmania major* stress-inducible protein 1, and *Leishmania* elongation initiation factor protects against leishmaniasis. *Infect Immun*, 70, 4215-4225.

Foman HJ,Torres M 2002. Reactive Oxygen Species and Cell Signaling. Respiratory Burst in Macrophage Signaling. *Am J Respir Crit Care Med*, 166, S4-S8.

Franco FAdL 2008. *Caracterização da região genômica META 1 de Leishmania (Leishmania) amazonensis e comparação com a região ortóloga de L. (L.) major*, Universidade de São Paulo, São Paulo.

James SL,Nacy C 1993. Effector functions of activated macrophages against parasites. *Curr Opin Immunol*, 5, 518-523.

Mendez S,Gurunathan S,Kamhawi S,Belkaid Y,Moga MA,Skeiky YA,Campos-Neto A,Reed S,Seder RA,Sacks D 2001. The potency and durability of DNA- and protein-based vaccines against *Leishmania major* evaluated using low-dose, intradermal challenge. *J Immunol*, 166, 5122-5128.

Ministério-da-saúde-do-Brasil 2007. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. In *Ministério da Saúde (Normas e Manuais Técnicos)*, Brasília.

Netto LES,Chae HZ,Kang SW,Rhee SG,Stadtman ER 1996. Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. TSA possesses thiol peroxidase activity. *J. Biol. Chem*, 271, 15315-15321.

Oliveira MA,Pires Ada S,de Bastos RP,Lima GM,Pinto SA,Pereira LI,Pereira AJ,Abrahamsohn Ide A,Dorta ML,Ribeiro-Dias F 2010. *Leishmania* spp. parasite isolation through inoculation of patient biopsy macerates in interferon gamma knockout mice. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 52, 83-88.

Uliana SR,Goyal N,Freymuller E,Smith DF 1999. *Leishmania*: overexpression and comparative structural analysis of the stage-regulated meta 1 gene. *Exp Parasitol*, 92, 183-191.

Webb JR,Campos-Neto A,Ovendale PJ,Martin TI,Stromberg EJ,Badaro R,Reed SG 1998. Human and murine immune responses to a novel *Leishmania major* recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. *Infect Immun*, 66, 3279-3289.