

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



ALESSANDRA LIMA DE ALBUQUERQUE



RECIFE, 2004

**CARACTERIZAÇÃO DE UM ANTÍGENO COM MOTIVOS
REPETITIVOS DE *Leishmania chagasi***

ALESSANDRA LIMA DE ALBUQUERQUE

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Genética da Universidade
Federal de Pernambuco para obtenção do grau de Mestre em Genética

Orientador: Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Banca Examinadora:

Andréa Queiroz Maranhão (Titular)

UnB – Departamento de Biologia Celular

Frederico Guilherme Coutinho Abath (Titular)

CPqAM/FIOCRUZ – Departamento de Imunologia

Marcos Antônio de Moraes Júnior (Titular)

UFPE – Departamento de Genética

Tereza Cristina Leal-Balbino (Suplente)

CPqAM/FIOCRUZ – Departamento de Microbiologia

Neide Santos (Suplente)

UFPE – Departamento de Genética

Data da defesa: 27 de fevereiro de 2004

*À minha mãe Terezinha e ao meu irmão
Ulisses pelo incentivo recebido a cada
novo desafio e amor em todos os
momentos de minha vida.*

Agradecimentos

Ao meu orientador pelos ensinamentos, paciência e amizade.

Às Dras. Nilma, Alzira, Cristina e Marise pelo apoio, pela disposição em prestar ajuda e simpatia.

A todos amigos do Departamento de Microbiologia, estagiários, funcionários e técnicos pela agradável companhia e pela cooperação em todos momentos.

Aos milhares de amigos do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães que fazem parte da minha vida.

Aos demais amigos que sempre me apoiaram e são fundamentais nas minhas conquistas, proporcionando momentos de alegria e inspiração.

Ao Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz pelo apoio técnico-científico.

Às instituições que deram infraestrutura e financiamento, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / FIOCRUZ, CAPES, CNPq e Biomanguinhos.

À minha família pelo apoio, pela compreensão nos momentos de estresse, pelo amor e carinho indispensáveis.

A *Deus* por mais esta etapa vencida.

SUMÁRIO**LISTA DE FIGURAS****RESUMO**

1. Introdução.....	8
2. Revisão bibliográfica	
2.1. Breve histórico da doença.....	10
2.2. A doença.....	10
2.3. Distribuição e epidemiologia.....	11
2.4. O parasita: Taxonomia, Morfologia e Genoma	
2.4.1. Taxonomia.....	12
2.4.2. Morfologia.....	12
2.4.3. Genoma.....	13
2.5. Vetor.....	14
2.6. Ciclo epidemiológico.....	15
2.7. Resposta Imune.....	16
2.8. Diagnóstico.....	17
2.9. Tratamento.....	18
2.10. Vacinas.....	19
2.11. Moléculas antigênicas.....	20
3. Referências bibliográficas.....	23
4. Manuscrito do artigo.....	28
5. ABSTRACT.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura I (revisão). Cerâmica da civilização pré-Inca com lesões semelhantes às provocadas pela LMC.....	10
Figura II (revisão). Indivíduo com hepatoesplenomegalia.....	10
Figura III (revisão). Distribuição mundial das leishmanioses.....	11
Figura IV (revisão). Esquema e fotos de <i>Leishmania donovani</i>.....	13
Figura V (revisão). Fases de desenvolvimento da <i>Lutzomyia longipalpis</i>.....	15
Figura VI (revisão). Ciclo epidemiológico da leishmaniose.....	15
Figura 1. Esquema de subclonagem do gene <i>LC14</i>.....	40
Figura 2. Esquema do pBK-CMV-<i>LC14</i>.....	41
Figura 3. Transcrição e tradução <i>in vitro</i>.....	42
Figura 4. Proteínas recombinantes em SDS-PAGE.....	43
Figura 5. Western-blot.....	44

RESUMO

A Leishmaniose Visceral é uma infecção parasitária endêmica no mundo inteiro, no Brasil é provocada pela *Leishmania chagasi*. É uma importante causa de morbidade e mortalidade, apresentando dificuldade de diagnóstico e tratamento. Para um controle mais eficaz, tem-se pesquisado antígenos para medidas profiláticas. Estudos prévios identificaram em uma biblioteca de cDNA de amastigotas de *L. chagasi* um clone codificando a proteína, Lc14, com 22 repetições de 14 aminoácidos (aa). Um homólogo de *L. major* foi identificado contendo mais de 100 cópias de 14aa repetitivos e uma região C-terminal similar. Neste trabalho iniciamos a caracterização da proteína Lc14, cujo gene foi subclonado e expresso em *Escherichia coli*. A proteína recombinante foi utilizada na produção de anticorpos para análise em Western-blot com extratos de parasitas. Em *L. chagasi* os anticorpos reconheceram múltiplas bandas, algumas maiores que 170kDa. Foi observado que *L. chagasi* e *L. major* apresentam proteínas semelhantes e o número de bandas vai decrescendo de *L. chagasi*, *L. major*, *L. braziliensis* até *T. cruzi*. Serão necessários maiores estudos para esclarecer a razão das múltiplas bandas, a função da proteína e a localização intracelular em *L. chagasi*.

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são infecções parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (Shaw, 1994) que são transmitidos pela picada de insetos da ordem díptera dos gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Desjeux, 1996). São endêmicas de áreas tropicais e subtropicais, atingindo 12 milhões de pessoas por todo mundo. Aproximadamente 350 milhões de indivíduos de 88 países moram em regiões onde correm o risco de serem infectados (Desjeux, 1996; Herwaldt, 1999; WHOa, 2002).

As diferentes características clínicas apresentadas pelas leishmanioses dependem das espécies dos parasitas e do sistema imune do paciente (Colmenares *et al.*, 2002), podendo então ser reunidas em quatro grupos: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose mucocutânea (LMC), leishmaniose visceral (LV). As diferentes formas destas doenças constituem um grave problema de saúde pública. O aspecto das lesões ulcerosas da forma cutânea e as mutilações nas cartilagens e ossos do nariz e do maxilar causadas pela LMC levam os pacientes a um certo grau de segregação social, enquanto que a forma visceral, produzida pelos parasitas do complexo "*L. donovani*" (*L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*) é acompanhada de elevada mortalidade quando não tratada, sendo capaz de dar origem a surtos epidêmicos graves (Rey, 1991; Desjeux, 1996; WHOb, 2002).

No Brasil, a LV é produzida pela *L. chagasi* e é considerada uma importante causa de morbidade e mortalidade, onde as principais áreas endêmicas estão localizadas no Nordeste (FUNASA, 2002). A principal estratégia de controle desta enfermidade consiste no seu diagnóstico, tratamento e quando possível eliminação do vetor e de reservatórios (Rey, 1991; WHOa, 2002). Porém, tais medidas não têm obtido muito sucesso no combate da LV, como o diagnóstico que é prejudicado pela: 1) evolução gradual e imperceptível da doença na maioria dos casos; 2) dificuldade de discriminação clínica devido à similaridade a outras doenças; 3) técnica invasiva utilizada nos testes parasitológicos; 4) existência no imunodiagnóstico de pacientes falsos positivos e negativos; 5) barreiras encontradas no transporte dos kits a campo (Adhya *et al.*, 2002; WHOa, 2002). Além disso, os tratamentos são caros, prolongados e utilizam drogas altamente tóxicas produtoras de inúmeros efeitos colaterais (Rey, 1991; WHOa, 2002). Na busca de medidas de controle mais eficazes, atualmente um dos grandes desafios é o desenvolvimento de uma vacina segura. Para isso, tem sido então, realizados estudos na identificação e caracterização de antígenos protéicos que possam levar à indução de uma resposta imune protetora ou ainda permitam um diagnóstico rápido e confiável (Grimaldi Jr., 1995; WHOa, 2002).