

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

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

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

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* (FAINE et al., 1999), transmitida principalmente através da urina de animais infectados (MUSSO E LA, 2013). Este patógeno é mantido no ambiente através de hospedeiros suscetíveis ou reservatórios, que eliminam as bactérias na urina, contaminando o solo e a água (LEVETT, 2001).

Atualmente, o diagnóstico da leptospirose é baseado na sintomatologia clínica, métodos sorológicos, isolamento ou detecção da *Leptospira* em amostras biológicas dentre outros. (FAINE et al., 1999). Dentre os métodos sorológicos utilizados, o teste de aglutinação microscópica (MAT), que utiliza cepas de leptospirosas vivas para a reação com soros de humanos e animais, é considerado o “padrão ouro” para o diagnóstico da doença (WHO, 2003). Entretanto, o MAT apresenta baixa sensibilidade na fase aguda da doença, devido aos níveis de anticorpos não detectáveis nesse período (MUSSO E LA, 2013), e um alto grau de reações cruzadas com outros sorovares (ADLER; MONTEZUMA, 2010).

O estudo de proteínas presentes exclusivamente em leptospirosas patogênicas e expressas por cepas virulentas da bactéria (ADLER et al., 2011), tem resultado na identificação de novos alvos para o desenvolvimento de testes diagnósticos e vacinas (NASCIMENTO et al., 2004; PINNE, MATSUNAGA, HAAKE, 2012; VIEIRA et al., 2009). A lipoproteína LemA, presente em leptospirosas patogênicas e virulentas, contém uma hélice transmembrana na região N-terminal tendo sido predito que uma porção desta região N-terminal é extracelular, contudo a função molecular exata desta proteína ainda é incerta (HARTWIG et al., 2011).

Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi a produção de anticorpos policlonais (pAbs) contra a proteína LemA em sua forma recombinante (rLemA), 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, foram administradas cinco doses de rLemA (75 µg por dose) nos dias 0, 14, 21, 28 e 39. As inoculações foram realizadas individualmente em três camundongos Balb/c fêmeas com oito semanas de idade. Para o primeiro inóculo, foi utilizado adjuvante completo de Freund (1:1) e, nos 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 rLemA para sensibilização das placas. Depois de confirmada a soroconversão, o sangue total foi coletado, centrifugado a 3.000rpm por 5min, e o soro utilizado para a titulação dos pAbs através de ELISA indireto.

Para o ELISA indireto, placas de poliestireno foram sensibilizadas com 100ng/cavidade de rLemA 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, foram adicionados os anticorpos secundários anti-IgG de camundongo conjugados à peroxidase. Como controles negativo foi utilizado soro normal de camundongo e como controle positivo, soro policlonal anti-*L. interrogans* sorovar Canicola cepa CCZ463 produzido em coelho (BROD et al., 2005). Entre todas as etapas as placas foram incubadas a 37°C por 1h, e posteriormente, foram realizadas três lavagens com *phosphate buffered saline* (PBS) contendo 0,05% de *tween* 20 (PBS-T). As reações foram reveladas com solução substrato/cromógena contendo *o-phenylenediamine* (0,4mg/mL em 0,1M tampão citrato, pH 5,0) e 0,03% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) durante 15min. As densidades óticas (DO) foram mensuradas a 450nm usando VICTORTM X5 Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer, USA).

Para o *Western blotting*, *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 virulentas e a proteína rLemA foram submetidas a SDS-PAGE 15% sob condições redutoras. Então, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada com SFB 1% + PBS por 1h a temperatura ambiente sob agitação e posteriormente adicionado o pAb anti-rLemA. Os soros controles utilizados foram os mesmos descritos no ensaio ELISA. Entre todas as etapas foram realizadas incubações a 37°C por 1h e três lavagens com PBS-T. As reações foram reveladas com solução substrato cromógena contendo 0,6mg 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-rLemA foram capazes de reagir com a proteína rLemA, alcançando o título de 51.200, conforme a Figura 1. No *Western blotting*, o pAb anti-rLemA foi capaz de reagir tanto com a proteína na sua forma recombinante, reconhecendo a banda com peso molecular de 17kDa, quanto com a proteína nativa presente em *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130, conforme evidenciado na Figura 2.

O título do pAb anti-rLemA de 51.200 comprova a imunogenicidade e antigenicidade da rLemA ao reagir com o pAb correspondente, evidenciando que a reação com a proteína até a diluição de 1:51.200. No *Western blotting*, os resultados se mostraram promissores, pois os anticorpos policlonais anti-rLemA além de reagir com a rLemA, também foram capazes de reagir com o extrato de *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130, ou seja, com a proteína na forma nativa, permitindo a conclusão de que os pAbs anti-rLemA apresentam conformações semelhantes à anticorpos contra a proteína LemA na sua forma nativa (PINNE; HAAKE, 2009).

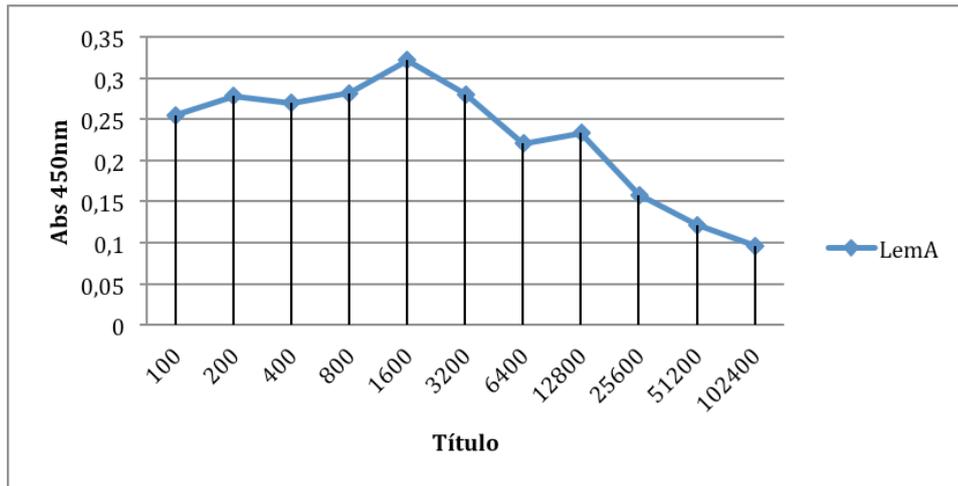


Figura 1: Curva de Titulação do pAb anti-rLemA em ELISA indireto com o antígeno recombinante rLemA. Controle positivo (pAb anti-*L. interrogans* sorovar Canicola cepa CCZ463) - Abs 450nm = 0,320; C- (Soro Normal de Camundongo) - Abs 450nm = 0,0075.

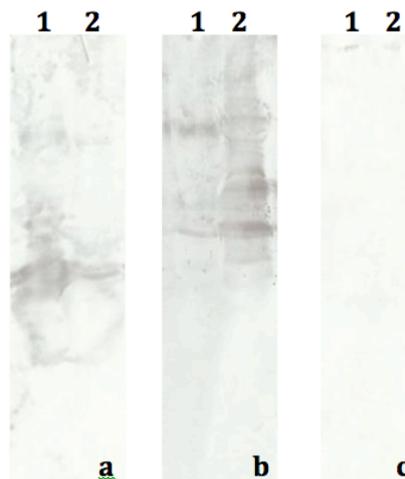


Figura 2: *Western blotting* para a caracterização dos pAbs anti-rLemA. 1: rLemA, 2: *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130; a: pAb anti-rLemA, b: Controle positivo (pAb anti-*L. interrogans* sorovar Canicola cepa CCZ463); c: Controle Negativo (soro normal de camundongo).

4. CONCLUSÕES

Os pAbs anti-rLemA produzidos foram capazes de reconhecer a proteína LemA nas formas recombinante e nativa. Esses pAbs podem ser utilizados em pesquisas visando o entendimento da função da proteína LemA na patogênese das leptospiroses, 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.
- ADLER, B.; LO, M.; SEEMANN, T.; MURRAY, G. L. Pathogenesis of leptospirosis: the influence of genomics. **Veterinary Microbiology**, Melbourne, v.153, n.1-2, p.73-81, 2011.
- 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.
- 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.
- LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington DC, v.14, n.2, p.296-326, 2001.
- MUSSO, D.; LA, S. B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge. **Journal of Microbiology**, Epub ahead of print 2013.
- NASCIMENTO, A. L.; KO, A. I.; MARTINS, E. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; HO, P. L.; HAAKE, D. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; HARTSKEERL, R. A.; MARQUES, M. V.; OLIVEIRA, M. C.; MENCK, C. F.; LEITE, L. C.; CARRER, H.; COUTINHO, L. L.; DEGRAVE, W. M.; DELLAGOSTIN, O. A.; EL-DORRY, H.; FERRO, E. S.; FERRO, M. I.; FURLAN, L. R.; GAMBERINI, M.; GIGLIOTI, E. A.; GOES-NETO, A.; GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. H.; HARAKAVA, R.; JERONIMO, S. M.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; KIMURA, E. T.; KURAMAE, E. E.; LEMOS, E. G.; LEMOS, M. V.; MARINO, C. L.; NUNES, L. R.; DE OLIVEIRA, R. C.; PEREIRA, G. G.; REIS, M. S.; SCHRIEFER, A.; SIQUEIRA, W. J.; SOMMER, P.; TSAI, S. M.; SIMPSON, A. J.; FERRO, J. A.; CAMARGO, L. E.; KITAJIMA, J. P.; SETUBAL, J. C.; VAN SLUYS, M. A. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **Journal of Bacteriology**, Washington DC, v.186, n.7, p.2164-2172, 2004.
- 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.; MATSUNAGA, J.; HAAKE, D. A. Leptospiral outer membrane protein microarray, a novel approach to identification of host ligand-binding proteins. **Journal of Bacteriology**, Washington DC, v.194, n.22, p.6074-6087, 2012.
- VIEIRA, M. L.; PIMENTA, D. C.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. Proteome Analysis of *Leptospira interrogans* Virulent Strain. **The Open Microbiology Journal**, v.3, p.69-74, 2009.
- WHO Human leptospirosis: **Guidance for diagnosis, surveillance and control**. Genebra, 2003.