

PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES LeIF E LbSTI DE *Leishmania (Viannia) braziliensis* E CARACTERIZAÇÃO DA SUA IMUNOGENECIDADE

OLIVEIRA, Rose Mara Fidélis¹; **FERREIRA**, Carla Cunha¹; **DORTA**, Miriam Leandro²

Palavras-chaves: LeIF, LbSTI, *L. (V.)braziliensis*

1. INTRODUÇÃO

No Brasil a leishmaniose tegumentar americana apresenta ampla distribuição geográfica sendo a espécie mais prevalente *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Sua importância reside não apenas na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também na possibilidade de assumir formas que podem provocar lesões destrutivas e desfigurantes. A ausência de medidas profiláticas eficientes e de uma vacina efetiva justifica estudos que buscam identificar proteínas que possam ser utilizadas para o desenvolvimento de vacinas, para imunoprofilaxia e imunoterapia. Neste trabalho foi feita a caracterização da imunogenicidade de duas proteínas recombinantes LeIF (“*Leishmania elongation Initiation Factor*”) e LbSTI1 (“*Leishmania braziliensis* Stress Inducible protein 1”) de *L.(V.)braziliensis* através de um ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando soros de pacientes com LTA.

2. METODOLOGIA

2.1 - Produção das proteínas recombinantes LeIF-His e LbSTI-His em pequena e grande escala.

Bactérias da espécie *Escherichia coli* da linhagem LB 21-DE3 foram transformadas através da inserção de plasmídios contendo os genes LeIF-pHis ou LbSTI-pHis. As proteínas foram produzidas em pequena escala para a escolha do clone que melhor expressava a proteína através de SDS-PAGE. Após seleção dos clones, a produção em grande escala foi feita (SHEIK *et al*, 2002).

2.2 - Purificação das proteínas.

As proteínas produzidas em grande escala foram purificadas em gel de SDS-PAGE (RIBEIRÃO *et al.*,1998) e depois de quantificadas foram estocadas à – 20°C para que sua imunogenicidade fosse avaliada através de ensaios sorológicos e celulares.

2.3 - Ensaio Imunoenzimático (ELISA).

As proteínas recombinantes LeIF-His e LbSTI-His foram utilizadas para sensibilização de placas de ELISA (High-binding, Costar) na concentração de 1 µg/mL. Foram testados 64 soros de pacientes com LTA provenientes da região Centro-Oeste, 30 soros de indivíduos saudáveis (Banco de sangue) e 20 soros de indivíduos com outras patologias. Foi utilizado conjugado anti-IgG humana marcado com peroxidase (Bio-Rad). A revelação da reação foi feita com DAB e H₂O₂. A leitura foi feita a 492 nm em leitora de ELISA multiskan. Os resultados foram expressos em índice de reatividade (IR), que é a Densidade Óptica (DO) da amostra dividida pela média da DO de 06 soros negativos controles. O presente projeto foi aprovado no comitê de ética do Hospital das Clínicas (nº 125/2004).

¹Bolsista de Iniciação Científica IPTSP/UFG – Laboratório de Imunobiologia das Leishmanioses - IPTSP/UFG/GO rosefidelis@yahoo.com , ²Orientadora/IPTSP/UFG – mdorta@iptsp.ufg.br

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Produção e Purificação das proteínas recombinantes LbSTI e LeIF de *L.(V.)braziliensis*.

Depois da produção em pequena e grande escala, as proteínas recombinantes foram purificadas através de gel de SDS-PAGE (Fig.1). As proteínas rLeIF e rLbSTI obtidas apresentaram peso molecular de 45 e 60 kDa, respectivamente (MENDEZ *et al.*, 2001; CAMPOS-NETTO *et al.*, 2002).

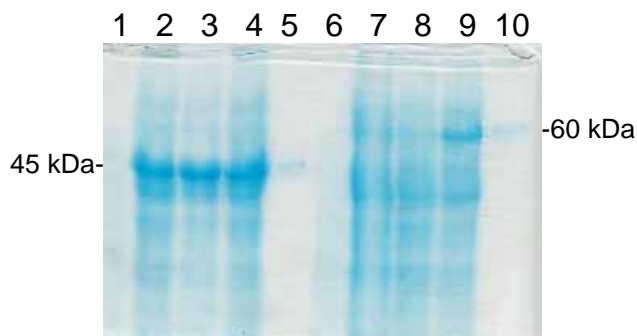


Figura 1. Avaliação da expressão das proteínas recombinantes, LeIF e LbSTI, produzidas em pequena e em grande escala. Canaletas: 1- padrão de peso molecular, 2- amostra da pequena escala da proteína LeIF induzida com IPTG 0,1 M (clone 3), 3- amostra da pequena escala da proteína LeIF não induzida com IPTG (clone 3), 4- amostra da grande escala da proteína LeIF induzida com IPTG 0,1 M (clone 3), 5- proteína LeIF purificada, 6- PPM, 7- amostra da pequena escala da proteína LbSTI induzida com IPTG 0,1 M (clone 1), 8 – amostra da pequena escala da proteína LbSTI não induzida com IPTG (clone 1), 9- amostra da grande escala da proteína LbSTI induzida com IPTG 0,1 M (clone 1), 10 – proteína LbSTI purificada.

3.2 – Avaliação da imunogenicidade das proteínas recombinantes LeIF e LbSTI de *L.(V.)braziliensis* através de ELISA.

O ELISA foi padronizado utilizando diferentes concentrações das proteínas recombinantes (0,1, 0,25, 0,5 1,0 e 2,0 $\mu\text{g/mL}$) e diferentes diluições do conjugado (1/5.000, 1/10.000 e 1/15.000). A concentração da proteína de 1 $\mu\text{g/mL}$ e o conjugado a 1/10.000 foram os que melhor discriminaram soros positivos de soros negativos. A imunogenicidade das proteínas recombinantes, rLeIF e rLbSTI foram testadas através do ELISA. O Índice de Reatividade obtido com os antígenos rLeIF e rLbSTI foram similares entre si (Fig. 2). Considerando que o teste “padrão ouro” (teste de referência) é o ELISA utilizando o extrato total do parasito, os ensaios com rLeIF e rLbSTI apresentam sensibilidade de 52,68% e 76,30% respectivamente. A especificidade apresentada pela rLeIF e rLbSTI foram superiores a obtida pelo ELISA convencional.

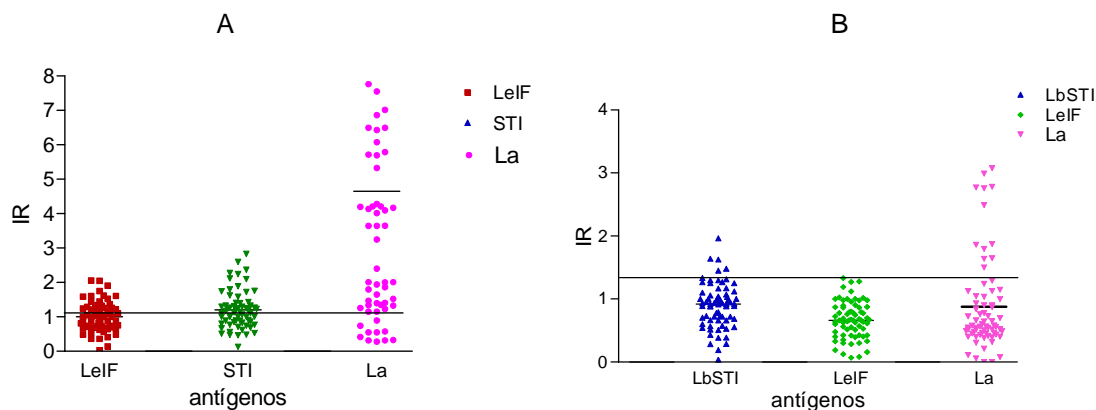


Figura 2. A - Reatividade das proteínas recombinantes rLeIF e rLbSTI de *L. (V.) braziliensis* com IgG de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana. B - Reatividade de proteínas recombinantes de *L. (V.) braziliensis* com IgG presentes nos soros controles negativos ou nos soros de pacientes com outras patologias.

O ensaio ELISA utilizado para avaliar a imunogenicidade de rLeIF e rSTI mostrou que estas proteínas foram reconhecidas pelos soros de pacientes com LTA. Os ensaios imunoenzimáticos utilizando as proteínas recombinantes apresentaram sensibilidade e especificidade similares às apresentadas pelo ensaio utilizando extrato total de parasitos

A reatividade de rLeIF e rLbSTI com soros controles negativos foram menores à reatividade apresentada extrato total de La ($p < 0,05$). A reatividade de rLeIF e rLbSTI e La com soros de pacientes com outras patologias foram similares.

Estas proteínas recombinantes serão avaliadas quanto a imunogenicidade em ensaios imunes celulares com células mononucleares do sangue periférico de pacientes com LTA.

4. CONCLUSÃO

O ensaio ELISA utilizado para avaliar a imunogenicidade das proteínas recombinantes LeIF e LbSTI de *L.(V.)braziliensis* mostraram que estas foram reconhecidas pelo soro de pacientes com LTA. Apresentaram sensibilidade e especificidade similares às apresentadas pelo ensaio utilizando extrato total de parasitos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

RIBEIRÃO M, PEREIRA-CHIOCCOLA VL, EICHINGER D, RODRIGUES MM, & SCHENKMAN, S Temperature differences for trans-glycosilation and hydrolysis reaction reveal an acceptor binding site in the catalytic mechanism of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Glycobiol.*, v.7, p.1237-1246. 1997.

WEBB, JR, CAMPOS-NETO, A, SKEIKY, YAW & REED, SG Molecular characterization of the heat-inducible LmSTI1 protein of *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* v.89, p.179-93. 2002.

WEBB, JR, CAMPOS-NETO, A, OVENDALE, PJ, MARTIN, TI, STROMBERG, EJ, BADARO & REED, SG Human and murine immune responses to a novel *Leishmania major* recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. *Infec Immun.*,v.66, p.3279-89. 2002.

6. FONTE DE FINANCIAMENTO –CNPq/PADCT, FAPESP