

2.11.04 - Imunologia / Imunologia Aplicada
DESENVOLVIMENTO DE UMA PROTEÍNA QUIMÉRICA COMPOSTA POR MÚLTIPLOS EPÍTOPOS DE LINFÓCITOS B PARA SER EMPREGADA COMO ANTÍGENO EM TESTES SOROLÓGICOS PARA A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR HUMANA

Yuri M. Campos¹, Guilherme C. Garcia², Ana Maria R. S. Carvalho², Mariana C. Duarte^{2,3}, Matheus F. C. Silva², Fernanda A. C. Medeiros², Eduardo A. F. Coelho^{2,3}, Dênia M. M. Franco², Denise U. Gonçalves², Tiago A. O. Mendes⁴, Daniel Menezes- Souza, PhD^{2,3}.

1. Faculdade de Medicina da UFMG
2. Pós-graduação em Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG.
3. Departamento de Patologia Clínica do COLTEC da UFMG, PhD.
4. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada da UFV, PhD.

Resumo

Leishmania braziliensis é responsável pela maioria dos casos de Leishmaniose Tegumentar Humana (LTH). A infecção por esse parasito está associada a um amplo espectro de manifestações clínicas, incluindo cutânea e muco-cutânea. O diagnóstico precoce é essencial para prevenção de danos e sequelas. Contudo, atualmente não há teste laboratorial com desempenho satisfatório no diagnóstico preciso e específico da doença. Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi desenvolver uma proteína quimérica composta por vários epítopos de linfócitos B, selecionados por imunoproteômica, para ser empregado como antígeno em testes sorológicos para a LTH. O desing da proteína envolveu a utilização de ferramentas de imuno e bioinformática, e os epítopos foram selecionados levando-se em consideração a imunogenicidade e a divergência de *Trypanosoma cruzi*. Um resultado promissor (100% de sensibilidade e 100% de especificidade) foi obtido a partir de uma seleção criteriosa.

Autorização legal: Aprovado pelo comitê de ética da UFMG. Protocolo: CAAE–32343114.9.0000.5149

Palavras-chave: Imunoproteômica; Imunoinformática; Diagnóstico sorológico.

Apoio financeiro: CNPq e FAPEMIG.

Trabalho selecionado para a JNIC: UFMG.

Introdução

A Leishmaniose Tegumentar Humana (LTH) é um problema relevante no Brasil, afetando a qualidade de vida dos infectados, que geralmente são indivíduos socioeconomicamente vulneráveis¹. Caracterizada pelo parasitismo de macrófagos, é uma doença infecciosa causada por parasitos do gênero *Leishmania*, sendo o parasito *Leishmania braziliensis* a principal espécie associada². Do ponto de vista clínico, a LTH tem um amplo espectro de manifestações, dentre as quais destacam-se a cutânea localizada e a muco-cutânea³. O diagnóstico precoce é crucial para a prevenção de sequelas e para escolha da terapêutica mais adequada⁴. Atualmente, esse diagnóstico combina aspectos clínicos, epidemiológicos e testes laboratoriais⁵. Contudo, nenhum método laboratorial apresenta performance satisfatória⁶, já que apresentam problemas de sensibilidade e/ou especificidade. Ademais, no caso dos testes sorológicos, bastante utilizados pelos infectologistas, a reatividade cruzada com a doença de Chagas (DC) é um problema recorrente, pois o parasito *Trypanosoma cruzi* tem grande proximidade filogenética com parasitos do gênero *Leishmania* e, por isso, ambos compartilham grande parcela de seu proteoma. Conseqüentemente, as respostas imunológicas induzidas no hospedeiro são similares, o que afeta a especificidade dos testes sorológicos atuais, baseados em extrato bruto de *L. braziliensis*⁷. Portanto, o atual diagnóstico da LTH encontra empecilhos que dificultam sua precisão.

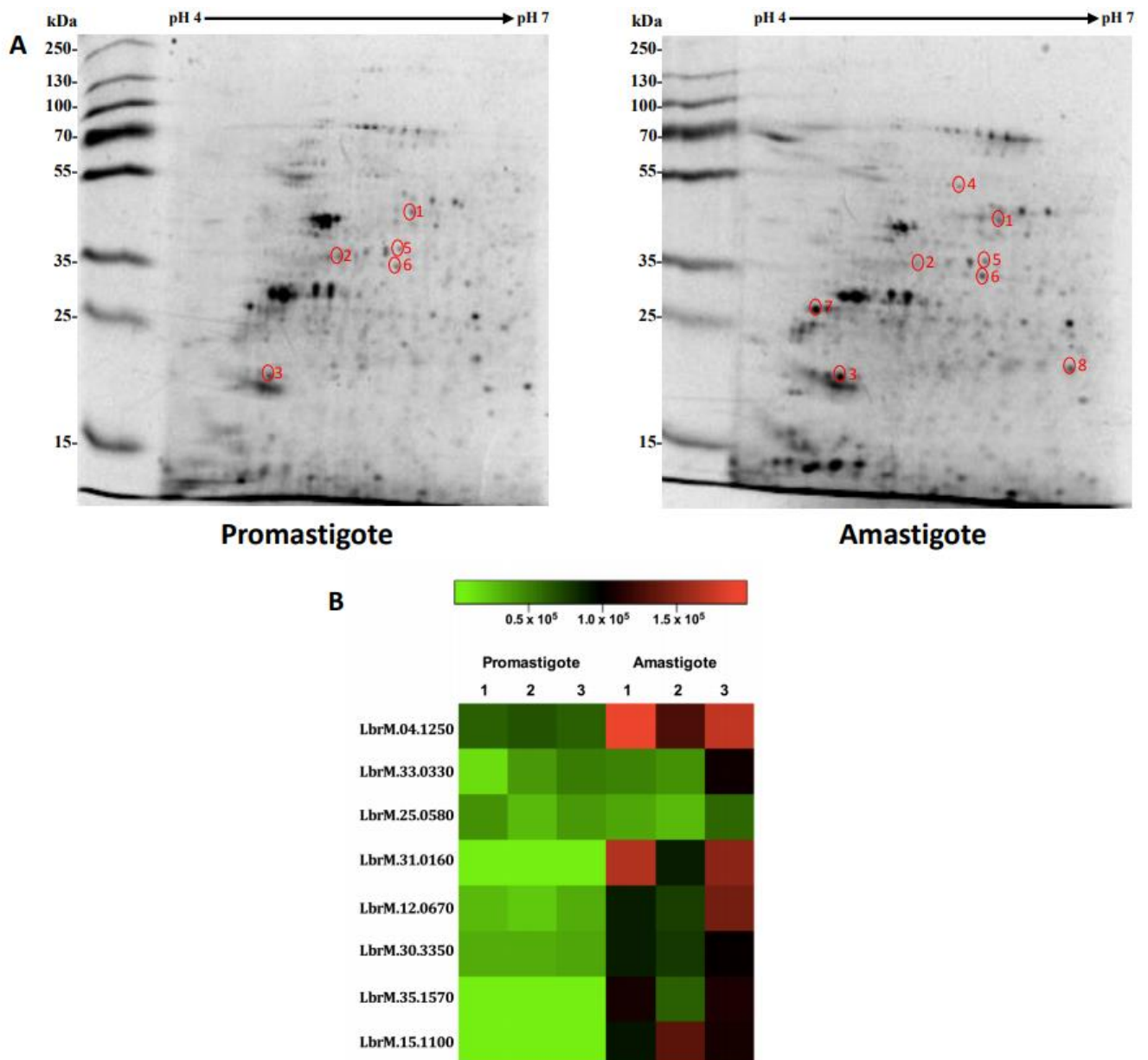
Nesse contexto, o nosso grupo buscou construir um gene quimérico composto por vários epítopos de linfócitos B, selecionados de tal maneira que o produto desse gene pudesse ser empregado em um teste sorológico de alta performance, com valores elevados de sensibilidade e especificidade, e que superasse o problema da reatividade cruzada com DC. A seleção foi feita a partir da integração de dados de imunoproteômica de *L. braziliensis* com ferramentas de imuno e bioinformática. Os critérios de seleção dos epítopos incluíram: imunogenicidade; epítopos estruturalmente lineares; proteínas expressas no principal estágio evolutivo do parasito (amastigotas), já que essas apresentem elevada exposição ao sistema imunológico do hospedeiro; divergência em relação a antígenos próprios do hospedeiro e do proteoma do parasito *T. cruzi*.

Metodologia

O estudo foi dividido em 6 etapas. (1) Primeiramente, foi feita uma eletroforese bidimensional de proteínas de *L. braziliensis* seguida de uma espectrometria de massa para caracterizar proteínas expressas nos estágios amastigota e promastigota do parasito. A partir disso, realizou-se uma análise por “heat map” avaliar a expressão proteica nos estágios evolutivos do parasito. Os géis obtidos e a análise por heat map realizada podem ser contemplados na figura 1 abaixo. (2) Em seguida, estabelece-se quatro grupos experimentais contendo soros específicos de indivíduos: positivos para LTH (n=70), divididos em leishmaniose cutânea (LC; n=35) e muco-

cutânea (LM; $n=35$); positivos para DC ($n=35$); e negativos para ambas as doenças (grupo controle, $n=35$). Utilizando os géis da etapa 1, ensaios de *western blotting* foram realizados para caracterizar quais proteínas expressas pelas amastigotas eram reconhecidas pelo soro de indivíduos dos grupos LC e LM, mas não pelos grupos controle e DC. (3) A partir de ferramentas de imunoinformática, análises *in silico* foram empregadas para identificar potenciais epítomos de linfócitos B presentes nas proteínas selecionadas. (4) Os epítomos selecionados na etapa anterior foram, então, comparados com dados proteômicos de *T. cruzi* e *Homo sapiens*, excluindo-se regiões de similaridade e ranqueando-os em relação à especificidade para a LTH. (5) Depois disso, elaborou-se o gene codificador da proteína quimérica para posterior clonagem e expressão recombinante em laboratório. A montagem do gene foi feita pela empresa GenScript company (New Jersey, USA). Para a clonagem e expressão, utilizou-se a bactéria eletrocompetente *Escherichia coli* BL21 Arctic Express (DE3). A incorporação do plasmídeo foi confirmada por meio de PCR utilizando primers T7. As bactérias foram cultivadas em meio 2xYT, e a indução da expressão da proteína quimérica foi realizada por meio da adição de IPTG aos meios de cultura. Após incubação e expressão, as bactérias foram rompidas por sonicação e os *debris* celulares removidos por centrifugação. A partir do sobrenadante, a proteína quimérica foi purificada dos demais componentes solúveis por meio de coluna cromatográfica de níquel pelo método *His-Tag*. (6) Por fim, a proteína quimérica purificada foi empregada na sensibilização de placas de ELISA (adsorção) e testada para avaliação da performance, comparando-a com o antígeno solúvel de *L. braziliensis* (SLA, do inglês), um extrato bruto do parasito que apresenta desempenho equiparável aos testes sorológicos empregados atualmente na clínica. Tanto a proteína quimérica como o antígeno solúvel foram testados com soros de pacientes dos quatro grupos, avaliando-se o desempenho principalmente quanto à sensibilidade e a especificidade para *L. braziliensis*.

Figura 1. A. Gel bidimensional de extrato bruto de promastigota e amastigota de *L. braziliensis*. B. Análise da expressão protéica por “heat map” nos dois principais estágios evolutivos do parasito.



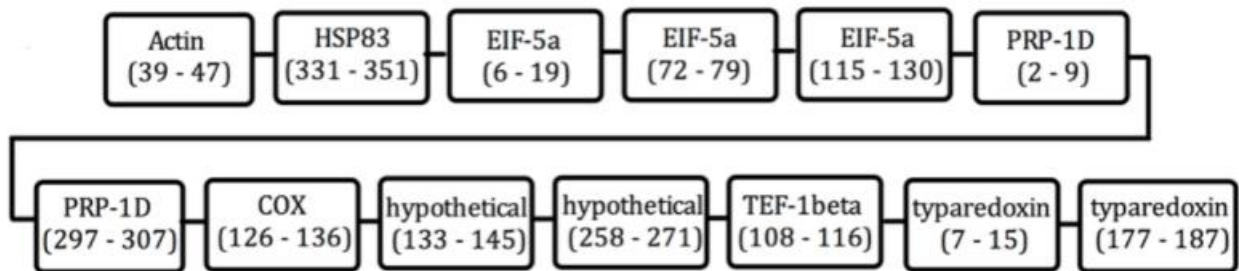
Resultados e Discussão

Elaboração da proteína quimérica:

Baseado na análise por *Heat map* e considerando que as proteínas expressas no estágio amastigota possuem epítomos mais sensíveis à titulação de anticorpos — devido ao maior contato desses epítomos com o sistema imune do hospedeiro e à maior probabilidade de induzirem uma resposta imune humoral, o que aumentaria a sensibilidade do teste para a LTH — selecionou-se 8 proteínas de *L. braziliensis* expressas em amastigotas e reconhecidas por LC e LM, ao mesmo tempo em que não eram reconhecidas por DC e pacientes do grupo controle. As 8 proteínas selecionadas foram: actin (LbrM.04.1250); heat shock protein 83- 1 (LbrM.33.0330); eukaryotic initiation factor 5a, putative (LbrM.25.0580); paraflagellar rod protein 1D (LbrM.31.0160); cytochrome oxidase subunit IV, putative (LbrM.12.0670); MORN repeat-containing protein 1 (LbrM.30.3350); translation elongation factor 1-beta, putative (LbrM.35.1570); tryparedoxin peroxidase (LbrM.15.1100).

Com as análises de imunoinformática, foi caracterizado um total de 22 potenciais epítomos de linfócitos B a partir dessas 8 proteínas. Posteriormente, a partir da análise por bioinformática e comparação com dados proteômicos de *T. cruzi* e *H. sapiens*, excluiu-se 9 epítomos que apresentaram elevada similaridade com *L. braziliensis* (*T. cruzi* variando de 78,7% a 100% de similaridade e *H. sapiens* variando de 63,3% a 100% de similaridade). Portanto, restaram 13 epítomos para inclusão e composição da proteína quimérica. Adicionalmente, na proteína quimérica elaborada, que apresentou um total de 221 aminoácidos, adicionou-se sequências espaçadoras entre os epítomos de forma estratégica para aumentar a solubilidade em água e o reconhecimento pelos anticorpos, além de uma cauda de histidina (6xHis) para a purificação em coluna de níquel. A figura 2 apresenta a estrutura da proteína quimérica após seleção dos epítomos.

Figura 2. Epítomos de linfócitos B utilizados na proteína quimérica.



Performance e comparação com antígeno solúvel de *L. braziliensis*

Quando empregada em testes de ELISA, a proteína quimérica reconheceu todas as amostras positivas de soro para LTH (LC+ LM = 70 pacientes), apresentando uma sensibilidade de 100%. Por outro lado, para o antígeno solúvel, uma sensibilidade de 64,29% foi encontrada. Dessa forma, o valor preditivo positivo (VPP) para a proteína quimérica foi máximo, ao passo que para o antígeno solúvel o VPP foi de 65,2%. Com relação à especificidade, a proteína quimérica apresentou 100% de especificidade, e nenhum soro de paciente chagásico foi detectado como positivo pelo teste. Por outro lado, o antígeno solúvel apresentou uma especificidade de 65,71%. Dessa forma, o valor preditivo negativo (VPN) para a proteína quimérica foi máximo, de 100%, ao passo que o antígeno solúvel apresentou VPN de 64,78%.

Discussão:

Os testes laboratoriais são cruciais no diagnóstico da LTH. Eles podem ser divididos em dois grupos: diretos e indiretos. Os diretos incluem os testes parasitológicos, nos quais há uma pesquisa direta pela presença do parasito *L. braziliensis* em amostras teciduais. São considerados o padrão ouro atual (especificidade de 100%), mas não apresentam sensibilidade perfeita, pois, com elevada frequência, as amostras coletadas a partir de infectados podem ser não representativas da lesão, produzindo falso-negativos. Além disso, por serem invasivos, geram desconforto ao paciente. Dentro do grupo dos testes diretos há também aqueles que buscam pela presença de material genético, via PCR, nas amostras coletadas. Apesar da especificidade de 100%, esses testes também apresentam problemas com a sensibilidade, pois nem sempre é possível encontrar quantidades detectáveis do DNA do parasito nas biópsias colhidas. Por outro lado, os testes de identificação indireta buscam pela presença ou não de uma resposta imunológica desenvolvida, que deve estar presente nos pacientes positivos. Eles funcionam principalmente por meio da detecção de anticorpos Anti-*L. braziliensis* no soro de indivíduos infectados, e incluem os testes de Imunofluorescência Indireta, *Western-blotting* e ELISA. Apesar de mais amplamente utilizados e mais acessíveis, apresentam problemas de sensibilidade e, especialmente, de especificidade. Vários antígenos de *L. braziliensis*, quando utilizados para captura e detecção de anticorpos no soro de infectados, não são tão eficientes. Isso acontece pois existe uma grande proximidade filogenética entre *L. braziliensis* e *T. cruzi*⁷, o que faz com que anticorpos anti-*T. cruzi* sejam detectados por testes sorológicos que, em teoria, deveriam ser específicos para a LTH. Portanto, a utilização de extrato bruto de *L. braziliensis* na sensibilização das placas implica perda de especificidade. Num quadro geral, tudo isso contribui para a ineficiência do diagnóstico da LTH.

Nesse cenário, a elaboração de uma proteína quimérica recombinante para ser empregada como antígeno em testes sorológicos se apresentou como uma alternativa promissora na obtenção de um teste com excelente desempenho. Em primeiro lugar, a boa seleção dos epítomos por meio de estratégias e critérios bem definidos foi crucial para a obtenção dos bons valores de sensibilidade e especificidade observados para a quimera. Antígenos expressos na etapa amastigota do ciclo do parasito estão em maior contato com o sistema imune do hospedeiro, e, portanto, são mais prováveis de induzir uma resposta imune humoral. Portanto, detectariam melhor esses anticorpos no soro de pacientes infectados. Assim, a escolha de epítomos a partir de proteínas expressas no estágio amastigota, considerando a antigenicidade e também avaliando-se a divergência com proteínas do hospedeiro, foi determinante para a sensibilidade de 100% da quimera. Por outro lado, a seleção criteriosa de epítomos estritamente restritos a *L. braziliensis* por meio da comparação com dados proteômicos de *T. cruzi* permitiu uma especificidade de 100% em relação à DC, superando o problema da reatividade cruzada com anticorpos anti-*T. cruzi*. Durante o processo de elaboração da quimera, a integração dos dados de imunoproteômica com a imunoinformática/bioinformática foi essencial na seleção e caracterização dos epítomos para composição do gene quimérico, ilustrando o potencial tecnológico da integração estratégica de técnicas científicas com sistemas computacionais. A tabela 1 compara o desempenho da proteína quimérica com os diferentes métodos laboratoriais, diretos e indiretos, disponíveis (exceto o teste da intradermoreação de Montenegro, que foi retirado do mercado) para o diagnóstico da LTH.

Tabela 1. Especificidade e sensibilidade dos testes laboratoriais, diretos e indiretos, empregados no diagnóstico sorológico da LTH: comparação com a proteína quimérica.

Tipo de diagnóstico	Teste	Especificidade (%)	Sensibilidade (%)
Direto	Histopatológico	≅100 [1]	15 a 30 [2,3]
	Cultivo celular	≅ 100 [4,5]	44 a 58 [2,3]
	Inoculação em animais de laboratório	≅ 100 [4,5]	38 a 52 [2,3]
	PCR	50 [6]	81.5 [7], 97.1 [8] e 100 [9]
Indireto	Intradermoreação de Montenegro	75% [4] e 93.9 [10]	60 a 88 [11,12]
	Imunofluorescência Indireta	81 [13]	27.7 [14], 41.4 [2] e 88.5 [15]
	Agglutinação direta	91.8 [16]	90.5 [16]
	ELISA utilizando SLA	65.71	64.29
	Outros ELISAs*	93.9 [17]	66.9 [14], 100 [17]
	Proteína Quimérica	100	100

Conclusões

Diante dos dados de performance obtidos, o presente trabalho desenvolveu, a partir de uma estratégia racional para obtenção de antígenos, uma ferramenta diagnóstica extremamente efetiva, que tem potencial de substituir os testes atuais e solucionar os principais problemas associados ao diagnóstico laboratorial da LTH. Adicionalmente, o produto biotecnológico possui perspectiva para implementação comercial e utilização no Sistema Único de Saúde, evidenciando o potencial tecnológico da integração entre técnicas imunológicas e análises de bioinformática. Além disso, um diagnóstico preciso da LTH garante a prevenção de sequelas, que afetam sobretudo populações mais vulneráveis socioeconomicamente. Nesse sentido, o presente trabalho também se propõe como uma ferramenta com potencial de melhorar a qualidade de vida das pessoas que vivem nas áreas endêmicas para a LTH.

Referências bibliográficas

1. Ashford RW. 2000. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 30: 1269-1281.
2. Indiani de Oliveira C, Teixeira MJ, Teixeira CR, Ramos de Jesus J, Bomura Rosato A, Santa da Silva J, Brodskyn C, Barral-Netto M, Barral A. 2004. *Leishmania braziliensis* isolates differing at the genome level display distinctive features in BALB/c mice. *Microbes Infect* 6: 977-984.
3. de Almeida MC, Vilhena V, Barral A, Barral-Netto M. 2003. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 861-870.
4. Boaventura VS, Cafe V, Costa J, Oliveira F, Bafica A, Rosato A, de Freitas LA, Brodskyn C, Barral-Netto M, Barral A. 2006. Concomitant early mucosal and cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 75: 267-269.
5. Goto H, Lindoso JA. 2010. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8: 419-433.
6. Gomes CM, de Paula NA, Cesetti MV, Roselino AM, Sampaio RN. 2014a. Mucocutaneous leishmaniasis: accuracy and molecular validation of noninvasive procedures in a *L. (V.) braziliensis*-endemic area. *Diagn Microbiol Infect Dis* 79: 413-418.
7. Malchiodi EL, Chiamonte MG, Taranto NJ, Zwirner NW, Margni RA. 1994. Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp; use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (Ag163B6). *Clin Exp Immunol* 97: 417-423.