

PURIFICAÇÃO DE ANTÍGENOS IMUNOGÊNICOS DE *L. CHAGASI* POR CROMATOGRAFIA DE IMUNOAFINIDADE (IgG1/IgG2a) ANTI- LRPS (PROTEÍNAS RIBOSSÔMICAS DE LEISHMANIA)

Coelho, V.T.S.¹, Silva, J.A.², Reis, T.A.R.², Figueiredo, J.E.F.³, Santoro, M. M.⁴, Coelho, E.A.F.⁵

¹ Acadêmico do curso de Medicina da Faculdade de Saúde e Ecologia Humana (FASEH)

² Acadêmico do Curso de Medicina da Faculdade de Minas (FAMINAS), Belo Horizonte - MG

³ Pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS), Núcleo de Estresse Biótico, Sete Lagoas - MG

⁴ Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) - Departamento de Bioquímica e Imunologia -

† In memoriam

⁵ Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG/COLTEC)

RESUMO

As leishmanioses são doenças causadas por parasitos protozoários do gênero *Leishmania*, sendo consideradas como uma das seis doenças tropicais negligenciadas mais importantes na atualidade. Além disso, apresentam alta incidência e grande número de pessoas estão expostas ao risco de infecção em todo o mundo. Evidências sugerem que Proteínas Ribossomais de *Leishmania* (LRPs) são moléculas imunologicamente relevantes na infecção humana e canina por esse protozoário. O objetivo deste trabalho foi purificar antígenos de LRPs, previamente selecionados por cromatografia de imunoafinidade, com possibilidades de induzir respostas TH1 e TH2 para posteriores testes imunológicos em modelos murinos e desafiá-los contra o parasita. O experimento constitui na preparação e extração das proteínas ribossômicas de *L. chagasi* a partir de formas promastigotas, seguido da produção de anticorpos anti LRPs em coelho, purificação das subclasses de imunoglobulinas de interesse e titulação dessas por ELISA. Posteriormente, as imunoglobulinas foram ligadas a resinas de sepharose e construídas duas colunas de imunoafinidade. Após a construção dessas colunas, duas frações de proteínas específicas de antígeno solúvel de *L. chagasi* foram purificadas. Após ensaios realizados pôde-se observar a capacidade do método apresentado em purificar as proteínas alvo que apresentaram elevada reatividade frente às LRPs, quando comparadas ao soro controle proveniente do coelho não imunizado. Dessa forma, essas proteínas antigênicas podem se constituir em potenciais ferramentas para o desenvolvimento de vacinas frente a *L. chagassi*.

Palavras-Chave: leishmania, leishmaniose, vacina, Proteína Ribossomais, Proteínas imunogênicas de leishmaniose.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania* and is considered one of the six most neglected tropical diseases today. In addition, they have high incidence and large numbers of people are exposed to the risk of infection worldwide. Evidence suggests that Ribosomal *Leishmania* Proteins (LRPs) are immunologically relevant molecules in human and canine infection by this protozoan. The objective of this work was to purify antigens from LRPs, previously selected by immunoaffinity, with the possibility of inducing TH1 and TH2 responses for later immunological tests in murine models and challenging them with the parasite. The experiment consisted in the preparation and extraction of *L. chagasi* ribosomal proteins from promastigotes, followed by the production of anti-rabbit LRPs, purification of immunoglobulin subclasses of interest and titration by ELISA. Subsequently, immunoglobulins were ligated to sepharose resins and two immunoaffinity columns were constructed after the construction of these columns, two fractions of purified *L. chagasi* soluble antigen-specific proteins. After the experiments, it was possible to observe the ability of the present method to purify the target proteins, which showed high reactivity to the LRPs when compared to the control sera from the unimmunized rabbit. In this way, these antigenic proteins are potential tools for the development of vaccines against *L. chagasi*.

Keywords: *Leishmania*, Leishmaniasis, vaccine, ribosomal proteins, immunogenic leishmaniasis proteins.

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças causadas por parasitos protozoários do gênero *Leishmania*, sendo consideradas como uma das seis doenças tropicais negligenciadas mais importantes na atualidade. Além disso, apresentam alta incidência e grande número de pessoas estão expostas ao risco de infecção em todo o mundo ¹.

O Brasil apresenta o maior número de casos de Leishmaniose Canina na América do Sul. Até a década de 50, a maioria dos casos se concentrava nos estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Ceará e Pernambuco, devido ao desmatamento e novos assentamentos realizados nessas localidades. Com a expansão das atividades rurais, as leishmanioses passaram a ser registradas também em outras áreas^{2,3}

Evidências sugerem que Proteínas Ribossomais de *Leishmania* (LRPs) são moléculas imunologicamente relevantes na infecção humana e canina por esse protozoário. Durante a infecção pela espécie *L. infantum*, níveis elevados de anticorpos específicos a proteínas altamente conservadas em *Leishmania* são encontrados, dentre as quais se destacam a proteína de choque térmico de 70 kDa (hsp70), a histona H2A e proteínas ácidas ribossomais. Verificou-se que as LRPs são importantes para o desenvolvimento da doença no hospedeiro mamífero, sendo consideradas “pato-antígenos”, pois induzem respostas celular e humoral que se relacionam com o fenótipo da doença no hospedeiro ⁴.

Estudos utilizando as LRPs de *L. Major*, como antígeno vacinal em camundongos demonstraram que as mesmas foram capazes de induzir proteção contra a infecção experimental com a mesma espécie ⁵

A resposta imune à infecção por *Leishmania* é mediada, principalmente, por resposta celular, e o resultado clínico é dependente principalmente de respostas auxiliares T CD4+: Th1 ou Th2. Uma resposta Th1 é mediada, principalmente, por interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e interleucina 12 (IL-12), estando associada com a resolução e resistência à doença. Já resposta do tipo Th2 com produção de interleucinas (IL-4) e (IL-10), confere susceptibilidade e progressão da doença no hospedeiro. Estas respostas imunes respondem pelo espectro clínico diversificado, principalmente de CL. As lesões localizadas de auto-cicatrização têm perfil predominantemente Th1 de citocinas, enquanto que as respostas mediadas por Th2 caracterizam-se por lesões difusas e não cicatrizantes. A LCM demonstra uma resposta mista, mas com uma predominância Th1, que pode explicar tanto a atividade inflamatória agressiva como a cronicidade ⁶

Os macrófagos estimulados com IFN- γ e IL-12 tornam-se ativados e expressam níveis elevados de óxido nítrico sintase induzível (iNOS). A síntese de óxido nítrico (NO) por iNOS é essencial para a eliminação de parasitos de macrófagos, uma vez que a ausência de iNOS por deleção genética provoca repulsão incontrolável e lesões ulcerativas no local da infecção. Por outro lado, os macrófagos estimulados com IL-4 e IL-10 expressam altos níveis

de arginase e são denominados “alternativamente ativados”⁷

Um indicativo da geração da resposta imune do tipo Th1 ou Th2 em camundongos BALB/c, diz respeito à produção dos isotipos de imunoglobulinas (IgG's) IgG1 e IgG2a. Citocinas secretadas por células do sistema imune, tais como os linfócitos T, atuam sobre linfócitos B induzindo a mudança dos isotipos dos anticorpos IgGs produzidos por tais células. Nessa linhagem de camundongos, a citocina IL-4 induz, preferencialmente, a produção de IgG1, enquanto que o IFN- γ induz a produção de IgG2a⁸

Devido à similaridade das LRPs dentre as diferentes espécies conhecidas e a resposta imune à infecção, estimulam considerar a possibilidade do uso destas proteínas em protocolos vacinais refinados, para verificação da eficácia protetora induzida contra diferentes espécies do gênero *Leishmania*. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo purificar antígenos de LRPs, previamente selecionados por cromatografia de imunoafinidade, com potencialidade de induzir respostas TH1 e TH2 para posteriores testes imunológicos em modelos murinos e desafiá-los com o parasita.

1. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

2.1 - Detalhamento

A figura 1 demonstra o delineamento experimental do trabalho realizado. O experimento constituiu-se na preparação e extração das proteínas ribossômicas de *L. chagasi* a partir de formas promastigotas, seguido da produção de anticorpos anti LRPs em coelho, purificação das subclasses de imunoglobulinas de interesse e titulação dessas por ELISA. Posteriormente, as imunoglobulinas foram ligadas a resinas de sepharose e construídas duas colunas de imunoafinidade. Após a construção dessas colunas, duas frações de proteínas específicas de antígeno solúvel de *L. chagasi* forma purificadas.

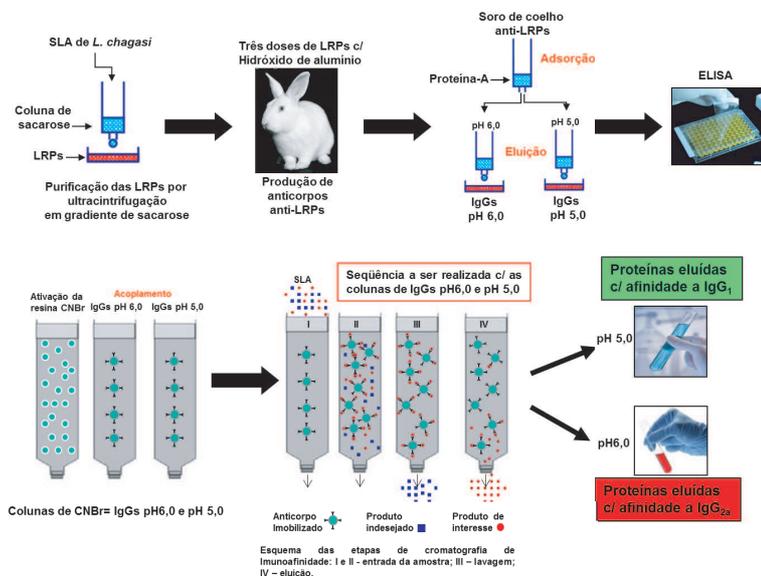


Figura 1 – Detalhamento experimental. Início da purificação das LRPs até a purificação dos antígenos de interesse em colunas de imunoafinidade de IgG1 (pH 6.0) e IgG2a (pH 5.0).

2.2 - PARASITAS

A amostra MHOM/BR/1970/BH46 de *L. chagasi* foi cedida pelo Departamento de Parasitologia (ICB/UFMG). Os parasitas foram cultivados em meio Schneider's completo acrescido com 20 % de Soro Fetal Bovino inativado, 20 miliMolar (mM) de L-glutamina, 50 microgramas por mililitro ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de gentamicina, 200 unidades por mL de penicilina e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina, em pH 7,4.

Os parasitas permaneceram em cultivo a 24°C em estufa de CO₂, sendo que repiques das culturas foram efetuados de cinco em cinco dias. Foram feitos estoques de parasitas congelados em glicerol estéril e armazenados em nitrogênio líquido.

2.3 - PREPARAÇÃO DO EXTRATO PROTEICO SOLÚVEL DE *LEISHMANIA*

A amostra de *L. chagasi* foi cultivada em meio de cultura Schneider's completo e incubada a 24°C. Decorridos alguns dias de cultivo e constatadas a viabilidade e ausência de agentes contaminantes, os parasitas foram quantificados em câmara de Neubauer, sendo ajustadas para a concentração de 2×10^8 promastigotas por mL.

Para o preparo do extrato solúvel de formas promastigotas em fase estacionária de crescimento, os parasitas foram recuperados por centrifugação a 2900 G por 20 minutos e lavados por quatro vezes em salina estéril tamponada com fosfato. O

sedimento foi ressuspensionado em cinco mililitros (mL) de PBS e submetido a seis ciclos de choque térmico, com congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C.

A fração antigênica solúvel foi coletada após centrifugação (6000 *G* por 20 min) e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford. As amostras foram armazenadas em alíquotas a -70°C, até o momento do uso.⁹

Para o preparo das formas *like*-amastigotas, os parasitas (na concentração de 2x10⁸ parasitas por mL) foram cultivados em soro fetal bovino inativado e incubados a 34°C por 48 h. Em seguida, os mesmos foram recuperados por centrifugação, lavados em PBS 1x estéril por três vezes e ressuspensionados para utilização nos experimentos.

2.4 - PREPARO DAS PROTEÍNAS RIBOSSOMAIS DE *L. CHAGASI*

O preparo de LRPs de *L. chagasi* foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Iborra et al. (2008), com algumas modificações: cerca de 10¹⁰ promastigotas, em fase estacionária de crescimento de *L. Chagasi*, foram preparadas após cultivo a 24°C e quantificadas em câmara de Neubauer.

Os parasitas foram recuperados por centrifugação a 2.900 *G* por 20 min e lavados em PBS 1x estéril a 4°C, por três vezes. Após, o pellet foi ressuspensionado com 3.0 mL do tampão B1 (200 mM Tris-HCl pH 7.4, 40 mM KCl e 25 mM MgCl₂) e homogeneizado por 10 vezes, sendo, então, centrifugado por dois min a 1.960 *G* e a 4°C.

O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 9.260 *G* por 15 min a 4°C. A etapa anterior foi repetida. O sobrenadante foi coletado e ultracentrifugado a 90.000 rpm por uma hora a 4°C; retirado e armazenado a -80°C. O pellet foi ressuspensionado com 200 µL de tampão B2 (20 Mm Tris-HCl pH 7.4; 100 mM MgCl₂ e 0.5 M AcNH₄) e centrifugado em um gradiente de sacarose (preparado em tampão B2) a 90.000 rpm por duas horas a 4°C.

O sobrenadante foi coletado e o pellet lavado com PBS 1x estéril e a 4°C, sendo, então, ressuspensionado em 200 µL de PBS 1x e adicionado mais 300 µL, para volume final de 500 µL. A concentração proteica foi estimada pelo método de Bradford⁹ e as alíquotas armazenadas a -80°C.

2.5 - INDUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-LRPs EM COELHO

As proteínas ribossomais de *L. chagasi* (LRPs)

extraídas e purificadas foram utilizadas para imunização de coelhos, de cerca de dois meses. As injeções foram feitas por via subcutânea com a proteína emulsificada com um ml de hidróxido de alumínio, em todas as aplicações. Realizou-se o seguinte esquema de imunização: 1ª injeção contendo 250 µg de proteína, 1º reforço 15 dias depois com 100 µg e 2º reforço 30 dias após o primeiro com 150 µg do antígeno.

No 7º dia após o 2º e 3º reforços, coletou-se uma pequena quantidade de sangue pela orelha a partir da centrifugação a 2.500 x *G* por 10 minutos a 4°C. Os soros obtidos foram adicionados em 0.2 mM de azida sódica e armazenados a -20°C. Após a verificação do título de anticorpos, fez-se uma punção cardíaca no coelho para a obtenção de maior volume de soro.

2.6 - TITULAÇÃO DO SORO DE COELHO ANTICORPOS ANTI-LRPS

Uma placa de ELISA foi incubada a 4°C com 5.0 µg/ml de proteínas ribossômicas de *Leishmania*, em tampão carbonato-bicarbonato 0.05 M, pH 9.6, por um período de 18 h e a 4°C. Após o período de incubação, a placa foi lavada três vezes com 0.05% Tween 20/PBS, pH 7.4 (PBS-T). Cem microlitros de tampão bloqueio (10% leite desnatado em PBS-T) foram adicionados e a placa foi incubada a 37°C por uma h. Após a remoção do tampão de bloqueio, a placa foi lavada três vezes com tampão PBS-T e diluições sucessivas do soro foram adicionadas na placa e a mesma foi incubada a 37°C por uma h. Após a lavagem, o conjugado anti-IgG total de cão ligado à enzima peroxidase (1:5.000) foi adicionado na placa e a mesma incubada por mais uma hora e a 37°C.

A placa foi revelada pela adição de 100 µl de uma solução contendo *o-phenylenediamine* (OPD), H₂O₂ e tampão citrato-fosfato pH 5.0. A reação foi interrompida pela adição de 20 µl de H₂SO₄ 1 M e a absorbância foi determinada em leitor de ELISA a 492 nm.

2.7 - PURIFICAÇÃO DAS SUBCLASSES DE IGGs POLICLONAIS DE COELHO ANTI-LRPs POR CROMATOGRAFIA DE IMUNOAFINIDADE

A purificação de IgGs foi realizada em coluna de afinidade com proteína A superose HR 10/2 (1.6 ml) em sistema de FPLC. A coluna foi equilibrada em tampão 50 mM de Tris-HCL, pH 8.6 e após

o equilíbrio da coluna aplicou-se 1,0 ml do soro de coelho anti-LRPs. A coluna foi lavada com o mesmo tampão em que foram ligados os anticorpos. As subclasses de IgGs foram eluídas em diferentes tampões e pHs conforme especificações do fabricante. As subclasses de IgG1 e IgG2a foram eluídas em 50 mM de tampão acetato de sódio pH 6.0 e pH 5.0, respectivamente, coletando frações de 1,5 ml por minuto.

Realizou-se estimativa a 280 e 260 nm usando coeficiente de extinção molar de IgG (mg/ml) = $1.55 \times A_{280} - 0.76 \times A_{260}$ para a padronização dos experimentos subsequentes.

2.8 - TITULAÇÃO DAS SUBCLASSES DE IgGs

Após a purificação das subclasses de IgGs, obtidos a partir de soro de coelho imunizado com proteínas ribossômicas de um ensaio ELISA, verificou-se a reatividade das imunoglobulinas frente as LRPs de *L. chagasi*. A análise foi realizada com IgG total purificada, como controle positivo, e as subclasses de IgG1 e IgG2a em diversas diluições, sendo estas em pH 6.0 e pH 5.0. Utilizou-se, aproximadamente, 0,5 µg de LRPs para sensibilizar a placa. Como controle positivo realizamos o teste com IgG total.

2.9 - CONSTRUÇÃO DAS COLUNAS DE SEPHAROSE 4B-CNBr LIGADA A IgG1/IgG 2a

A purificação dos antígenos anti-LRPs de *L. chagasi* foi realizada em duas colunas: consistiram na preparação de imunoafinidade Sepharose 4B ativada com Brometo de Cianogênio (Sepharose 4B-CNBr) ligada a IgG1 e IgG 2a de *L. chagasi*. Essas IgGs foram ligadas à Sepharose 4B-CNBr de acordo com as recomendações do fabricante (Amersham Pharmacia).

Foram utilizados 3 g da resina Sepharose 4B – CNBr ressuspensa em HCl 1mM e centrifugada a 3000 g durante 15 minutos a 4°C, por cinco vezes, descartando-se o sobrenadante. Após essa etapa, a resina foi lavada com carbonato de sódio 0,1M pH 8,3 contendo NaCl 0,5M (tampão de ligação) e centrifugada duas vezes a 3000 g, durante 15 minutos. Aproximadamente 8 mg de IgG1 e 20 mg de IgG2a foram utilizados para o acoplamento na resina.

As subclasses de IgGs foram acrescidas à resina

agitando lentamente em um rotatório por 24 horas à 4°C e posteriormente centrifugada a 3000 g por cinco minutos a 4°C. O controle da eficácia de ligação das moléculas à coluna foi feito pela leitura do sobrenadante a 280 nm em espectrofotômetro. Em seguida, foi adicionada à resina Etanolamina 1M pH 8,0 com a finalidade de bloquear os sítios de ligação que permanecem ativos na resina, agitando lentamente em um rotatório a temperatura ambiente por duas horas. Após esse período, a resina foi colocada em uma coluna de 10 cm e lavada cinco vezes alternadamente com 50 mL de Tampão Acetato 0,1M pH 4,0 contendo NaCl 0,5 M e com Tampão de ligação.

2.10 - PURIFICAÇÃO E SDS-PAGE DAS FRAÇÕES IMUNOGÊNICAS DE LRPs DE L. CHAGASI.

As colunas de Proteína A ligadas às subclasses de IgGs purificados anti-LRPs de *L. chagasi*, vasorum foram equilibradas com 20 mL de Tampão Tris-HCl 0,1M pH8.3 e o antígeno bruto solúvel na concentração de 4,5 mg de proteína foi aplicado em cada coluna. Após a adição do antígeno, a coluna foi agitada lentamente por 24 horas a 4°C. Após recolher o antígeno inespecífico, a coluna foi lavada com 50 mL de Tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,3. A eluição dos antígenos específicos de *L. chagasi* acoplados a resina, foi realizada utilizando-se um Tampão de Eluição, ácido cítrico 0,15 M pH 3.0, onde foram coletados frações de 2 mL. O controle da eluição foi feito pela leitura dos eluatos a 280 nm em espectrofotômetro. Após a coleta, a coluna foi regenerada com 20 mL de Tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0. As proteínas eluídas foram concentradas por liofilização. Os liofilizados foram solubilizados em água Milli-Q e as concentrações proteica foram estimadas, resolvidas em SDS-PAGE e estocadas a - 20° C.

3.0 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - PURIFICAÇÃO DAS LRPs DE L. CHAGASI

Como a literatura que trata do tema menciona proteínas ribossômicas de *Leishmania* (LRPs) possuem atividade antigênica e imunogênica, aquelas mais relevantes deste trabalho foram purificadas e

identificadas individualmente e para tal foi utilizado o protocolo descrito por Soto ¹⁰.

A complexidade das proteínas ribossomais de *L. chagasi* foi inicialmente analisada por gel SDS-PAGE 12% (Figura 2). A análise revelou a existência de um perfil de bandas mais simples na fração ribossômica em relação ao extrato solúvel dos parasitas e à fração citoplasmática, correspondente a uma das etapas da purificação. Realizou-se uma comparação com o perfil das LRP's já descritas na literatura¹⁰ e o perfil mostrou semelhança entre as mesmas (dados não mostrados); o que possibilitou verificar a eficácia da metodologia empregada.

Na fração ribossômica, constatou-se a presença de proteínas de baixo e médio pesos moleculares, de 15 a 60 kDa, e um fato relevante na literatura corresponde a que a incluem proteínas nessa faixa de peso molecular (Figura 2). Assim, infere-se que o método utilizado para purificar as LRP's de *L. chagasi* se mostrou rápido e com grande reprodutibilidade.

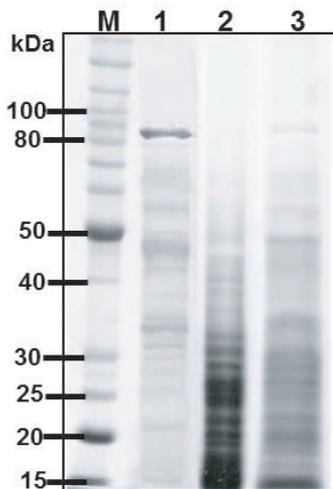


Figura 2. Purificação da Proteína Ribossômicas de *L. chagasi*. As amostras foram resolvidas em SDS-PAGE 12 % e coradas por Comassie Blue G-250. A primeira coluna corresponde ao marcador de peso molecular (M). Em (1) extrato solúvel de *L. chagasi*, (2) fração das proteínas ribossômicas (LRP's), (3) fração das proteínas citoplasmática.

3.2- TITULAÇÃO DO SORO DE COELHO SENSIBILIZADO COM LRP's DE *L. CHAGASI*

Após as induções em coelho para a produção de anticorpos anti-LRP's de *L. chagasi*, o soro foi coletado e analisado por ELISA. A análise foi efetuada com

soro pré-imune e com amostras de soro obtidas após a segunda e terceira doses dos imunógenos. Como pode ser observado, o soro do coelho imunizado apresentou elevada reatividade frente às LRP's, quando comparado ao soro controle proveniente do coelho não imunizado (figura 3).

As LRP's utilizadas se mostraram imunogênicas e induziram elevada produção de anticorpos específicos. Conforme o gráfico abaixo (figura 3), a terceira dose foi a de maior resposta imunogênica, pois aumentou significativamente a produção de anticorpos em relação à segunda dose do imunógeno. A titulação dos anticorpos possibilitou realizar uma punção cardíaca no coelho para a obtenção de maior volume de soro e possibilitar a continuidade do trabalho.

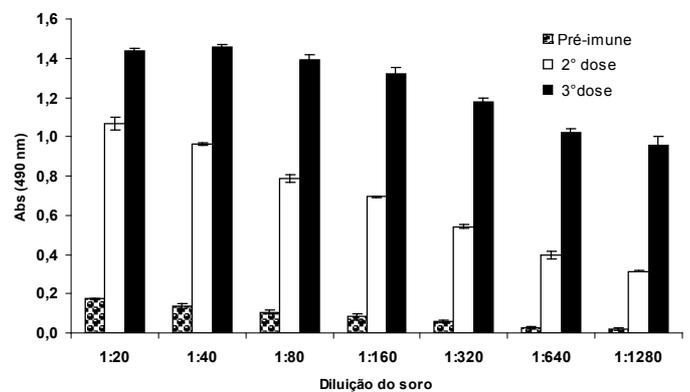


Figura 3 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) com soro anti-LRP's de *L. chagasi* produzido em coelho. Uma curva de titulação foi realizada com as amostras de soro (1:20 a 1:1280). Foi utilizado 0,5 µg de LRP's de *L. chagasi* purificadas anteriormente para a sensibilização da placa.

3.3- PURIFICAÇÃO DAS SUBCLASSES DE IGgS POLICLONAIS DE COELHO ANTI-LRP's POR CROMATOGRAFIA DE IMUNOAFINIDADE

A purificação das subclasses de IGg's anti-LRP's de *L. chagasi* teve como objetivo a eliminação de anticorpos inespecíficos, visando posteriormente, a purificação de antígenos específicos de *L. chagasi*.

A constatação de que a recuperação de uma primeira infecção confere proteção contra uma re-infecção sugere que o controle das leishmanioses mediante vacinação é possível. Além disso, muitas evidências a partir de estudos com modelos experimentais indicam que a proteção pode ser gerada pela imunização com antígenos do parasito.

Um indicativo da geração de resposta imune Th1 (protetora) ou Th2 (não protetora), em camundongos

BALB/c, diz respeito à produção dos isotipos IgG₁ e IgG_{2a}. Citocinas secretadas por células do sistema imune, como os linfócitos T, atuam sobre linfócitos B induzindo a mudança de isotipos dos anticorpos IgGs produzidos por tais células. Nesta linhagem de camundongo, a citocina IL-4, induz, preferencialmente, a produção de IgG₁, enquanto que o IFN- γ induz a produção de IgG_{2a} (Coffman, 1993). A resposta imune do tipo Th1, que é estimulada pela subclasse de IgG2a, leva a uma resposta imune protetora, enquanto que a resposta imune estimulada pela subclasse de IgG1, resulta desenvolvimento da doença.

A purificação de subclasses de IgGs tornou-se necessária para a confecção das colunas de imunoafinidade. A figura 4 apresenta o perfil cromatográfico das subclasses de IgGs anti-LRPs em coluna comercial em sistema de FPLC. O primeiro na cromatografia representa a fração do soro que não se ligou à coluna (não ligado), eliminando-se dessa forma, anticorpos inespecífico. O segundo pico representa a IgG1 que foi eluída em pH 6.0, compreendendo o pool das frações de 12 a 17; já o terceiro pico representa a IgG_{2a}, que foram eluídas em pH 5.0, compreendendo o pool das frações de 21 a 26. Eleições em outros pHs foram realizadas com o intuito de verificar a eficácia da coluna e observar a evidência de outras subclasses de IgGs em coelho, sendo estas sem nenhuma valia para o trabalho aqui desenvolvido. As subclasses de IgG1 e IgG2 foram purificadas para produzir duas colunas de que se tornaram ferramenta essencial para a produção de duas colunas de imunoafinidade. Essas colunas têm como finalidade purificar antígenos para posteriores ensaios *in vivo*.

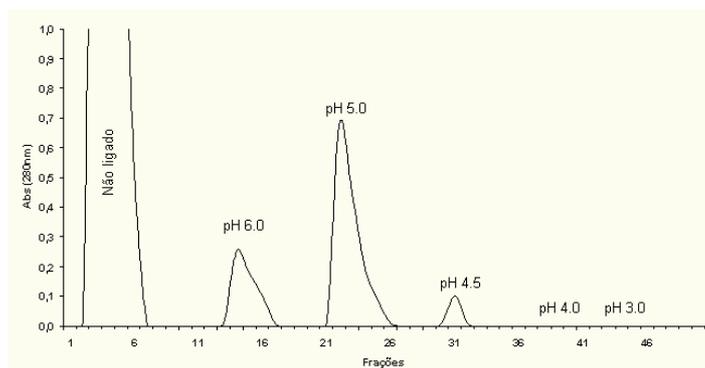


Figura 4 - Perfil cromatográfico da purificação das subclasses de IgGs anti-LRPs em coluna de imunoafinidade (FPLC). O soro de coelho anti-LRPs foi aplicado em coluna de afinidade (proteína A). As subclasses de IgGs foram eluídas em diferentes tampões e pHs em um fluxo de 1,5 ml por min. Sensibilidade 2,0. Os picos eluídos em pH 6.0 e pH 5.0 foram coletados para dar continuidade ao trabalho.

3.4 - TITULAÇÃO DAS SUBCLASSES DE IgGs ESPECÍFICOS A LRP

Após a purificação das subclasses de IgGs, obtidas a partir do soro de coelho imunizado com proteínas ribossômicas de *L. chagasi*, ensaio de ELISA foi realizado para verificar a reatividade das imunoglobulinas frente as LRP de *L. chagasi*. A análise realizada com IgG total purificada, como controle positivo, e as subclasses de IgG1 e IgG2a em diversas diluições, sendo estas eluídas em pH 6.0 e pH 5.0. Observa-se, na Figura 5 que as imunoglobulinas purificadas anti-LRPs de *L. chagasi* foram capazes de apresentar elevada reatividade. Além disso, a subclasse de IgG2a, eluída em pH 5.0, teve maior reatividade em comparação com as IgG1 eluída em pH 6.0. Tal constatação pode sugerir que houve a predominância de resposta imune tipo Th1 com possibilidades de induzir resposta imune protetora, corroborando os dados descritos por CHÁVES-FUMAGALLI et al, 2010. Esses resultados permitiram a dar continuidade no trabalho com segurança.¹¹

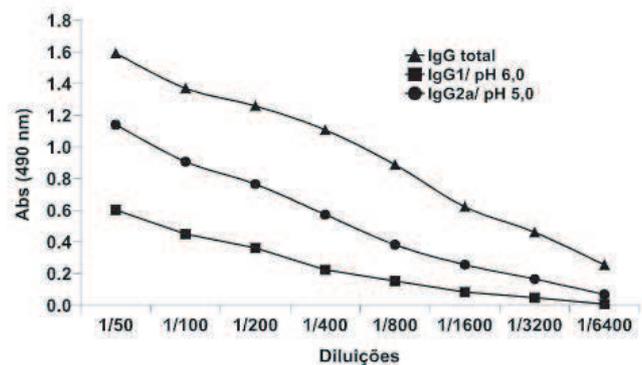


Figura 5 – Ensaio de imunabsorção enzimática (ELISA) com às subclasses de IgGs anti-LRPs de *Lchagasi*. Foi utilizado aproximadamente 0,5 μ g de LRP para sensibilizar a placa. Como controle positivo realizamos o teste com IgG total.

3.5 - PERFIL PROTEICO DAS FRAÇÕES ELUIDAS DAS COLUNAS DE IMUNOAFINIDADE (IgG1 E IgG2a).

Após a construção das colunas de imunoafinidade de sepharose 4B-CNBr, ligada a IgG1/IgG 2^a, realizou-se a purificação de proteínas específicas de antígeno bruto solúvel de *L. chagasi* em colunas anti-LRPs. A figura 6 revelou o perfil de bandas bem distintos, principalmente entre as frações purificadas nas canaletas quatro e cinco. Em um apresenta um perfil proteico complexo do extrato total solúvel de *L. chagasi*, em dois e três revela o perfil das proteínas não ligadas nas

colunas de imunoafinidade, exibindo perfil proteico menos complexo que o extrato total, indicando uma afinidade significativa aos anticorpos ligados à coluna, em 4 representa as proteínas eluídas da coluna com afinidade a IgG2a, revelando um perfil de proteínas de médio e baixo pesos moleculares com duas bandas predominantes entre 25 e 30 kDa. A canaleta 5 mostra as proteínas eluídas da coluna com afinidade a IgG1, predominando bandas de peso molecular médio, entre aproximadamente 50 e 90 kDa. As duas frações purificadas apresentam perfis de proteicos bem distintos

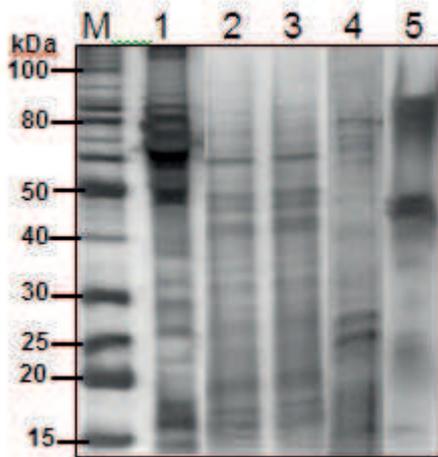


Figura 6 Purificação das frações proteicas de *L. chagasi* em colunas de proteína A+IgGs de diferentes pHs. As amostras foram resolvidas em SDS-PAGE 12% e coradas com Comassie Blue G-250. **M** – Padrão de peso molecular; **1** – Extrato total de *L. chagasi* **2** – Proteínas não ligadas na coluna de IgG pH 5,0; **3** – Proteínas não ligadas na coluna de IgG pH 6,0; **4** – Proteínas eluídas da coluna pH 5,0; **5** – Proteínas eluídas da coluna pH 6,0 .

4. CONCLUSÃO

O estudo apresentou metodologia díspar em purificar frações de proteínas específicas de antígeno bruto solúvel de *L. chagasi* em colunas de imunoafinidade anti-LRPs. As frações de proteínas específicas de antígeno solúvel de *L. chagasi* purificadas são candidatas à testes de vacinas e/ou kit de diagnóstico, além de alvos imunoterapêuticos contra a leishmaniose.

5. REFERÊNCIAS

1 WHO. Control of the Leishmaniasis. World Health Organization, Geneva. Tech Rep Ser, v. 949, n. March, p. 22–26, 2010.

2 Camara-Coelho LI, Paes M, Guerra JA, Barbosa MG, Coelho C, Lima B, Brito ME, Brandão-Filho S 2011. Characterization of *Leishmania* spp causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. *Parasitol Res* 108: 671-677.

3 Alvar J, Vélez I D, Bern C, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS One*. 2012;7(5):e35671.

4 REQUENA, J. M. et al. Evolutionary conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. *Parasitology Today*, v. 16, p. 246-250, 2000

5 IBORRA, S. et al. The *Leishmania infantum* acidic ribosomal protein P0 administered as a DNA vaccine confers protective immunity to *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *Infection and Immunity*, v. 71, p. 6562-6572, 2008.

6 AFONSO, L. C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infection and Immunity*, v. 61, n. 7, p. 2952–9, 1993.

7 DIEFENBACH, A. et al. Type 1 interferon (IFNalpha/beta) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. *Immunity*, v. 8, n. 1, p. 77–87, 1998.

8 DOHERTY, T. . et al. Modulation of murine macrophage function by IL-13. *Journal of Immunology*, v. 151, n. 12, p. 7151–7160, 1993.

9 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p. 248-254, 1976.

10 SOTO, M. et al.. Isolation, characterization and analysis of the expression of the *Leishmania* Ribosomal P0 protein genes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 61, p. 265-274,1993.

11 CHÁVEZ-FUMAGALLI, et al Vaccination with the *Leishmania infantum* ribosomal proteins induces protection in BALB/c mice against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* challenge. *Microbes and Infection*, V 12, , p 967–977, 2010.