



PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO DE ADESÃO DE LEPTOSPIRAS A CÉLULAS VERO

DINIZ, Juliana Alcoforado¹; COUTINHO, Mariana Loner²; SILVA, Éverton Fagonde²; ALEIXO, José Antonio Guimarães².

1 – Instituto de Biologia – UFPel; 2 – Centro de Biotecnologia – UFPel
Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900.
juju_adiniz@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO:

A *Leptospira* é uma bactéria da família Leptospiraceae, a qual difere das demais bactérias pela presença de um endoflagelo interno conferindo-lhe grande motilidade (FAINE, 1999). Atualmente, esse gênero bacteriano é composto por 19 espécies genômicas que são classificadas em saprófitas, intermediárias e patogênicas. Contudo, a unidade sistemática básica mais aceita é o sorovar, que é definido em base à similaridade antigênica dos isolados. Já foram descritos mais de 60 sorovares saprófitas e 200 sorovares patogênicos, dentro os quais, são agrupados em 25 sorogrupos (ADLER; MOCTEZUMA, 2009).

As espécies patogênicas dessa bactéria constituem o agente etiológico da leptospirose, que é a zoonose mais difundida no mundo inteiro (WHO, 2003). Essa doença ocorre de forma cosmopolita e é sério problema de saúde pública tanto em países desenvolvidos, no qual é conhecida como uma doença ocupacional (LEVETT, 2001), como em países em desenvolvimento, onde apresenta caráter endêmico e está relacionada com enchentes e falta de saneamento básico (McBRIDE, 2005).

Os reservatórios naturais das leptospiras são animais silvestres e domésticos, particularmente os roedores sinantrópicos, enquanto os humanos são considerados como hospedeiros acidentais que se infectam através do contato com água, urina e tecidos animais contaminados (FAINE, 1999). Os pacientes com essa enfermidade apresentam sintomas que podem ser facilmente confundidos com outras doenças febris como gripe, hepatite e dengue (LEVETT, 2001).

Na leptospirose, a patogenia da infecção se baseia, principalmente, na interação de proteínas e adesinas de superfície com receptores no tecido do hospedeiro. Recentemente, diversas proteínas de membrana externa (OMPs) foram caracterizadas por se ligarem a componentes da matriz extracelular (ECM),

incluindo as proteínas Len, LipL32 e *leptospiral immunoglobulin-like proteins* (Ligs). Além disso, as proteínas LigA e LigB, apresentam uma expressão diferencial dependendo das condições ambientais e durante as passagens graduais no cultivo “in vitro” (MATSUNAGA, 2005).

Apesar disso, o conhecimento acerca da patogenia das leptospiros ainda é muito limitado e acredita-se que a adesão à superfície das células do hospedeiro e a sua toxicidade sejam propriedades importantes para a virulência das cepas patogênicas (FAINE, 1994). No presente trabalho é relatada a padronização de um ensaio de adesão de leptospiros a células renais de macacos verdes africanos (células Vero) com o objetivo de, no futuro, utilizá-lo em estudos para investigar a importância de proteínas da superfície na patogenia das leptospiros, juntamente com anticorpos monoclonais (MAbs) produzidos no Laboratório de Imunologia Aplicada do Cenbiot/UFPel contra estas proteínas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

1. Cultivo das células Vero e leptospiros:

As células Vero utilizadas foram gentilmente doadas pelo laboratório de Imunologia e Virologia da Faculdade de Veterinária/UFPel. As células foram cultivadas até confluência em frascos de 75 cm² contendo meio MEM e, após, foram removidas por tripsinização e contadas. Alíquotas de 2 mL de meio de cultivo contendo 1×10^5 células foram colocadas em cavidades de uma placa de cultivo (6 cavidades) que continham uma lamínula esterilizada no fundo e incubadas em estufa de CO₂ a 37 ° C por 48 horas.

As leptospiros patogênicas (*L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130) de cultivo de baixa passagem foram lavadas 2 vezes com PBS estéril por centrifugação a 10000 x g por 45 minutos. Por fim, foram ressuspensas em 1 mL de PBS, contadas em câmara de Petroff- Hausser e sua concentração foi ajustada para 5×10^7 leptospiros mL⁻¹.

2. Ensaio de Adesão:

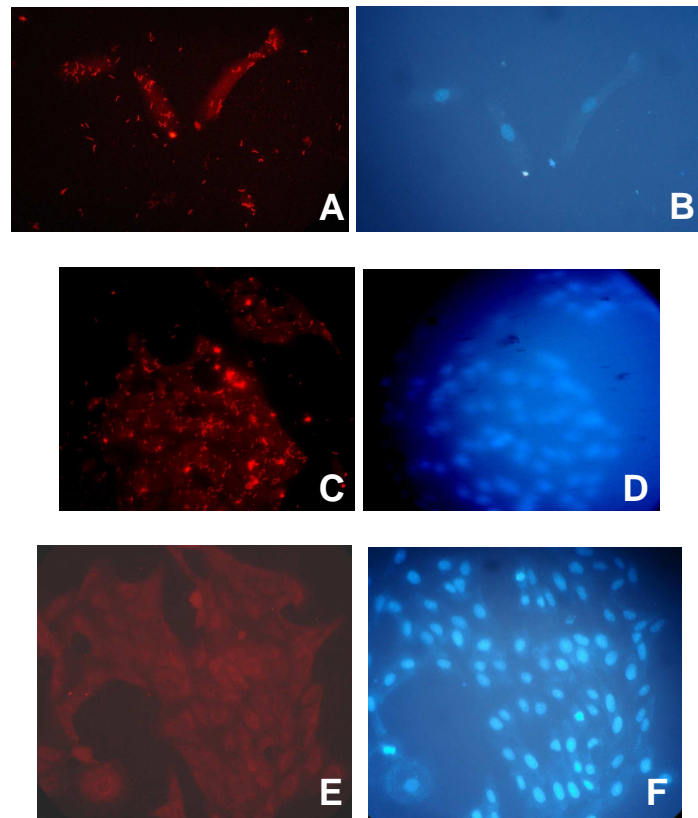
Primeiramente, as lamínulas contendo as células Vero foram lavadas duas vezes com meio MEM incompleto para retirar o antibiótico do meio no qual foram cultivadas. A seguir, colocou-se as 10^7 leptospiros, diluídas em 2 mL de meio incompleto, nas respectivas cavidades das placas contendo as células. A placa foi incubada durante duas horas em estufa a 37°C.

Após o período de incubação as cavidades foram lavadas com PBS e permeabilizadas com metanol por aproximadamente 5 minutos, seguido por mais uma lavagem das lamínulas com PBS. Um “pool” de anticorpos monoclonais que reagem contra as porções Lig A, Lig B e LipL32 na forma de ascite na diluição de 1:50 foi adicionado e deixou-se reagir por mais 1h a 37°C.

Logo após lavou-se novamente com PBS e aplicou-se o conjugado anti-camundongo com Rhodamina na diluição 1:150 por 30 minutos a 37°C, em seguida repetiu-se a lavagem e adicionou-se o corante de DNA Hoestch, por 30 minutos a 37°C. Por fim, lavou-se mais uma vez, retirou-se as lamínulas das cavidades e montou-se as lâminas com entellan.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como é possível observar na Fig. 1 as leptospiiras demonstraram a capacidade de aderirem e invadirem células Vero, conforme esperado. Não ocorreu reação com o soro de camundongo não imunizado (dados não mostrados) e nem do controle na qual não foi utilizado leptospiiras.



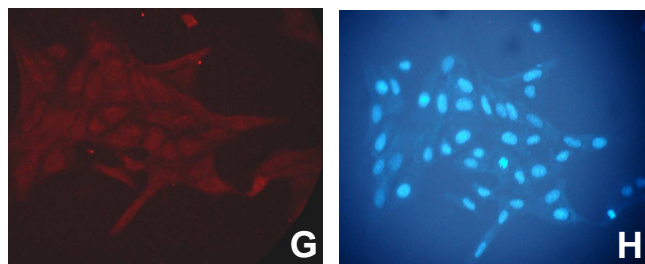


Figura 2: Observação da adesão e invasão de leptospiros em células Vero através de imunofluorescência. (A-C): Invasão das bactérias nas células marcadas com conjugado anti-camundongo com Rhodamina; (B-D): Demonstram a mesma invasão de A e C respectivamente, porém marcadas com Hoestch; (E-G): Controles negativos marcados com o conjugado anti-camundongo com rodhamina; (F-H): Mesmo campo visualizado em E e G respectivamente porém marcadas com Hoestch.

Este resultado permitirá que se desenhe um ensaio de inibição da adesão utilizando MAbS contra LigA e LigB, e contra outras proteínas de superfície de leptospiros, produzidos no Laboratório de Imunologia Aplicada do Cenbiot/UFPeI. Este ensaio de inibição permitirá que se use os MAbS para testar a importância de LigA e LigB, e de outras proteínas de superfície, na adesão e invasão das células Vero por leptospiros.

4. CONCLUSÃO

Como foi possível observar, as leptospiros apresentaram um bom índice de adesão e invasão celular nas células Vero, sendo possível realizar ensaios futuros sobre as proteínas de membrana externa de leptospiros patogênicas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, (2009), doi:10.1016/j.vetmic..03.012. 2009.
- FAINE, S. B.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira* and Leptospirosis. **MediSci: Melbourne**, Australia, 272p.,1999.
- FAINE, S. *Leptospira* and leptospirosis. **CRC Press**, 1994.
- LEVETT, P. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n.2, p. 296 – 326. 2001.
- MATSUNAGA, J.; SANCHEZ, Y.; XU, X.; HAAKE, D. Osmolarity, a key environmental signal controlling expression of leptospiral proteins Lig A and Lig B and the extracellular release of Lig A. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 1, p. 70 – 78. 2005.

MCBRIDE, A.J.A., ATHANAZIO, D.A., REIS, M.G., KO, A.I. Leptospirosis. **Infectious Diseases**, v. 18, n.5, p. 376-386. 2005.

WHO. World Health Organization. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. **WHO Library** Cataloguing-in-Publication Data, 2003.