

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS CONTRA A PROTEÍNA RECOMBINANTE DE *Leptospira* rOmpL37

ROBERTA MARANINCHI SILVEIRA¹; BÁRBARA COUTO ROLOFF¹;
LEONARDO GARCIA MONTE¹; DAIANE DRAWANZ HARTWIG²; THAIS LARRÉ
OLIVEIRA², CLÁUDIA PINHO HARTLEBEN¹

¹ Laboratório de Imunodiagnóstico; ² Laboratório de Vacinologia - Universidade Federal de Pelotas,
Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo de Biotecnologia.
msilveira.roberta@hotmail.com/hartlebenclaudia@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* (FAINE et al., 1999). A infecção em humanos ocorre principalmente através do contato direto ou indireto com a urina de animais infectados por leptospiras, especialmente os roedores (BHARTI et al., 2003).

O “padrão ouro” para o diagnóstico da leptospirose é o teste de aglutinação microscópica (MAT), o qual utiliza cepas de leptospiras vivas para a reação com soros de humanos e animais (WHO, 2003). Entretanto, o MAT apresenta baixa sensibilidade na fase aguda da doença e um alto grau de reações cruzadas com outros sorovares (ADLER; MONTEZUMA, 2010).

A OmpL37 é uma proteína de membrana externa conservada entre diferentes sorovares patogênicos da bactéria (ESHGHI et al., 2009). Esta proteína é reconhecida pelo soro de humanos e de animais infectados, e demonstra ser antigênica e de fácil acesso ao sistema imunológico (PINNE et al., 2010). Além disso, ensaios *in vitro* demonstraram a capacidade da OmpL37 de se ligar aos componentes da matriz extracelular do hospedeiro, com afinidade ao fibrinogênio, fibronectina e elastina (PINNE; HAAKE, 2009; PINNE et al., 2010), o que demonstra sua importância durante a infecção do hospedeiro.

Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi a produção de anticorpos policlonais (pAbs) contra a proteína OmpL37 em sua forma recombinante (rOmpL37), e a caracterização destes pAbs através de ELISA indireto e *Western Blotting*, visando sua utilização em ensaios de diagnóstico para a detecção do patógeno ou para compor ensaios de detecção de anticorpos.

2. METODOLOGIA

Para a produção dos pAbs, cinco doses de rOmpL37 na concentração de 75 µg foram administrados nos dias 0, 14, 21, 28 e 39. As inoculações foram realizadas individualmente em dois camundongos Balb/c com oito semanas de idade. Na primeira dose foi utilizado adjuvante completo de Freund (1:1) e, nas doses posteriores, adjuvante incompleto de Freund (1:1). Os níveis de anticorpos séricos dos modelos biológicos utilizados foram previamente verificados por ELISA indireto, utilizando a proteína rOmpL37 para sensibilização das placas.

Após confirmar a soroconversão através da reação com rOmpL37 em ELISA indireto, o sangue total foi coletado, centrifugado e o soro utilizado para a titulação dos pAbs através de ELISA indireto. Para tal, placas de poliestireno foram sensibilizadas com 100 ng/cavidade de rOmpL37 por 16h a 4°C em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,8. As placas foram bloqueadas com soro fetal bovino (SFB) 1%, e adicionadas de 11 diluições (1:100 – 1:102.400) dos pAbs. A seguir,

anticorpos anti-IgG de camundongo conjugados à peroxidase foram adicionados. Como controles negativo e positivo foram utilizados soro normal de camundongo e soro policlonal anti-*L. interrogans* sorovar Canicola cepa CCZ463 produzido em coelho (BROD et al., 2005), respectivamente. Entre todas as etapas foram realizadas três lavagens com *phosphate buffered saline-tween* 20% (PBS-T) e incubações a 37°C por 1h. As reações foram reveladas com solução substrato/cromógena contendo *o-phenylenediamine* (0,4 mg/mL em 0,1 M tampão citrato, pH 5,0) e 0,03% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) durante 15 min. As densidades óticas (DO) foram mensuradas a 450 nm usando VICTOR™ X5 Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer, USA).

Para o *Western blotting* as proteínas de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 e a proteína rOmpL37 foram submetidas a SDS-PAGE 15% sob condições redutoras. Então, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada com PBS SFB 1% por 1h a temperatura ambiente sob agitação, e posteriormente adicionada do pAb anti-rOmpL37. Após, anticorpos anti-IgG de camundongo conjugados à peroxidase foram adicionados. Os soros controles utilizados foram os mesmos utilizados no ELISA indireto descrito acima. Entre todas as etapas foram realizadas três lavagens com PBS-T e incubações a 37°C por 1h. As reações foram reveladas com solução substrato cromógena contendo 0,6 mg diaminobenzidina, 0,03% de sulfato de níquel, 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e H₂O₂ 30 vol.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ELISA indireto, os pAbs anti-rOmpL37 foram capazes de reagir com a proteína recombinante OmpL37, alcançando o título de 12.800, conforme a Figura 1. No *Western blotting*, o pAb anti-rOmpL37 foi capaz de reagir tanto com a proteína na sua forma recombinante, reconhecendo a banda com peso molecular de 37 kDa, quanto com a proteína nativa presente em *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130, gerando as correspondentes bandas de tamanho esperado, conforme evidenciado na Figura 2.

O título do pAb anti-rOmpL37 de 12.800 comprova a imunogenicidade e antigenicidade da rOmpL37 ao reagir com o pAb anti-rOmpL37. No *Western blotting* nossos resultados se mostraram promissores, pois os anticorpos policlonais anti-rOmpL37 além de reagir com rOmpL37, também foram capazes de reagir com a proteína na forma nativa, permitindo a conclusão de que os pAbs anti-rOmpL37 apresentam conformações semelhantes à anticorpos contra a proteína nativa OmpL37 (PINNE; HAAKE, 2009; PINNE et al., 2010).

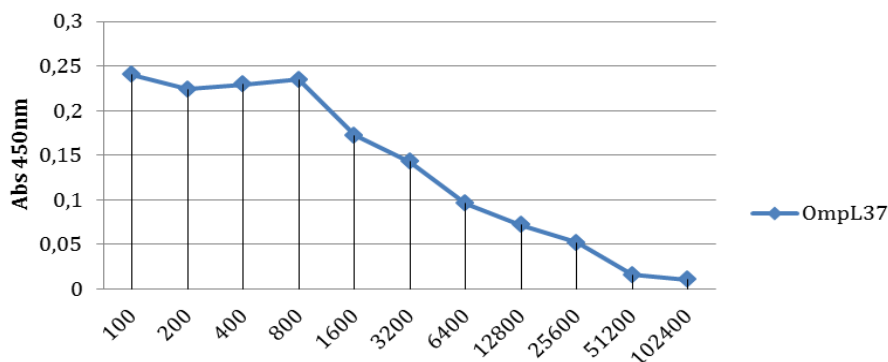


Figura 1- Titulação dos anticorpos policlonais anti-rOmpL37 em ELISA indireto: rOmpL37 (100ng/poço), anticorpo secundário anti-IgG de camundongo diluído 1:1.000.

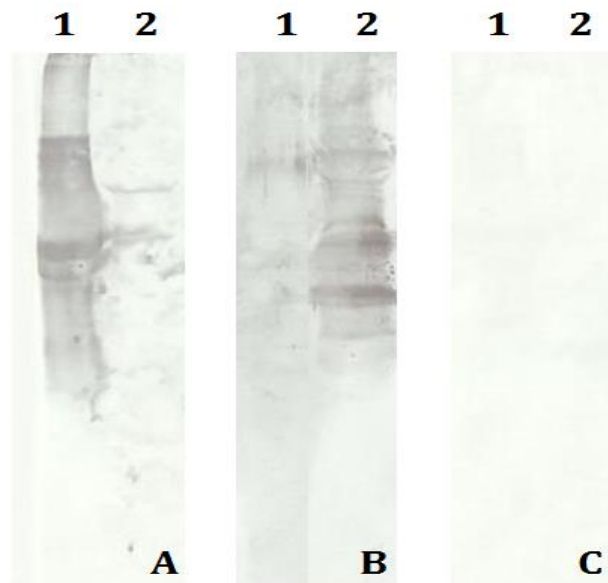


Figura 2 - *Western blotting* para a caracterização dos pAbs anti-rOmpL37. 1- rOmpL37, 2- *L. interrogans* L1-130: A- pAb anti-rOmpL37, B- Controle positivo (pAb anti-*L. interrogans*); C- Controle Negativo (soro normal de camundongo).

4. CONCLUSÕES

Os pAbs anti-rOmpL37 produzidos foram capazes de reconhecer as proteínas OmpL37 recombinante e nativa. Esses anticorpos policlonais podem ser úteis em pesquisas visando o entendimento da função da proteína OmpL37 na patogênese da *Leptospira* e em estudos que visam o desenvolvimento de ensaios diagnósticos para a detecção do patógeno e para compor ensaios de detecção de anticorpos para a leptospirose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, B.; MONTEZUMA A. P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, Melbourne, v.140, n.3-4, p.287-296, 2010.

BHARTI, A. R.; NALLY, J.; RICARDI, J. N.; MATTHIAS, M.A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v.3, n.12, p.757 - 771, 2003.

BROD, C. S.; HARTLEBEN, C. P.; ALEIXO, J. A. G.; JOUGLARD, S. D.; TEIXEIRA, J. L. R.; DELLAGOSTIN, O. A. Evidência do cão como reservatório da leptospirose humana: isolamento de um sorovar, caracterização molecular e utilização em inquérito sorológico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 38, n.4, p. 294-300, 2005.

ESHGHI, A.; CULLEN, P. A.; COWEN, L.; ZUERNER, R. L.; CAMERON, C. E. Global proteome analysis of *Leptospira interrogans*. **Journal of Proteomic Research**, Washington, v.8, n.10, p.4564-4578, 2009.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira* and Leptospirosis, **Internacional Jornal of Medical Sciences**, Melbourne, 1999, 2ed.

HARTWIG, D. D.; SEIXAS, F. K.; CERQUEIRA, G. M.; MCBRIDE, A. J.; DELLAGOSTIN, O. A. Characterization of the immunogenic and antigenic potential of putative lipoproteins from *Leptospira interrogans*. **Current Microbiology**, New York, v.62, n.4, p.1337-1341, 2011.

PINNE, M.; HAAKE, D. A. A comprehensive approach to identification of surface-exposed, outer membrane-spanning proteins of *Leptospira interrogans*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, Los Angeles, v.4, n.6, p.6071, 2009.

PINNE, M; CHOY, HA; HAAKE D. A. The OmpL37 surface-exposed protein is expressed by pathogenic *Leptospira* during infection and binds skin and vascular elastin. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, Los Angeles, v.4, n.9, p.815, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. World Health Organization. Amsterdam, 2003.