

Produção de Imunoglobulina Y contra a proteína recombinante rLipL32 de *Leptospira interrogans*

ANCIUTI, Andreia Nobre¹; DINIZ, Juliana Alcoforado²; VASCONCELLOS, Flávia Aleixo³; COLONETTI, Karina²; SILVA, Éverton Fagonde¹

¹Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária ; ²Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, ³Universidade Federal de Pelotas, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
andreianciuti@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose tem sido considerada nos últimos anos como um importante problema de saúde pública mundial, devido ao aumento na sua morbidade e mortalidade. Esta zoonose é causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* (GANOZA et al., 2010) onde, até o momento, já foram descritos mais de 260 sorovares (CERQUEIRA; PICARDEAU, 2009).

Nos últimos anos, vários grupos de pesquisa em diferentes países têm empregado novas estratégias para o diagnóstico precoce e imunoprofilaxia (FRAGA; BARBOSA; ISAAC, 2010). Estudos para a identificação de componentes imunogênicos nas leptospirosas, com potencial para serem usados em testes diagnósticos resultaram na caracterização de várias lipoproteínas que são expressas na membrana externa durante a infecção (CULLEN et al., 2005). Dentre essas, a lipoproteína LipL32 é a mais abundante na membrana externa das leptospirosas, possuindo a capacidade de ligação a matriz extracelular, sendo altamente imunogênica e considerada uma importante hemolisina (HOKE et al., 2008). Dessa forma, LipL32 possui um grande potencial para atuar como um importante antígeno no diagnóstico da leptospirose tanto na forma aguda como na forma convalescente da doença.

As imunoglobulinas IgY são as mais abundantes em galinhas, principalmente no sangue circulante e na gema do ovo. A porção Fab possui sítios de ligação de antígenos e a porção Fc é responsável pela ativação do complemento, opsonização e degranulação de mastócitos nas reações anafiláticas. Os anticorpos de galinha apresentam importantes vantagens para o reconhecimento de epítomos nos imunoenaios, quando comparados aos de mamíferos (SILVA; TAMBOURGI, 2010). As propriedades antibacterianas da IgY tem sido mais intensamente estudadas nos últimos anos, sendo amplamente empregada na prevenção da infecção *in vivo* (LEE et al., 2002).

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi expressar a proteína de membrana externa LipL32 na forma recombinante e realizar a imunização de galinhas com rLipL32 para a obtenção e caracterização de anticorpos IgY anti-rLipL32.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cepas e rLipL32: Quatro cepas foram utilizadas no presente estudo: -*L. interrogans* cepa Fiocruz L1-130; - *L. interrogans* cepa Kito; - *L. noguchii* cepa Bonito; e - *L. borgpetersenii* cepa 4E. Todas as cepas foram cultivadas em meio líquido EMJH a 30°C. A expressão da proteína recombinante LipL32, foi realizada

conforme descrito anteriormente por SEIXAS et al (2007). Assim, o plasmídeo *pAE/lipL32* foi utilizado nas etapas subsequentes até a obtenção de rLipL32. A expressão e antigenicidade de rLipL32 foi testada através de *Western blot (WB)*, utilizando soros de animais convalescentes de leptospirose.

2.2 Imunização das galinhas com rLipL32: Neste estudo, duas galinhas poedeiras (raça Leghorn) com 29 semanas foram utilizadas. As aves foram imunizadas através da via intramuscular com 100µg de rLipL32 (VASCONCELLOS et al.,2010). A coleta de sangue foi realizada nos dias 0, 15, 30 e 45, através da punção da veia ulnar, com uso de seringas e agulhas descartáveis. O sangue foi armazenado em microtubos de 1,5 mL sem anticoagulante, para posterior centrifugação e separação do soro. Nas quatro imunizações, as proteínas foram emulsificadas com o mesmo volume de adjuvante oleoso (Montanide), com intervalo de 15 dias entre as imunizações. Antes de cada uma das imunizações, realizou-se a técnica de ELISA indireto, com soro e proteína recombinante, para avaliar a resposta das aves durante o período de imunização. Os ovos foram coletados a partir do terceiro dia após a quarta e última imunização (dia 48), por até trinta dias e foram estocados em 4 °C até o uso.

2.3 Purificação, quantificação e especificidade das IgY: A purificação das gemas foi realizada utilizando Polietilenoglicol (SCHADE, 2005) e foi monitorada através de eletroforese em gel SDS-PAGE. A concentração de IgY foi mensurada através de quantificação por BCA, utilizando kit comercial. A especificidade das IgY para leptospiros patogênicas foi realizada através de ensaios de ELISA indireto e WB, com a cepa homóloga (Fiocruz L1-130), com as cepas heterólogas Kito, Bonito e 4E, e com rLipL32. No teste de ELISA foram utilizados como anticorpo primário a IgY na diluição de 1:800 e como secundário o conjugado anti-IgY de galinha e peroxidase diluído (1:2000) em PBS. Já no WB as leptospiros virulentas tiveram sua concentração ajustada para 10⁸ células/mL, inativadas a 56 °C overnight e aquecidas a 100°C por 10 minutos em tampão de amostra. As cepas na concentração do extrato de 50µL, a rLipL32 na concentração de 40 µL, juntamente com uma cepa de *E.coli* como controle negativo e um marcador de peso molecular de 1 Kb foram aplicadas em um gel de acrilamida 10% na presença de SDS e separadas por eletroforese. Após a eletroforese, realizou-se a transferência para uma membrana de PVDF, utilizando-se as mesmas diluições de IgY e de conjugado anti-IgY de galinha. A revelação foi desenvolvida com solução cromógena em ambas as reações.

2.4 Aspectos Éticos: Este projeto está cadastrado no COCEPE/UFPeI sob o número 5.00.00.020 e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPeI, processo nº 23110.004657/2010-84, cadastro nº CEEA 4654 e financiado pelo CNPq (Universal 2011, Faixa A, Processo 482180/2011-0).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proteína rLipL32 foi obtida com sucesso e um lote foi identificado e armazenado a -20°C em alíquotas na concentração de 200ug/mL até o uso. Além disso, rLipL32 foi reconhecida no WB com soros de animais convalescentes, demonstrando a sua antigenicidade e funcionalidade.

As imunizações foram realizadas seguindo o protocolo previsto e as coletas de sangue antes de cada imunização permitiram acompanhar a imunogenicidade através do ELISA indireto. No dia 48, procedeu-se a coleta diária dos ovos das duas galinhas até o dia 78.

Após a coleta dos primeiros 20 ovos, procedeu-se o início do processo de purificação das IgY das gemas. Para analisar a pureza dos anticorpos produzidos foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida com um tampão redutor o que possibilitou observar duas bandas, uma de cadeia leve (25kDa) e outra pesada (67kDa) do IgY, como demonstrado na Fig 1. Na quantificação por BCA foram obtidos para os IgY purificados a concentração de 13mg/mL.

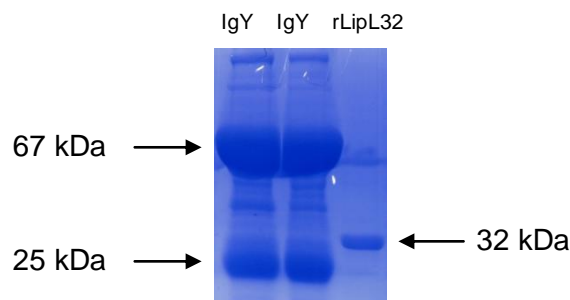


Figura 1. SDS-PAGE com a IgY purificada em condições redutoras

Através da técnica de WB foi possível visualizar a reação entre a IgY anti-rLipL32 com as quatro cepas utilizadas neste estudo, demonstrando a detecção da proteína nativa em importantes cepas de *Leptospira* causadoras de doença grave em humanos e animais (Fig.2).



Figura 2. WB com IgY anti-rLipL32 e quatro diferentes cepas de *Leptospira*. No qual o marcador de peso molecular de cor laranja apresenta 30KDa.

A produção de anticorpos específicos em ovos de galinha continua atraindo a atenção da comunidade científica (SCHADE et al., 2005). Além disso, 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). Em adição, a produção de IgY contra leptospirosas inteiras ou proteínas recombinantes constitui-se em uma alternativa de baixo custo do que a produção de anticorpos em mamíferos.

4 CONCLUSÃO

A IgY anti-rLipL32 produzida e caracterizada neste estudo reconhece a proteína LipL32 nativa nas cepas patogênicas e virulentas pertencentes aos principais sorogrupos causadores de doença grave e óbito em humanos e animais no Brasil e no mundo. Esses achados sugerem que a IgY anti-LipL32 tem potencial para ser utilizada em diferentes formatos de testes imunodiagnóstico e imunoprofilaxia da leptospirose.

5 REFERÊNCIAS

- CERQUEIRA, GM; PICARDEAU, M. A century of *Leptospira* strain typing. **Infection and Genetic Evolution**, v. 5, p. 760-768, 2009.
- CULLEN, PA; XU, X; MATSUNAGA, J; SANCHEZ, Y; KO, AI; HAAKE, DA; ADLER, B. Surface of *Leptospira spp.* **Infection and immunity**, v.73, n. 8, p. 4853-4863, 2005.
- FRAGA, TR; BARBOSA, AS; ISAAC, L. Leptospirosis: Aspects of Innate Immunity, Immunopathogenesis and Immune Evasion From the Complement System. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.73, n. 5, p. 408-419, 2010.
- GANOZA, CA; MATTHIAS, MA; SAITO, M; CESPEDES, M; GOTUZZO, E; VINETZ, JM. Asymptomatic Renal Colonization of Humans in the Peruvian Amazon by *Leptospira*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.4, n.2, p.1-10, 2010.
- HARTSKEERL, RA; COLLARES, M; ELLIS, WA. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clinical microbiology and infection**, v.17, n.4, p.494-501, 2011.
- HOKE, DE; EGAN, S; CULLEN, PA; ADLER, B. LipL32 Is an Extracellular Matrix-Interacting Protein of *Leptospira ssp.* and *Pseudoalteromonas tunicata*. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 5, p. 2063-2069, 2008.
- LEE, EN; SUNWOO, HH; MENNINEN, K; SIM, JS. In Vitro Studies of Chicken Egg Yolk Antibody (IgY) Against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. **Immunology and molecular biology**, v. 81, p. 632-641, 2002.
- 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.
- SEIXAS, FK; FERNANDES, CH; HARTWIG, DD; CONCEIÇÃO, FR; ALEIXO, JA; DELLAGOSTIN, OA. Evaluation of different ways of presenting LipL32 to the immune system with the aim of developing a recombinant vaccine against leptospirosis. **Canadian Journal of Microbiology**, v.53, n.4, p.472-479, 2007.
- SILVA, WD; TAMBOURGI, DV. IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 135, n. 3-4, p. 173-180, 2010.
- 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.