

## PERFIL PROTEICO DE SOROS DE PACIENTES DE DOADORES SAUDÁVEIS E PACIENTES COM INFECÇÃO MISTA POR HIV E LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Fernanda Leão BLOS<sup>1</sup>; Liliane Coelho da ROCHA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PAIC/FAPEAM-INPA; <sup>2</sup>Orientador CSAS/INPA

### 1. Introdução

As proteínas do plasma e do soro têm se mostrado muito úteis para diagnóstico, prognóstico e/ou desenvolvimento terapêutico. Com as ferramentas proteicas, recentemente estabelecidas como o perfil proteico do plasma humano, tornou-se mais fácil a busca por marcadores para doenças relacionadas (Anderson 2002).

Na infecção pelo HIV, a maioria das proteínas encontradas no plasma desses pacientes, são as proteínas de fase aguda (APPs) geradas pela reação inflamatória durante a infecção pelo HIV. Dentre elas, a proteína que se destaca é a Apolipoproteína AI, que na fase aguda da infecção pelo HIV, tem o seu nível diminuído no plasma do paciente infectado (Sung *et al.* 2006).

Outra proteína conhecida é o HIV-1 Tat, produto do gene viral HIV, o qual é de grande importância para a replicação viral. Os vírus que tem a produção de Tat defeituosa não conseguem se replicar de forma eficiente. Estudos mostram que esta proteína também tem uma grande importância na infecção mista da leishmaniose com HIV, pois impulsiona a replicação da *Leishmania* nos macrófagos (Lodge 2011).

A partir do conhecimento de que o perfil proteico do soro humano pode auxiliar no diagnóstico, prognóstico de doenças como a co-infecção pela leishmaniose/HIV, e que esta co-infecção tem crescido, percebe-se que existe uma urgência na melhor compreensão dos mecanismos da co-infecção relacionados à expressão de proteínas que possam ser traduzidas em métodos diagnóstico, tratamento confiáveis e aplicáveis em grandes populações.

Em vista disto este trabalho se propôs a verificar o perfil proteico de soros de doadores saudáveis, pacientes com infecção por leishmaniose tegumentar, HIV e co-infecção (HIV/ leishmaniose tegumentar).

### Material e Métodos

As amostras de soro foram selecionadas a partir do criobanco de soros do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, com autorização do Comitê de ética em humanos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, protocolos 193/08 e 006/2010. Foram separados soros de indivíduos: saudável (MHOM/BR/2010/IM5590), com leishmaniose (MHOM/BR/2010/IM5653), com HIV (MHOM/BR/2013/IM6113) e com Co-infecção HIV-leishmaniose (MHOM/BR/1995/IM4094).

#### Preparo das amostras:

Inicialmente foram removidas IgG e albumina das amostras de soro, utilizando a coluna Hitrap Albumin & IgG Depletion (GE Healthcare) e o equipamento ÄKTA purifier UPC 900 (GE Healthcare). Após a remoção, as amostras foram dialisadas, precipitadas com acetona e centrifugadas a 22000 x g por uma hora a 4°C e ressuspensas em água Milli-Q.

#### Eletroforese de proteínas:

Na eletroforese bidimensional, após o preparo e dosagem das proteínas precipitadas as amostras foram focalizadas em fitas ("strips" GE HealthCare) de 13 cm com géis de gradiente de pH 3-10. As fitas foram reidratadas com 250µL de solução contendo as proteínas do soro ressuspensas em tampão de reidratação (DeStreak™ rehydration solution/GE HealthCare) com 0,5% de tampão IPG pH 3-10 durante 12 horas e, posteriormente, focalizadas em Aparelho IPGPhor (IPGphor (Ettan IPGPhor 3/GE HealthCare). A focalização isoelétrica foi realizada de forma gradual conforme HUADEK et al. (2008): ( 1h, 0-500V linear; 5h, 500V; 5h, 500-3500V linear; 12h, 3500V). Em seguida à focalização, submeteu-se as fitas à redução/alquilação por incubação consecutiva em 5mL de DTT 125mM e iodoacetamida 125mM em tampão de equilíbrio (Tris- HCl pH 8,8, Uréia 6M, 30% Glicerol, 2% SDS, Traço azul de bromofenol) durante 20 minutos.

Após o equilíbrio das fitas, a separação na segunda dimensão foi realizada por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE) nas seguintes condições: 600 V, 30mA por gel, 30W por 30 minutos e em seguida 600V, 40mA por gel, 30W por 3 horas.

#### Coloração:

Os géis foram corados através do Comassie blue coloidal. Primeiramente, fixou-se os géis com 40% de etanol e 10% de ácido acético por 30 minutos e em seguida colocados no corante por seis dias. Para a revelação dos spots, descoraram-se os géis com água destilada.

#### Análise de imagens:

Para a análise das imagens, os géis corados foram digitalizados usando um scanner e as imagens geradas analisadas utilizando o programa ImageMaster 6 (GE HealthCare).

### 3. Resultados e Discussão

Os resultados das análises dos perfis proteicos dos pacientes com Leishmaniose, HIV, co-infecção e controle demonstraram um número total de spots de 179, 295, 173 e 232 respectivamente. Estes resultados demonstram um número baixo de spots quando comparados a literatura que em trabalhos como de Rukmangadachar *et al.* (2011) com plasma de pacientes infectados com *Leishmania donovani* revelou géis DIGE com 895 a 1051. Esta diferença pode estar relacionada ao tipo de metodologia usada para revelar os spots em que o uso de corante comassie blue colloidal foi menos sensível neste estudo.

Na comparação dos géis dos pacientes infectados com o indivíduo saudável a similaridade dos pontos proteicos foi em torno de 40% (controle x leishmaniose: 93 spots (40,08%); controle x HIV: 106 (45,68%); controle x coinfecção: 79 spots (34,05%). Isto demonstra uma ampla quantidade de proteínas a serem estudadas como alvos para marcadores de infecção.

A análise comparativa das imagens das quatro condições revelou sete spots com expressão específica no gel do paciente com leishmaniose, 15 spots específicos para HIV e sete spots na condição de co-infecção (Figura 1). A maioria dos spots específicos para cada infecção tem características básicas com ponto isoelétrico entre 7e10 e massa variando de 11 a 86 kDa.

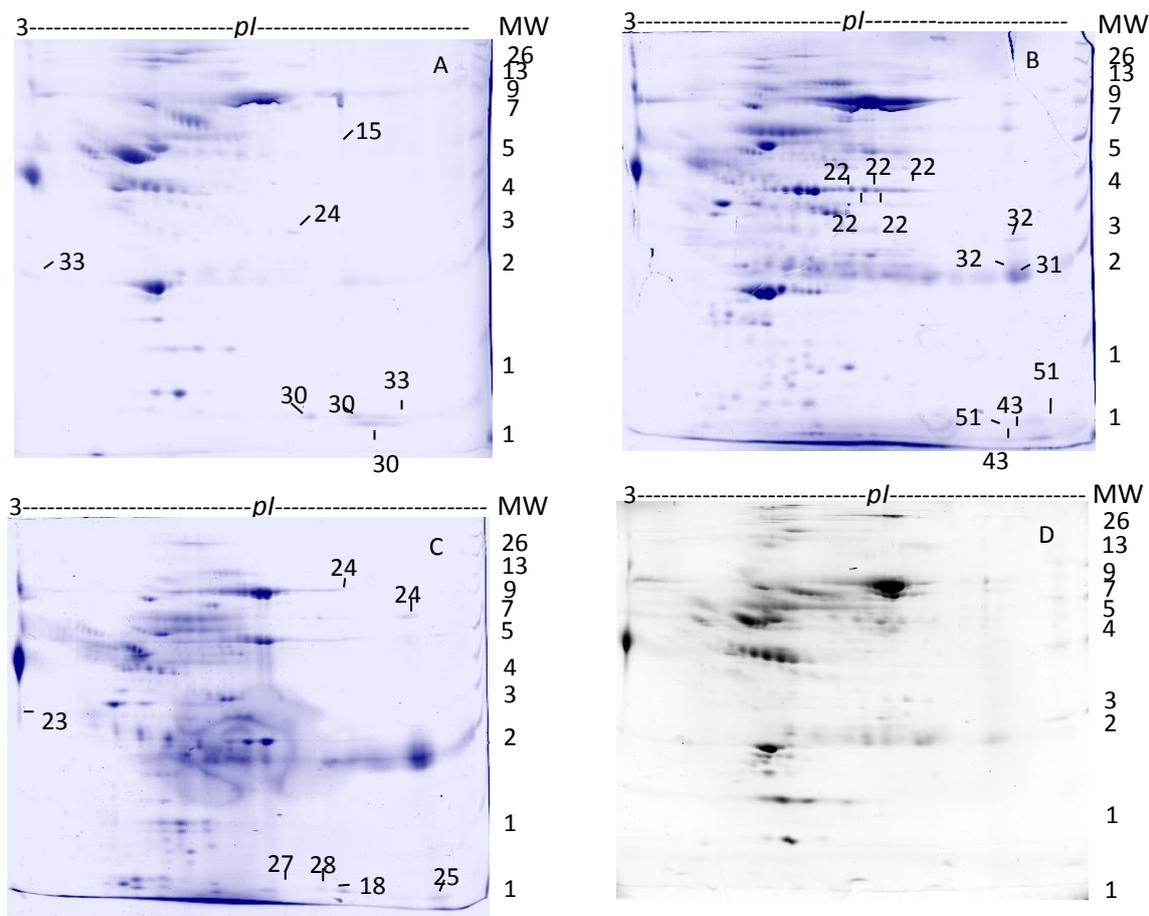


Figura 1: Análise comparativa do perfil proteico dos géis obtidos após a separação 2-DE de soro de pacientes com Leishmaniose (A), HIV (B), Co-infecção (C) e Controle (D) respectivamente. Condições: pH 3-10, fita 13cm, géis de poliacrilamida 12,5% e coloração com Comassie coloidal Brillint Blue G-250.

Na comparação dos géis dos pacientes infectados com o indivíduo saudável a similaridade dos pontos proteicos foi em torno de 40% (controle x leishmaniose: 93 spots (40,08%); controle x HIV: 106 (45,68%); controle x co-infecção: 79 spots (34,05%). Isto demonstra uma ampla quantidade de proteínas a serem estudadas como alvos para marcadores de infecção.

A análise comparativa das imagens das quatro condições revelou sete spots com expressão específica no gel do paciente com leishmaniose, 15 spots específicos para HIV e sete spots na condição de co-infecção (Figura 1). A maioria dos spots específicos para cada infecção têm características básicas com ponto isoelétrico entre 7e10 e massa variando de 11 a 86 kDa.

Além da expressão específica ainda existe a expressão diferencial de spots que ocorrem em várias condições e que podem servir como perfil da infecção e co-infecção. Nos resultados de Sung *et al.* (2006) foram revelados oito spots proteicos alterados na infecção sendo que 7 foram super expressos e 1 foi

pouco expresso. As proteínas super expressas foram a Alfa-1- antiqumiotripsina, a antitripsina-1, proteína ALB, haptoglobulina de cadeia beta, imunoglobulina de cadeia leve, haptoglobina de cadeia alfa 2 e a transtirretina. Essas proteínas podem proporcionar um controle rápido e eficaz das lesões da inflamação até que os mecanismos de defesa comecem a operar (Moshage 1997).

A proteína pouco expressa nesses pacientes foi a apolipoproteína A1 que tem sido amplamente utilizada como um marcador para avaliar o estado inflamatório da infecção e das lesões inflamatórias. Alguns estudos têm mostrado que os níveis de apolipoproteína A1 estão diretamente ligados à infecção com o HIV (Malavazi 2004; Jahoor 2003; Badiou 2003). Um baixo nível da proteína implica na gravidade da injúria celular (Panduro 1990). Concluiu-se então que a combinação simultânea, considerando a quantidade e as isoformas da apolipoproteína A1, pode ser um biomarcador útil para o diagnóstico e terapia para o HIV.

Candidatos a biomarcadores também vêm sendo pesquisados em soro de pacientes com Leishmaniose visceral. Rukmangadachar *et al.* (2011) na busca de proteínas diferencialmente expressas em soro de seis pacientes com LV infectados por *L. donovani* e seis controles saudáveis, utilizando as técnicas 2D-DIGE (Difference in gel electrophoresis) e espectrometria de massas, identificaram maior expressão de Alfa-1 Glicoproteína Ácida e inibidor de C1 e menor expressão de transtirretina, proteína de ligação ao Retinol e Apolipoproteína A1. Os autores sugerem que estas proteínas possam ser usadas como biomarcadores de prognóstico.

Outra proteína estudada e considerada de grande importância presente na infecção com o HIV é a proteína HIV-1 Tat. Ela é um produto do gene viral o qual é de grande importância para a replicação do vírus. Os vírus que têm a produção de Tat defeituosa não conseguem se replicar de forma eficiente. Estudos mostram que esta proteína também tem uma grande importância na co-infecção, pois impulsiona a replicação da *Leishmania* nos macrófagos.

Foi descoberto que o crescimento da *Leishmania* duplica nas células infectadas pelo HIV-1 e que anticorpos anti-Tat reduzem a exacerbação da replicação do protozoário em 70%. A proteína Tat aumenta a replicação da *Leishmania* e cancela o efeito leishmanicida induzida pelo interferon-g, permitindo a replicação do protozoário mesmo na presença da citocina (Lodge 2011).

Foram revelados spots com características semelhantes ao encontrados na literatura e discutidos acima como a proteína apolipoproteína A1 (MM= 28kDa e p/= 5.7) semelhante aos spots 286 (HIV) e 119 (co-infecção), Antitripsina-1 (MM=52kDa e p/=4.5) com similaridade aos spots 141 (HIV) e 50 (co-infecção), transtirretina (MM= 55kDa e p/= 4.7) com os spots 243 (co-infecção), haptoglobulina beta (MM=40kDa e p/=5.6) com spots 211 (HIV) e 83 (co-infecção) e HIV-1 Tat (MM=11kDa e p/=4.3) similar aos spots 408 (HIV) e 280 (co-infecção) podem ser encontradas nos géis tanto de HIV como na co-infecção (Figura 1).

As proteínas do plasma e soro têm se mostrado muito úteis para o diagnóstico, prognóstico e/ou desenvolvimento terapêutico. Com as ferramentas proteômicas recentemente estabelecidas associadas ao perfil proteico do plasma e soro humano, tornou-se mais fácil a busca de marcadores relacionados à doença.

Apesar do conhecimento destas proteínas da infecção pela *Leishmania* ainda não se tem vasto conhecimento da expressão de proteínas e peptídeos em LTA o que torna necessária a ampliação das investigações nesta linha de estudo para o avanço do conhecimento dessa doença endêmica no Amazonas.

#### 4. Conclusão

Os resultados das comparações dos géis bidimensionais mostraram perfis com expressão diferencial para cada condição com uma similaridade baixa entorno de 40% e spots candidatos potenciais marcadores de infecção por *Leishmania*, HIV e co-infecção.

Existe a necessidade de continuação destes estudos para a identificação dos peptídeos e proteínas, por espectrometria de massas, que podem servir como marcadores de infecção de LTA e co-infecção para a busca de novos métodos diagnósticos para essas infecções que acometem a população do Amazonas.

#### 5. Referências Bibliográficas

Anderson, N.; Anderson, N.G. 2002. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Molecular & Cellular Proteomics*, 1(11): 845-867.

Badiou, S.; Merle, D.B.; Dupuy, A.M.; Baillat, V.; Cristol, J.P.; Reynes, J. 2003. Decrease in LDL size in HIV-positive adults before and after lopinavir/ritonavir-containing regimen: an index of atherogenicity? *Atherosclerosis*, 168(1): 107-13.

Jahoor, F.; Abramson, S.; Heird, W.C. 2003. The protein metabolic response to HIV infection in young children. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(1), 182-9.

Lodge, R.; Michel, O.; Corinne, B.; Guadalupe, A.; Pranav, K.; Michel, J. 2011. HIV-1 Promotes Intake of *Leishmania* Parasites by Enhancing Phosphatidylserine-Mediated, CD91/LRP-1- Dependent Phagocytosis in Human Macrophages, *PLoS ONE*, 7: 1-11.

Malavazi, I.; Abrao, E.P.; Mikawa, A.Y.; Landgraf, V.O.; Costa, P.I. 2004. Abnormalities in apolipoprotein and lipid levels in an HIV-infected Brazilian population under different treatment profiles: the relevance of apolipoprotein E genotypes and immunological status. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 42(5): 525-32.

Moshage, H. 1997. Cytokines and the hepatic acute phase response. *The Journal of Pathology*, 181(3): 257-266.

- Panduro, A.; Lin, L.; Chan, L.; Shafritz, D. 1990. A Transcriptional and posttranscriptional regulation of apolipoprotein E, A-I, and A-II gene expression in normal rat liver and during several pathophysiologic states. *Biochemistry*, 29(36): 8430-8435.
- Rukmangadachar, L.A; Kataria, J.; Hariprasad, G.; Samantaray, J.C; Srinivasan, A. 2011. Two-dimensional difference gel electrophoresis (DIGE) analysis of sera from visceral leishmaniasis patients. *Clinical Proteomics*, 8: 1-12.
- Sung, S.K.; Mi.H.K.; Bo, K.S.; Han, J.N.; Jin, Y.C.; Mee, K.K.; Seon, A.C.; Myeong, J.N. 2006. Different Isoforms of Apolipoprotein AI Present Heterologous Post-Translational Expression in HIV Infected Patients. *Journal of Proteome Research*, 6: 180-184.