

LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: NOVOS ANTÍGENOS PARA DIAGNÓSTICO E VACINAS

Ana Paula Fernandes¹, Héli da Monteiro Andrade²
Maria Norma Melo², Eduardo Antonio Ferraz Coelho³
Daniel Avelar⁴, Ricardo Tostes Gazzinelli^{5,6}

A Leishmaniose visceral zoonótica, causada por *Leishmania infantum*, é uma doença emergente em países do Mediterrâneo e das Américas. Cães constituem-se no principal hospedeiro e reservatório urbano, e a eutanásia de cães soropositivos tem sido adotada como medida de controle. Entretanto, essa medida falha devido, em parte, à baixa sensibilidade de testes de diagnóstico. Medidas que visem a redução da transmissão e aplicação dessas de forma integrada tornam-se fundamentais, como o diagnóstico precoce e de alta sensibilidade dos cães infectados, o tratamento eficaz e o emprego de vacinas. Entre os antígenos disponíveis, A2 se apresentou como um candidato com potencialidade, tendo sido gerados, por nosso grupo de pesquisa, vários reagentes a partir desse com aplicação em vacinas e diagnóstico (FERNANDES *et al.*, 2013). Não obstante, faz-se ainda necessário identificar outros antígenos de *L. infantum* para aprimorar as vacinas e as alternativas de diagnóstico. Certamente, o uso de análises genômicas e proteômicas é promissor para se alcançar tal objetivo. Aplicamos, portanto, essas análises para a identificação de novos antígenos de *L. infantum*.

Análises imunoproteômicas

A expressão diferencial de proteínas entre formas amastigotas e promastigotas de

L. infantum foi analisada por DIGE (COSTA *et al.*, 2011). Um total de 113 “spots” foram extraídas dos géis: (i) 56 somente das formas promastigotas; (ii) 43 somente de amastigotas; (iii) 14 presentes em extratos de ambos os estágios foram selecionados e identificados por MS. Todos os 56 pontos selecionados das formas promastigotas correspondiam a 25 diferentes proteínas de *Leishmania*. Dos 43 pontos de amastigotas, 18 proteínas foram identificadas, e somente 5 são derivadas de *Leishmania*. Outras 10 proteínas têm expressão semelhante em ambos os estágios. Além da análise em amastigotas teciduais, foi avaliada a reatividade de soros de cães ante proteínas expressas por amastigotas axênicas (COELHO *et al.*, 2011). Aproximadamente, 550 “spots” foram detectados e 106 proteínas identificadas por MALDI/TOF-TOF. Em promastigotas, 6 proteínas conhecidas e 2 hipotéticas foram reconhecidas somente por soros de cães assintomáticos, 16 proteínas conhecidas e 6 hipotéticas foram reconhecidas por soros de cães sintomáticos e 12 proteínas conhecidas e 5 hipotéticas por ambas as classes de soros. Entre as proteínas identificadas em extratos de amastigotas, 5 proteínas conhecidas e 2 hipotéticas foram identificadas pelos soros de animais assintomáticos; 27 proteínas conhecidas e 11 hipotéticas pelos soros de animais sintomáticos e 2 proteínas

¹ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais

anav@uai.com.br;
apfernandes.ufmg@gmail.com

² Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

³ Colégio Técnico, Universidade Federal de Minas Gerais

⁴ Fundação Ezequiel Dias

⁵ Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

⁶ Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais

conhecidas e 3 hipotéticas pelos soros de ambas as classes. Os resultados obtidos com base nessas análises representam enorme quantidade de dados disponíveis para análises funcionais e estruturais da biologia do parasito e para o desenvolvimento de vacinas e testes de diagnóstico.

Predição de epítomos e antígenos vacinais

Todas as proteínas identificadas foram rastreadas *in silico* para potenciais epítomos de células T. Também foi testada a habilidade de cada peptídeo/proteína se ligar a supertipos de HLA (A1, A2, A3, A24, B7, B8, B27, B44, B58 e B62). Em média, 78% dos peptídeos preditos foram encontrados ligados a somente um supertipo, 16,6% dos peptídeos reagiram a dois HLAs, 4,3% peptídeos, a três HLAs, e 0,06% dos peptídeos, a cinco supertipos. Similarmente, várias proteínas hipotéticas expressas em amastigotas axênicas foram submetidas à predição. Proteínas e peptídeos com maior potencial de ser reconhecidos como epítomos para células CD8⁺ T merecem estudos aprofundados como candidatos a vacinas. Para tal, estamos desenvolvendo uma plataforma de avaliação e validação da predição de epítomos. Os peptídeos preditos são empregados para a estimulação de células, seguidos de análise de proliferação celular e dosagem de citocinas por citometria de fluxo. As proteínas com maior potencial foram selecionadas para clonagem, expressão e testes vacinais. Entre os antígenos testados até o momento, uma proteína amastigota específica, da superfamília das ferro-oxigenases, demonstrou capacidade de induzir resposta imune protetora contra a infecção por *L. infantum* em camundongos BALB/c (TAMIETTI *et al.*, 2013). Foram também avaliadas proteínas espécie características de *L. donovani* ou que estão associadas à capacidade de visceralização dos parasitas. Resultados preliminares indicam que pelo menos uma dessas

proteínas foi capaz de induzir proteção em camundongos BALB/c vacinados contra a infecção por *L. infantum*.

Aprimoramento do diagnóstico sorológico

Foram testados por ELISA os peptídeos e suas combinações derivados da predição de epítomos para células B (FARIA *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2011, 2012). Investigamos a reatividade de peptídeos com soros de cães parasitologicamente positivos ou negativos, incluindo amostras classificadas em baixo, intermediário e alto títulos de anticorpos (COSTA *et al.*, 2012). Alta sensibilidade (100%) foi observada com vários peptídeos para detectar a infecção em cães com alto título de anticorpos. Entretanto, sensibilidades mais baixas foram observadas quando testadas com soro de cães com título baixo e intermediário. Testamos a hipótese de que a sensibilidade para detectar LV em cães com títulos baixo e intermediário de anticorpos aumentaria ao combinarmos peptídeos na mesma reação. Aumento significativo de sensibilidade foi obtido com a combinação entre os peptídeos (COSTA *et al.*, 2011; FUMAGALLI *et al.*, 2013). No momento, as proteínas recombinante e quimeras que contêm os epítomos identificados obtidas estão sendo avaliadas em ELISA e em testes imunocromatográficos rápidos.

Conclusão

Foi gerada um considerável volume de informação relacionada a potenciais novos antígenos de *L. infantum*, indicando que o desenvolvimento racional de testes diagnósticos e vacinas é uma estratégia promissora. O conhecimento obtido constitui base sólida para o desenvolvimento de vacinas e testes de diagnóstico, ao identificar e avaliar novos antígenos, especialmente aqueles relacionados a moléculas estágio/espécie-específicos, que apresentam epítomos relevantes ou relacionadas à visceralização dos parasitos. ■