



## ANÁLISE POR ELETROFORESE BI-DIMENSIONAL DE PROTEÍNAS TOTAIS DE LINHAGENS DE *LEISHMANIA VIANNIA. GUYANENSIS*

Anna Clara Azevedo Silveira, Fernando Fialho Pires, vitelhe Ferreira de Almeida, Handressa Magalhães Ferreira, Fabiana da Silva Vieira Matrangolo, Sérgio Avelino Mota Nobre

### Introdução

As leishmanioses são um grupo de doenças zoonóticas causadas por protozoários parasitas do gênero *Leishmania* (Ordem Kinetoplastida; família Trypanosomatidae). Classificada como: Leishmaniose Visceral (LV) forma mais grave na qual os parasitas deixam o local de inoculação e proliferam no fígado, baço e medula óssea, levando a imunossupressão do hospedeiro e se não for tratada leva até a morte; Leishmaniose Cutânea (LC) na qual os parasitas permanecem no local de inoculação e causam lesões ulcerosas, indolores, únicas ou múltiplas; e Leishmaniose Mucocutânea (LMC) quando ocorrem lesões mucosas agressivas que afetam as regiões nasofaríngeas [1].

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é caracterizada pelas lesões de pele, cartilagem e mucosa do trato respiratório superior, causada por protozoários do gênero *Leishmania* [2] e transmitida ao homem pela picada de insetos flebotômíneos [3]. A LTA está entre as endemias de maior importância em saúde pública no Brasil por causa da sua ampla distribuição pelo território nacional, a ocorrência de formas clínicas graves e pelas dificuldades relacionadas tanto ao diagnóstico como ao tratamento das mesmas. Pode apresentar lesões destrutivas, desfigurantes e incapacitantes, com uma repercussão de grande escala no campo psicossocial do indivíduo [4,5]. Algumas cidades do Norte de Minas Gerais como, Janaúba-MG, apresentam casos tanto de LV e LTA [6].

A quimioterapia constitui a ferramenta principal para o controle da Leishmaniose, mais é um tratamento lento, de alto custo e tóxico, baseia-se na utilização dos fármacos antimoniais pentavalentes (SbV): antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) e o estibogluconato sódico (Pentostam®); e da Anfotericina B. Estudos recentes sugerem o antimonial trivalente (SbIII) causa distúrbios no potencial tiol redox do parasito, o que levaria a sua morte [7]. Embora o mecanismo de resistência de *Leishmania* aos antimoniais tenha sido amplamente estudado, muitas questões ainda não foram elucidadas. Atualmente, o estudo do proteoma desses parasitos têm permitido o conhecimento de vias metabólicas celulares, a possibilidade de identificação de novos alvos quimioterapêuticos, marcadores biológicos que possam ser utilizados para diagnósticos ou prognóstico das doenças e novas moléculas bioativas. Na área da protozoologia, podemos citar a análise proteômica de *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *L. (V.) panamensis* [8], e recentemente o proteoma de *L. (V.) braziliensis* [9] e [10].

A análise proteômica envolve a separação sistemática de proteínas utilizando eletroforese bi-dimensional, identificação e quantificação de muitas proteínas simultaneamente a partir de uma única amostra. Nesse sentido, os objetivos do presente trabalho são obter extratos de proteína total concentrados em tampão de lise; quantificar esses extratos e realizar separação das proteínas por eletroforese bi-dimensional utilizando uma faixa de pH 7-13 NL de linhagens de *L. V. Guyanensis* sensíveis e resistentes ao tártaro potássico de antimônio (SbIII).

### Material e métodos

#### A. Amostras de *Leishmania*: preparo e quantificação do extrato protéico.

As linhagens de *L. V. guyanensis* resistentes ao tártaro potássico de antimônio (SbIII) foram crescidas na presença da droga. Para obtenção de extrato de protéico, formas promastigotas de *Leishmania* spp., obtidas na fase exponencial de crescimento em meio M199 foram lavadas em meio RPMI 1640 (GIBCO) e sedimentadas por centrifugação a 200g por 10 min a 4°C. Após duas lavagens, os sedimentos contendo as massas de parasitos foram armazenados à -70°C até o momento da extração.

Para preparo do extrato protéico, 100 µL tampão de lise (8M de Uréia, 2M de Tiouréia, 4% de CHAPS, 20mM de Tris-base) 50 mM de Ditiotretiol e coquetel de inibidores de proteases (ROCHE) foi adicionado a cada 3 x 10<sup>8</sup> parasitos. A lise dos parasitos foi realizada sob agitação por 2 horas, à temperatura ambiente, para solubilização das proteínas. As amostras foram passadas em seringa de insulina, por 10 vezes, ou até diminuir a viscosidade da solução. Após centrifugação à 16.000 g por 30 min, a 20°C, o sobrenadante (extrato protéico) foi alíquotado e armazenado a -70°C. A concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford modificado em triplicata. O SDS-PAGE foi realizado considerando 10 mg de proteína por amostra (Fig. 1A).



### B. Eletroforese bi-dimensional (2-DE).

Utilizou-se o protocolo padronizado da técnica no laboratório LPCM/CPqRR. Para a focalização isoelétrica (IEF) foi utilizado o equipamento PROTEAN IEF Cell (Bio-Rad) (Fig.1B).

A focalização isoelétrica realizada em fitas de IPG de 17cm com gradientes de pH 3-10 NL BioRad, de acordo com as recomendações do fabricante, ocorreu em 24 horas. Posteriormente as fitas IPG foram separadas em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% no sistema Protean II (Bio-Rad) com corrente constante de 150V, a 10<sup>0</sup>C, até a saída do corante. Após a separação as proteínas foram fixadas e os géis foram corados por protocolos compatíveis com a espectrometria de massa, utilizando-se azul de Coomassie coloidal G-250, em triplicata por 72 horas, as imagens dos géis obtidas em scanner G800.

## Resultados e Discussão

O extrato de proteínas totais obtido apresentou para em média 10 mg/mL de proteína para o extrato menos concentrado, R1, e 15 mg/mL para o mais concentrado, WT2. As quantificações foram realizadas em triplicata (Tabela 1). O gel de poliacrilamida permitiu o ajuste da quantificação para aplicação das amostras aplicando-se um fator de correção para aplicação das amostras nas strips (Fig.1A e 1B).

A focalização isoelétrica realizada em fitas de IPG de 17cm com gradientes de pH 3-10 NL BioRad, de acordo com as recomendações do fabricante, ocorreu em 24 horas. As proteínas separadas, fixadas e coradas pelo azul de Coomassie coloidal G-250, tiveram a saturação em 72 horas e as imagens dos géis foram obtidas em scanner G800 conforme mostrado na figura 2.

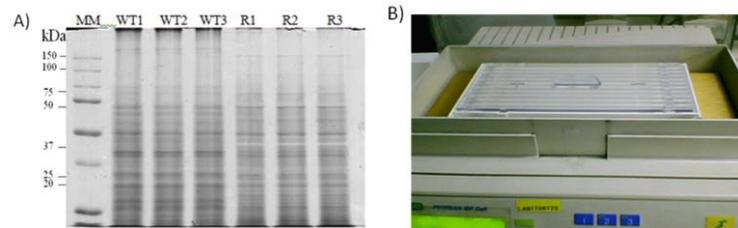
Os resultados mostraram que quando as proteínas totais, das formas promastigotas na fase exponencial de crescimento das linhagens LgWTS e LgR, foram aplicadas em fitas IPG de 17cm com gradiente de pH 3-10NL a maioria dos spots proteicos se concentrou na região de pH entre 4 a 7 (Fig. 2). Os resultados mostraram que os perfis de proteínas obtidos em géis 2-DE foram altamente reprodutíveis em relação ao número total, à localização e à intensidade dos spots. Neste estudo, foram obtidas imagens dos géis 2-DE de cada linhagem resistente e sensível em triplicata de réplicas biológicas independentes.

## Conclusão

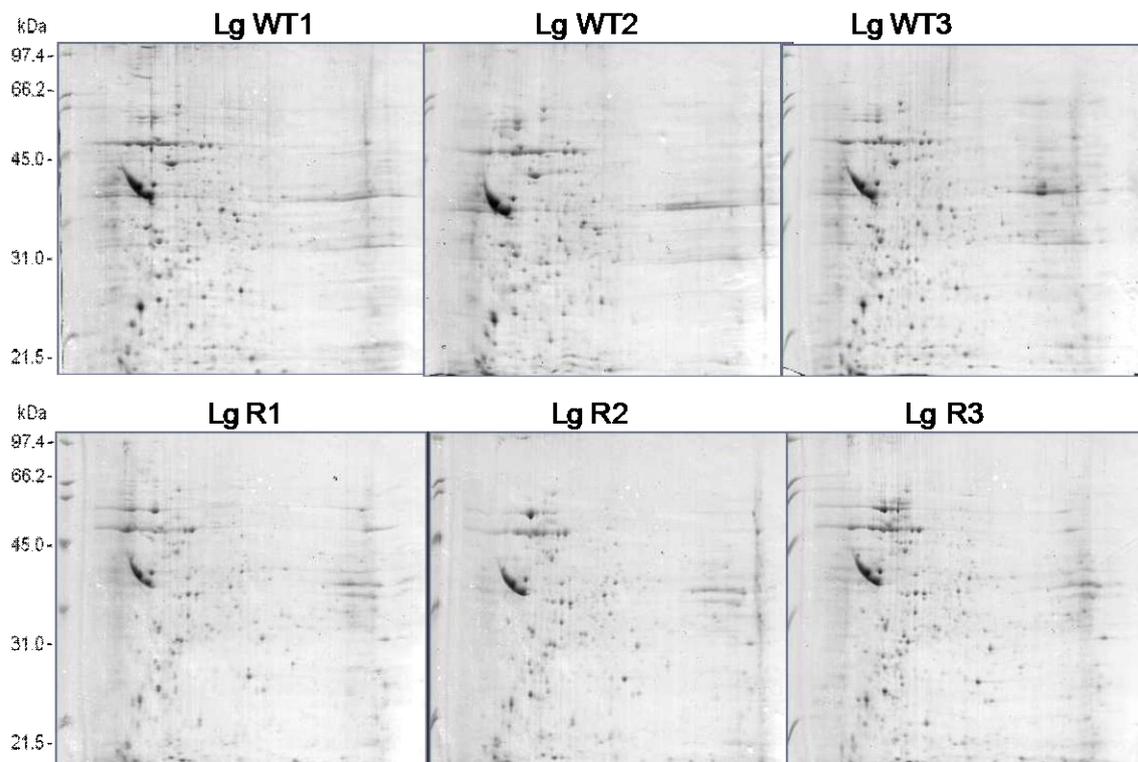
Os resultados preliminares observados mostraram um padrão diferencial na expressão proteica entre o par sensível e resistente, sendo que há um maior número de proteínas observadas na população resistente, que também apresenta spots exclusivos, quando analisadas as imagens dos géis de segunda dimensão pelo programa PDQuest-7.3.0 da BioRad. Para identificação dessas proteínas diferencialmente expressas nas populações sensíveis e resistentes, os “spots”, estão sendo detectados e pareados entre os géis bidimensionais de cada população, exclusivos e com diferenças significativas e serão retirados dos géis para a realização da digestão trípica dos mesmos, para posterior identificação por espectrometria de massa. Muitos mecanismos de resistência de *Leishmania* aos antimoniais e antifolatos são descritos na literatura, porém á pouca informação sobre os mecanismos de resistências a drogas nas espécies endêmicas no Brasil. Podemos observar um padrão de expressão com diferenças significativas e várias dessas proteínas podem ser peça chave para desvendar esses mecanismos.

## Referências

- [1] Marsden, P.D.; Sampaio, R.N.; Carvalho, E.M.; *et al.* High continuous antimony therapy in two patients with unresponsive mucosal leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1985; 34(4): 710-3.
- [2] ROSS, R. Notes on the bodies recently described by Leishman and Donovan. *British Medical Journal*, Londres, v. 14, p. 70-72,1903.
- [3] Gontijo, B.; Carvalho, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Med Trop* 36:71-81, 2003
- [4] Ashford, R.W. The Leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology* 30: 1269-1281, 2000.
- [5] Marzochi, M.C.A. Leishmaniose Tegumentar Brasil. In: *Grandes Endemias Brasileiras*, Editora Universidade de Brasília, Brasília, 1989.
- [6] SILVEIRA, A. C. A. Leishmaniose Visceral e Tegumentar: levantamento de casos notificados na área de Janaúba-MG, anais do 8º FEPEG, et. al. 2014.
- [7] Wyllie, S.; Cunningham, M.L.; Fairlamb, A.H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem.* 2004; 279(38): 39925-32.
- [8] Gongora, R.; Acestor, N.; Quadroni, M.; *et al.* Mapping the proteome of *Leishmania Viannia* parasites using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and associated technologies. *Biomedica.* 2003; 23(2): 153-60.
- [9] Cuervo, P.; de Jesus, J.B.; Junqueira, M.; *et al.* Proteome analysis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol Biochem Parasitol.* 2007; 154: 6-21.
- [10] Matrangolo, F. S.V.; Liarte, D. B.; Andrade, L. C.; De Melo, M. F.; *et al.* Comparative proteomic analysis of antimony-resistant and-susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum chagasi* lines. *Molecular and Biochemical Parasitology (Print)*, v. 190, p. 63-75, 2013.



**Figura 2.** SDS-PAGE e focalização isoeétrica de extratos de proteína total de linhagens de *L.V guyanensis* (Lg) sensíveis (WT) e resistentes (R) ao tártaro potássico de antimônio (SbIII). A) As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida 12%, em triplicata. MM corresponde ao marcador de massa molar. B) Após aplicação de fator de correção, os extratos foram aplicados as *strips* para a focalização isoeétrica.



**Figura 2.** Perfil 2-DE, pH 3-10 NL, de extratos proteicos de linhagens de *L. V. guyanensis* resistentes (R) e sensíveis (WTS) ao tartarato potássico de antimônio (SbIII). IEF foi realizada com 500µg de extratos proteicos utilizando tiras IPGs de 17cm pH 3-10NL, submetidos à SDS-PAGE em géis de poliacrilamida a 12% e corados com azul de Coomassie coloidal G-250.

**Tabela 1.** Quantificação dos extratos de proteínas totais obtidos de linhagens sensíveis (WT) e resistentes (R) de *L. V. guyanensis* (Lg), em triplicata.

Amostra LG	Concentração (mg/mL)	Quantidade para focalização (µL) <sup>1</sup>
WT1	12,0	58,4
WT2	15,0	46,7
WT3	12,0	58,4
R1	10,0	70,0
R2	12,0	58,4
R3	12,0	58,4

<sup>1</sup>Volume de extrato aplicado para focalização isoeétrica (500 µg).