

**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**

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

**LISTA DE FIGURAS**

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

**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).