

Produção e caracterização de IgY anti-LigA de *Leptospira interrogans*

ANDRÉIA NOBRE ANCIUTTI¹; JÉSSICA WALDMAN²; NAJARA CARNEIRO
BITTENCOURT³; ÉVERTON BETTIN⁴; KARINA COLONETTI⁵; ÉVERTON
FAGONDE DA SILVA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – andreianciuti@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – jessica.waldman@hotmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – najarach@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – tombettin@outlook.com

⁵ Universidade Federal de Pelotas – kcolonetti@gmail.com

⁶ Universidade Federal de Pelotas – fagondee@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial, causada por sorovares patogênicos da espiroqueta *Leptospira* spp. A doença é comumente subdiagnosticada, uma vez que seus sintomas clínicos são similares aos de outras doenças infecciosas como gripe, malária e dengue. Além disso, os testes laboratoriais são pouco sensíveis na fase aguda da doença (MCBRIDE et al., 2005). O teste de soroaglutinação microscópica (MAT) é o método de referência para o diagnóstico sorológico da leptospirose. Este teste apresenta sérias limitações, uma vez que requer o uso de um amplo painel de antígenos vivos, amostras de soro pareadas, não possui boa sensibilidade na fase inicial da doença e a interpretação dos resultados é subjetiva (LEVETT, 2001).

Nos últimos anos, esforços para a identificação de componentes imunogênicos nas leptospirosas, com potencial para o desenvolvimento de vacinas e testes diagnósticos resultaram na caracterização de várias proteínas que são expressas durante a infecção e bem conservada entre as espécies. Uma destas proteínas é conhecida como LigA (Immunoglobulin-like),

Recentemente, Vasconcellos et al (2010) produziram anticorpos policlonais (IgY) contra *L. interrogans* cepa Fiocruz L1-130, a maior causadora de leptospirose urbana no Brasil. Estes anticorpos foram testados em diferentes formatos de ELISA de captura de antígeno, obtendo resultados promissores na detecção de leptospirosas em soros experimentalmente contaminados.

Além disso, anticorpos IgY são encontrados em grande quantidade na gema do ovo, o processo de obtenção é rápido e diário, não interfere no bem-estar do animal e elimina a necessidade de realizar a eutanásia destes, como ocorre em outros processos para a obtenção de anticorpos (SILVA E TAMBOURGI, 2010), sendo considerado um método ético e eficiente para a produção de anticorpos.

Assim, o objetivo deste trabalho é a produção, purificação e caracterização de anticorpos IgY contra parte da proteína LigA (LigANI) de *leptospira interrogans* cepa Fiocruz L1-130.

2. METODOLOGIA

2.1 Expressão da proteína recombinante: Todos os procedimentos para a obtenção da proteína recombinante foi realizado no laboratório de Vacinologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas (CDTec/UFPEL). Os primers foram desenhados a partir da sequência depositada no GenBank sob o número de acesso NC005823, derivada do sequenciamento da cepa *L. interrogans Icterohaemorrhagiae* sorovar Copenhageni FIOCRUZ L1-130, com o auxílio do software Vector NTI 10.0 (Invitrogen). O vetor recombinante pET/LigANI

foi obtido segundo Silva et al., (2007) e utilizado para transformar *E. coli* BL21 (DE3) Star™. Na fase de crescimento logarítmico do cultivo, a expressão da proteína recombinante foi induzida com 1mM de IPTG durante 4h. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sepharose. A proteína recombinante purificada foi caracterizada por SDS-PAGE e Western Blotting (WB) e quantificada pelo kit comercial BCA Protein Assay (Thermo Scientific Pierce).

2.2 Obtenção de anticorpos policlonais de galinha (IgY): Duas galinhas poedeiras (raça Leghorn) de 29 semanas de idade, foram selecionadas e alocadas em aviário no Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça (CAVG), com umidade e ventilação controladas. O programa de luz seguiu o recomendado pelo manual da linhagem. O alimento foi fornecido através de comedouro tipo calha, localizado dentro do cercado, com mais de 10cm/ave. As aves tiveram livre acesso à água através de dois bebedouros tipo nipple. Realizaram-se quatro imunizações, com intervalo de 15 dias entre cada imunização, via intramuscular. Cada dose possuía 100µg de rLigANI (Vasconcellos et al., 2010) emulsificadas em adjuvante oleoso (Montanide), totalizando um volume de 500µL por dose. Amostras de 3 a 5 mL do sangue cada ave de foram coletados nos dias 0, 15, 30 e 45, através da punção da veia ulnar. O soro foi armazenado a -20°C até o uso. Anteriormente às imunizações, a produção de anticorpos de interesse foi verificada por ELISA indireto. Os ovos foram coletados durante trinta dias, à partir do terceiro dia após última imunização (dia 48) e estocados a 4°C até o uso.

2.3 Purificação das IgY: A extração da IgY total da gema foi realizada utilizando precipitação por polietilenoglicol (PEG 6000) (SCHADE et al., 2005). Brevemente: retirou-se a maior quantidade de clara possível com auxílio de um separador de gemas e papel filtro. A gema foi homogeneizada com PBS e foram adicionados 3,5% (w/v) de PEG, seguido por uma homogeneização de 10 minutos em agitador rotativo de cilindros. Os tubos foram então centrifugados por 20min a 4°C e o sobrenadante descartado. As etapas de homogeneização e centrifugação foram repetidas por mais duas vezes, após a adição de 8,5% (w/v) de PEG, quando o sobrenadante foi novamente descartado e o pellet dissolvido em 1mL de PBS e após a adição de 12% (w/v) de PEG. O pellet resultante foi dissolvido em 800 µL de PBS e acrescido mais 400µL, para completar o volume necessário para a diálise. O extrato foi dialisado por 8h em solução salina 0,1% seguido por mais 3 horas de diálise em PBS. As amostras foram estocadas a -20°C até o uso.

2.4 Quantificação e Especificidade das IgY: A concentração de IgY foi mensurada através de quantificação por espectrofotometria a 280nm com coeficiente de extinção de 1,33.

2.5 Purificação de anticorpos específicos anti- LigANI (IgY α-LigANI): 5µg de rLigA foram colocados sobre uma membrana de nitroceluse (marca) e incubados a temperatura ambiente até que a membrana estivesse seca. Após, adicionou-se 50mL de leite em pó 5% em PBS e foi incubada por uma hora a temperatura ambiente. A membrana foi, então, novamente incubada com 10mL de IgY total purificada pelo método de precipitação com PEG 6000 durante duas horas a temperatura ambiente, sob agitação. Após a remoção do líquido, a membrana foi lavada uma vez com PBS-T e três vezes com PBS. Mediu-se a densidade óptica a 280nm, e uma vez estando abaixo de 0,1, procedeu-se o choque de pH com tampão glicina pH=2,3 por tempos que variaram de 2,5 min a 15 min. Imediatamente, o eluído foi neutralizado com tampão tris 100mM pH=8,00 a uma razão de 2:1, respectivamente. A concentração final do anticorpo purificado foi mensurada por espectrofotometria a 280nm, com fator de correção de 1,33.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Expressão e caracterização das proteínas recombinantes:

A expressão e caracterização da proteína recombinante foi realizada com sucesso, uma vez que apresentou o tamanho esperado (63kDa) e foi reconhecida por soro de humano convalescente na técnica de WB, confirmando que os epítomos da proteína recombinante são capazes de ser reconhecidos por anticorpos gerados pela infecção natural, e, portanto, apresentam conformação similar à proteína nativa (FIGURAS).

3.2 Obtenção de anticorpos policlonais de galinha (IgY): Os ELISAS do sangue coletado previamente às imunizações demonstraram que houve produção de anticorpos contra a proteína recombinante logo após a primeira dose. Uma vez que os anticorpos estão presentes no sangue do animal, são transferidos para a gema do ovo, de onde podem ser extraídos e purificados.

3.3 Purificação das IgY: A purificação da IgY total da gema dos ovos coletados foi confirmada por SDS-PAGE, apresentando as bandas esperadas para a IgY. O WB realizado com o antígeno LigANI demonstrou que esses anticorpos reconhecem fortemente a proteína em questão.

3.4 Quantificação e Especificidade das IgY: A quantificação pelo método de espectrofotometria resultou em uma concentração final de 3mg/mL.

3.5 Purificação de anticorpos específicos IgY α -LigA: A metodologia empregada para a obtenção dos anticorpos da gema dos ovos extrai a IgY total. A fim de diminuir ao máximo o reconhecimento inespecífico para posterior conjugação com peroxidase e análise da viabilidade destes anticorpos quanto ao seu potencial de detecção em amostras experimentalmente contaminadas, efetuou-se a purificação de anticorpos anti-LigANI específicos à partir do extrato de IgY total.

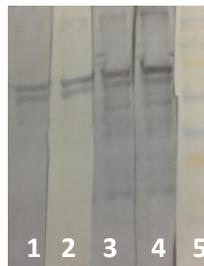


Figura 1. WB dos anticorpos IgY anti-LigANI. 1. Anticorpo específico purificado (1:250), 2. Anticorpo específico purificado (1:1000), 3. IgY total (1:1000). 4. IgY total (1:250). 5. Marcador molecular.

A imunização de galinhas é um excelente método para a obtenção de uma grande quantidade de anticorpos através de um método não estressante e não invasivo, onde o isolamento e a purificação de anticorpos são relativamente simples e com um ótimo rendimento (ZHANG, 2003). A imunidade passiva adquirida envolve a obtenção de anticorpos antígeno-específicos de outra fonte administrado para proteger indivíduos susceptíveis.

Os anticorpos IgYs têm sido amplamente utilizados para imunização passiva em animais e humanos (KOVACS-NOLAN, 2012) além de substituir os antibióticos, que muitas vezes causam resistência bacteriana, no uso como aditivos alimentares para atingir alvos específicos e aumentar o crescimento dos rebanhos. Em adição, a produção de IgY contra leptospiros inteiras ou proteínas

recombinantes constitui-se em uma alternativa de baixo custo quando comparada a produção de anticorpos em mamíferos.

4. CONCLUSÕES

Realizou-se com sucesso a obtenção de IgY anti-LigANI purificados da gema dos ovos das galinhas imunizadas. O próximo passo é a conjugação e a posterior avaliação do potencial diagnóstico dessas moléculas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

KOVACS-NOLAN, J.; MINE, Y. Egg yolk antibodies for passive immunity. **Annu.Rev.Food Sci.Technol.**, v.3, p.163-182, 2012.

LEVETT PN (2001) Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 14: 296–326.

MCBRIDE AJ, ATHANAZIO DA, REIS MG, KO AI (2005) Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis* 18: 376–386

SCHADE, R; CALZADO, EG; SARMIENTO, R; CHACANA, PA; PORANKIEWICZ-ASPLUND, J; TERZOLO, HR. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **Alternative Laboratory Animals**,v.33, p.129–154, 2005

SILVA, E. F.; MEDEIROS, M. A.; MCBRIDE, A. J.; MATSUNAGA, J.; ESTEVES, G. S.; RAMOS, J. G.; SANTOS, C. S.; CRODA, J.; HOMMA, A.; DELLAGOSTIN, O. A.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. The terminal portion of Leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of Leptospirosis. **Vaccine**, v. 25 p.6277-6286, 2007.

SILVA, W.D., TAMBOURGI, D.V. IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology** VETIMM-8222; No of Pages 8.

VASCONCELLOS, FA; COUTINHO, ML; SILVA, EF; FERNANDES, CP; MONTE, LG; SEYFFERT, N; DELLAGOSTIN, OA; ALEIXO, JA. Testing different antigen capture ELISA formats for detection of *Leptospira* spp. in human blood serum. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.104, n. 4, p. 259-264, 2010.

ZHANG, WW. The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. **Drug Discovery Today**, v.8, p. 364–371. 2003.