



## Perfil proteico de linhagens de *L.L. amazonensis sensíveis* e resistentes ao tártaro potássico de antimônio (SbIII).

Fernando Fialho Pires, Anna Clara Azevedo Silveira, Fabiana da Silva Vieira Matrangolo

### Introdução

As leishmanioses são consideradas primariamente como zoonoses podendo acometer o homem, quando este entra no ciclo de transmissão do parasito, transformando-se em uma antroponose. Atualmente, encontra-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo, é uma doença crônica, de manifestação cutânea ou visceral causada por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, da família *Trypanosomatidae*, Mistério da saúde (MS 2010)[1]. No Brasil existem atualmente 07 espécies de *Leishmania* responsáveis pela doença humana, pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Vianna*. Mais de 200 espécies de flebotômico são implicadas em sua transmissão. Trata-se de uma doença que acompanha o homem desde tempos remotos. Nos últimos 20 anos apresentou um aumento do número de casos e ampliação de sua ocorrência geográfica. Sendo encontrada em todos os Estados brasileiros, sob diferentes perfis epidemiológicos. Sendo a *Leishmania (Vianna) braziliensis* presente na maioria dos casos, causando tanto lesões cutâneas como nas regiões das mucosas, seguida pelas seguintes espécies: *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) naiffi*, *Leishmania (V.) shawi*, *Leishmania (V.) lainsoni* e *Leishmania (L.) amazonensis*. Como descrito pela Organização mundial de saúde WHO [2].

A *Leishmania (Leishmania) amazonensis* apresenta uma ampla distribuição no Brasil. Encontrada nas florestas primárias e secundárias da Amazônia (Amazonas, Pará, Rondônia e sudoeste do Maranhão), particularmente em áreas de igapó e de floresta tipo "várzea". Sua presença amplia-se para o Nordeste (Bahia, Ceará, Piauí), Sudeste (Minas Gerais) e Centro-Oeste (Goiás, Mato Grosso), e o suas principais espécies de vetores são *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia reducta* e *Lutzomyia olmeca*, ambos com hábitos noturnos, vôo baixo e são pouco antropofílicos, segundo, Olivier, M. et al. [3]

O tratamento das Leishmanioses é feito com antimoniais pentavalentes, tanto nos casos de LV como de LTA. No Brasil, especificamente é usado o antimoniato de N-metilglutamina, recomendado pelo Ministério da saúde O estibogluconato de sódio-Pentostan, que é um antimonial usado em outros países, tem sua venda proibida no Brasil. Esses medicamentos são tóxicos e nem sempre são eficientes e podem levar à morte de pacientes que tenham diabetes mellitus ou hipertensão, dentre outros, demonstrado por Olivier, M. et al. [3]. A anfotericina-B pode ser utilizada como segunda escolha tanto para LV como para LTA na forma lipossomal ou em dispersão coloidal, como citado por Lambertucci, J.R.; e Silva, R.C.S [4] e, ainda, podem ser usadas as pentamidinas, ou imunomoduladores, segundo, Moreira et al [5]. A organização mundial de saúde(WHO) recomenda que a dose de o antimoniato de N-metilglutamina seja calculada na forma que: mg/Sb<sup>V</sup>/Kg/dia. O tratamento baseando-se em antimoniais pentavalentes e Anfotericina B apresentam como fatores desfavoráveis como a alta toxicidade desses fármacos e a resistência de cepas ao tratamento. Embora o mecanismo de resistência de *Leishmania* aos antimoniais tenha sido amplamente estudado, muitas questões ainda não foram elucidadas e alguns resultados são aparentemente contraditórios, revisado por Croft, S.L., [6]. Estas divergências quanto ao mecanismo de resistência a drogas em *Leishmania*, pode ser devido aos diferentes modelos de obtenção dos parasitos resistentes e de análise do fenótipo, além da diversidade natural de espécies de *Leishmania*. Acredita-se que o SbV é uma pré-droga e precisa ser reduzido a SbIII para ter atividade leishmanicida. A diminuição dessa redução foi demonstrada em formas amastigotas de *L. donovani* resistentes a antimoniais pentavalentes por Shaked-Mishan, P [7]. Também foi observado um aumento nos níveis de tripanotona (TSH) em parasitos resistentes ao SbIII como citado por Mukhopadhyay et al. [8]. A exposição do parasito ao SbIII provoca o efluxo de TSH da célula e inibição da tripanotona redutase causando distúrbios no potencial tiol redox Wyllie, S [9]. Várias proteínas envolvidas nos processos oxidativos do parasito e no metabolismo de carboidratos foram identificadas como diferencialmente expressas por Matrangolo et al. [10]. Nesse sentido, o presente trabalho avalia o perfil proteico de extratos de proteína total de linhagens de *L.L. amazonensis sensíveis* e resistentes ao tártaro potássico de antimônio (SbIII), em SDS-PAGE buscando concentrações que permitam a comparação das amostras por eletroforese bidimensional.

### Materiais e métodos.

O estudo contou com a extração de proteínas totais de formas promastigotas de linhagens de *L. L. amazonensis* sensíveis e com resistência induzida *in vitro* ao Tartarato potássico de antimônio (SbIII), em triplicata, quantificação e determinação do perfil dessas proteínas extraídas.

Apoio financeiro: FAPEMIG, CNPq, Fiocruz-CPqRR, PDTIS, Unimontes.

Para obtenção de extrato de protéico, formas promastigotas, 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, o sedimento contendo a massa de parasitos foi armazenado 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 Ditiotretol e coquetel de inibidores de proteases (ROCHE) foi adicionado a cada  $3 \times 10^8$  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 aliqotado e armazenado a -70°C. A concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford modificado, conforme descrito na figura 1. As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, fixadas e coradas pelo azul de Coomassie coloidal G-250.

## 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 13 mg/mL para o mais concentrado, WT2. As quantificações foram realizadas em triplicata (Tabela 1). O SDS-PAGE foi realizado considerando 10 mg de proteína por amostra. O gel de poliacrilamida permitiu o ajuste da quantificação para aplicação das amostras aplicando-se um fator de correção (Fig. 2).

Os resultados da quantificação por Bradford e em gel de poliacrilamida sugerem que mesmo após lavagens os resíduos da droga, Tartarato potássico de antimônio (SbIII), adicionado ao meio para cultivo das linhagens resistentes interfere no resultado. Os métodos colorimétricos apresentam muita sensibilidade. As amostras de 1, 2 e 3, correspondentes a linhagem sensível, foram cultivadas na ausência de droga. As amostras de 4, 5 e 6 foram cultivadas na presença de droga. A eletroforese SDS-PAGE mostra uma variação de bandas, seta vermelha, com distribuição variada de diversas proteínas conforme descrito na literatura (Fig.2).

## Conclusão

Os resultados preliminares observados mostraram um padrão diferencial na expressão protéica entre o par sensível e resistente, sendo que há diferenças no número de proteínas observadas nas duas linhagens. Observamos também bandas exclusivas, quando analisadas as imagens dos géis. Os próximos passos do trabalho serão a análise proteômica utilizando eletroforese bi-dimensional, seleção de proteínas diferencialmente expressas, digestão trípica e espectrometria de massa. Essa técnica é capaz de detectar modificações pós e co-traducionais, as quais não podem ser observadas por sequenciamento do genômico. Assim poderemos identificar proteínas envolvidas nos mecanismos de resistência, assim como, para a realização de experimentos de genômica funcional e comparação como mecanismos de resistência já descritos.

## Referencias

- [1] MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim eletrônico epidemiológico, Brasília, ano 09, n. 1, Jun, 2009.
- [2] WHO. Organização Mundial da Saúde. Disponível em <http://www.who.org.com>
- [3] OLIVIER, M. et al. Modulation of Interferon-g-induced Macrophage Activation by Phosphotyrosine Phosphatases Inhibition. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v. 273, n. 2, p. 13944-13949, 2008.
- [4] LAMBERTUCCI, J.R.; SILVA, R.C.S. Mucocutaneous leishmaniasis treated with liposomal amphotericin Ver. *Soc. Bras. Med. Trop.*, Rio de Janeiro, v. 41, n. 1, p. 87-88, 2008.
- [5] MOREIRA, R.C.R. et al. Efeito leishmanicida in vitro de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae). *Ver. Bras. Farmacogn.*, João Pessoa, v. 17, n. 1, p. 59-63, 2007.
- [6] Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19: 111-26.
- [7] Shaked-Mishan P, Ulrich N, Ephros M, Zilberstein D. Novel Intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. *J Biol Chem.* 2001; 276(6): 3971-6.
- [8] Mukhopadhyay R, Dey S, Xu N, Gage D, Lightbody J, Ouellette M, Rosen BP. Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. *Proc Natl Acad Sci.* 1996; 93(19): 10383-7.
- [9] Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem.* 2004; 279(38): 39925-32.



# FEPEG

FÓRUM DE ENSINO,  
PESQUISA, EXTENSÃO  
E GESTÃO

TRABALHOS CIENTÍFICOS APRESENTAÇÕES ARTÍSTICAS E CULTURAIS DEBATES MINICURSOS E PALESTRAS

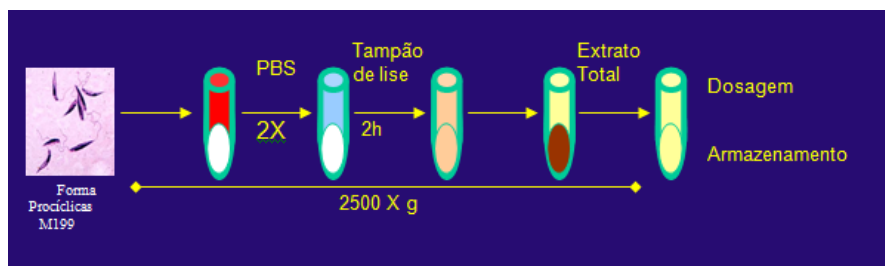
23 A 26 SETEMBRO DE 2015  
Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro

ISSN 1806-549X

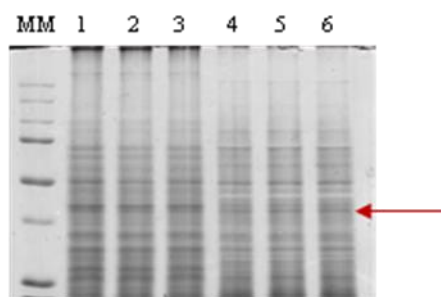
A HUMANIZAÇÃO NA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO



[10] MATRANGOLO, FABIANA S.V.; LIARTE, DANIEL B.; ANDRADE, LAILA C.; DE MELO, MELINE 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 1:** Esquema de procedimento para extração de proteínas totais das linhagens WT e R. Os parasitas foram contados, centrifugados e lavados para retirada de resíduos do meio de cultura. As proteínas totais foram extraídas com tampão de lise, compatível com a focalização isoeletrica, coletadas e quantificadas por Bradford modificado.



**Figura 2:** Gel de poliacrilamida 12% para confirmação de quantificação de extratos de proteína total de linhagens sensíveis (WT) e resistentes (R) de *L. V. amazonensis*. (MM)- marcador de massa molar BioRad®.

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

	Amostra LA	Concentração (mg/mL)
1	WT1	12,0
2	WT2	13,0
3	WT3	12,0
4	R1	10,0
5	R2	12,0
6	R3	11,0