



DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DE LEPTOSPIRA EM TECIDOS

DINIZ, Juliana Alcoforado¹; COUTINHO, Mariana Loner²; Jessiane Prestes Künkel³; MONTE, Leonardo Garcia²; VASCONCELLOS, Flávia Aleixo²; AMARAL, Marta G.²; RAPOSO, Joseane Bonel⁴; CONCEIÇÃO, Fabricio Rochedo²; ALEIXO, José Antonio Guimarães².

1 – Instituto de Biologia – UFPel; 2 – Centro de Biotecnologia – UFPel; 3 – Faculdade de Medicina – UFPel; 4 – Faculdade de Veterinária – UFPel.

Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900.
marianaloner@yahoo.com.br

Introdução:

A leptospirose é uma zoonose cosmopolita causada pela espiroqueta patogênica do gênero *Leptospira spp.* Segundo a Organização Mundial da Saúde, essa é a doença transmitida por animais mais difundida no mundo todo, uma vez que acomete homens e animais através do contato com a água, urina e tecidos animais infectados. Um dos principais obstáculos na prevenção dessa doença é a dificuldade no diagnóstico precoce, já que na fase inicial ela pode ser assintomática ou confundida com outras doenças febris comuns.

Em vista da dificuldade no diagnóstico clínico da leptospirose, faz-se necessário o diagnóstico laboratorial usando amostras de fluídos ou tecidos de pacientes para a detecção de anticorpos e/ou antígenos específicos que são produzidos durante a infecção (COUTINHO, 2005).

Sabe-se que existem várias proteínas expostas na superfície da membrana dessa bactéria que interagem com o sistema imune (CULLEN et al., 2004; CULLEN et al. 2005) e que desempenham um papel na virulência da bactéria. As proteínas conhecidas como *Leptospiral immunoglobulin-like* são expressas somente na membrana de leptospiros patogênicas e elas sofrem expressão diferencial *in vivo* e *in vitro* de acordo com a osmolaridade do meio externo.

A imunohistoquímica é um recurso diagnóstico para a identificação de constituintes teciduais ou celulares através da interação antígeno-anticorpo. Este trabalho visa a padronização dessa técnica para detectar a expressão de adesinas presentes exclusivamente na membrana de leptospiros patogênicas tal como a LigA e LigB, além de testar a eficácia de anticorpos monoclonais específicos contra essas proteínas.

Metodologia

1. Antígenos e anticorpos:

Neste trabalho foram utilizadas cepas virulentas de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 e a *L. interrogans* sorogrupo Canicola cepa kito para a inoculação dos animais. As cepas foram mantidas em meio EMJH e a sua virulência foi mantida através da passagem em hamsters. Os anticorpos monoclonais (MAbs) utilizados neste trabalho foram previamente produzidos pelo laboratório de Imunologia Aplicada do Centro de Biotecnologia da UFPel (SEYFFERT, 2007) sob a forma de ascite. Os MAbs utilizados reagem especificamente com as proteínas LigA e LigB.

2. Amostras teciduais:

As leptospiros virulentas foram inoculadas por via intraperitoneal em hamsters e posteriormente as amostras teciduais foram removidas, colocadas em formol tamponado e então os rins e pulmões foram fixados em blocos de parafina, cortados e colocados em lâminas previamente silanizadas. A inoculação dos animais e a posterior coleta dos órgãos foi realizada na Fiocruz - Salvador no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular.

3. Imunohistoquímica:

As lâminas foram submetidas a diversos banhos, conforme a seguir. Inicialmente, submersas em xilol e acetona por 5 minutos cada, seguido pela hidratação das lâminas que consiste em colocar em álcool absoluto, álcool 70%, álcool 50% e álcool 30% por 3 minutos em cada solução e depois lavar em água destilada e 2x em PBS.

Posteriormente, foi utilizado o kit LSAB2 (DakoCytomation) de acordo com o protocolo proposto pelo fabricante com pequenas alterações. Brevemente, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (3%) por 15 - 20 minutos. Após a lavagem com água destilada foram colocados cada um dos MAbs (ascite sem diluição) e o controle negativo (PBS) e deixados em incubação por 1h em câmara úmida a 37°C. A reação foi revelada pela utilização de anticorpo anti-*mouse* biotilado por 15 minutos e após a lavagem foi adicionado conjugado de estreptoavidina ligada a peroxidase de raiz forte. Como cromógeno foi utilizado tetra-hidroclorato de diaminobenzidina (DAB) por 10 segundos.

A contracoloração foi realizada com hematoxilina durante 7 minutos, e por fim, foi realizada a desidratação das lâminas passando progressivamente de álcool até o xilol e a montagem das lâminas com entellan para fixar a lamínula.

Resultados e discussão

Os tecidos obtidos de hamsters artificialmente contaminados com 1×10^8 leptospiras.mL⁻¹ foram utilizados como amostras para observação da expressão das proteínas Ligs.

Conforme se observa na figura 1, houve reação positiva visualizada através da marcação em marrom claro nos cortes nos quais um ou outro anticorpo foi utilizado especialmente na luz dos túbulos renais e nos alvéolos pulmonares.

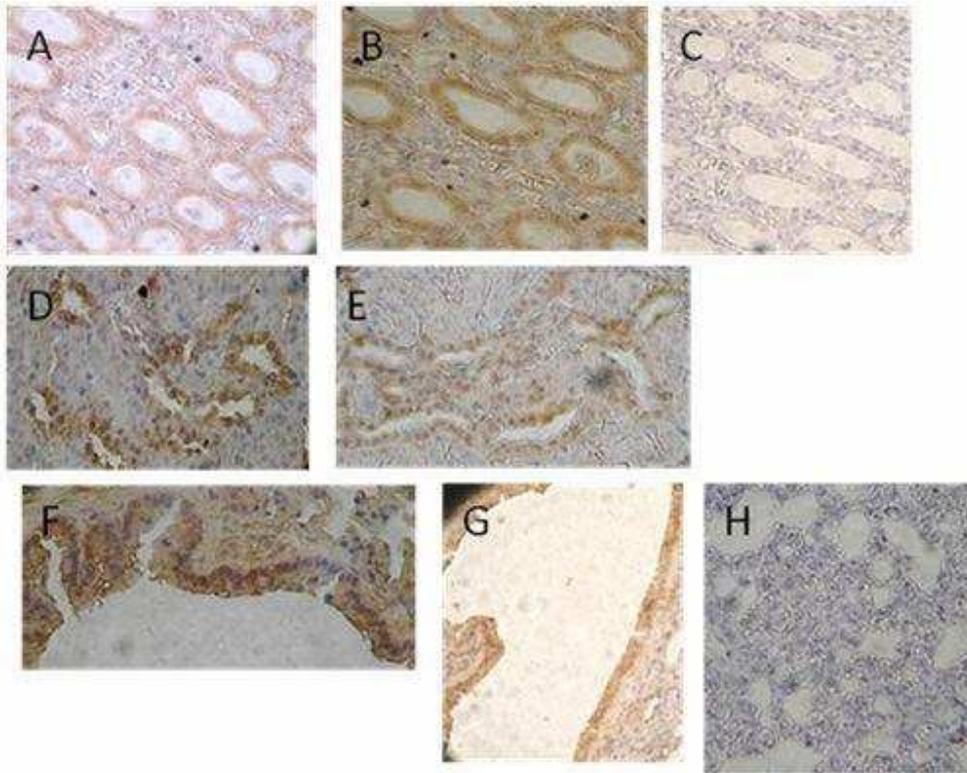


Figura 1: Cortes histológicos de rim (A-E) e pulmão (F-G). Cortes A, D e F: MAb LigAni1; Cortes B, E e G: MAb LigBni5; Cortes C e H: Controle negativo de rim e pulmão respectivamente

Diversos autores (BOENISCH, 2001 e Miller, 2001) relatam que o uso de técnicas de recuperação de epítomos pode ser muito útil na melhoria das reações visualizadas pela imunohistoquímica. Nenhum dos dois anticorpos testados demonstrou melhoria na reação quando foi utilizada a recuperação de antígenos nos cortes (dados não mostrados).

O Laboratório de Imunologia Aplicada possui outros MAbs contra esses mesmos antígenos e que deverão ser futuramente ser testados.

Conclusões

A imunohistoquímica mostrou ser um método de fácil execução e que demanda pouco tempo de preparação depois que a técnica foi padronizada. Os dois MAbs testados demonstraram reações positivas em tecidos animais infectados e devem ser futuramente utilizados em experimentos para a

determinação do perfil de expressão das proteínas Ligs em diferentes modelos experimentais e tempos de infecção.

Referência Bibliográfica

BRITO, T. On the pathogenesis of the hepatic and renal lesions in leptospirosis. *Rev. Int. Med. Trop.* v.10, p.1001-1003, 1968.

BOENISCH, T. (Ed.) **Immunochemical Staining Methods**, 3ª ed., Califórnia: Dako, 2001.

Miller, R. (Ed.) **Technical Immunohistochemistry: Achieving reliability and reproducibility of immunostains**, 1ª ed., ProPath Laboratory, Inc. Nova Iorque. 2001

COUTINHO, MARIANA LONER. **Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra LipL32, uma proteína de membrana externa de leptospiras patogênicas**. 2005. 43f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Agrícola)-Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2005.

CULLEN, P.A.; XU, X.; MATSUNAGA, J.; SANCHEZ, Y.; KO, A.I.; HAAKE, D.; ADLER, B. . Surfaceome of *Leptospira* spp. **Infection and Immunity** 73 (8): 4853–4863. 2005.

HAANWINCKEL, M.C.S.; MEGID, J.; SOUZA, L.C.. Imunoperoxidase como recurso diagnóstico na leptospirose animal. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.71, n.3, p.293-301, jul./se

SEYFFERT, Núbia. **Anticorpos monoclonais contra as proteínas LigA e LigB de leptospiras patogênicas: produção e caracterização**. 2007. 54f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Agrícola) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas, 2007.