

**ANTIGENICIDADE DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *Leptospira*
DINIZ, Juliana Alcoforado¹; GALEANO, Valeria Rocha², FAGUNDES, Michel
Quevedo¹; VASCONCELLOS, Flávia Aleixo¹; SILVA, Éverton Fagonde²**

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia/UFPel – juju_adiniz@yahoo.com.br

²Faculdade de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Veterinária/UFPel –
efsilva@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença infecciosa causada por espécies patogênicas de bactérias do gênero *Leptospira*. A doença é classificada como uma antropozoonose direta com ampla distribuição no mundo. Dentro das diferentes espécies genômicas, encontram-se sorovares antigenicamente relacionados, que constituem os sorogrupos. Até o momento, já foram descritos mais de 260 sorovares, distribuídos em 29 sorogrupos (CERQUEIRA, 2009).

O diagnóstico da leptospirose em sua fase inicial é dificultado pelo fato de que as manifestações clínicas da enfermidade são similares aos encontrados em muitas doenças infecciosas. Além disso, a inexistência de um teste laboratorial rápido, com boa sensibilidade e especificidade, impede o emprego de um tratamento precoce principalmente para os grupos de risco (McBRIDE, 2005).

Nos últimos anos, esforços para a identificação de componentes imunogênicos nas leptospirosas, com potencial para o desenvolvimento de vacinas e testes diagnósticos resultaram na caracterização de várias lipoproteínas que são expressas na membrana externa durante a infecção, sendo a LipL32 a mais abundante no seu proteoma (CULLEN, 2004). Além disso, algumas adesinas têm despertado esse mesmo interesse para utilização em vacinais e em testes de diagnóstico. As proteínas LigANI e LigBNI, por exemplo, que possuem domínios semelhantes às imunoglobulinas (MATSUNAGA, 2003), e a função de adesão aos componentes da matriz extracelular e ao fibrinogênio (CHOY, 2007), o que sugere o seu envolvimento nos estágios iniciais de colonização e disseminação da bactéria no momento da infecção.

Baseado nas informações disponíveis sobre o genoma da cepa Fiocruz L1-130, nosso grupo de pesquisas em colaboração com os centros de pesquisas da Fiocruz em Salvador e no Rio de Janeiro, produziu e testou em ensaios laboratoriais anticorpos monoclonais (MAbs) contra rLipL32, rLigANI e rLigBNI, desenvolveu vacinas com rLipL32 que estimularam uma significativa resposta humoral em camundongos e vacinas para hamsters, onde a proteína rLigANI conferiu proteção que variou de 67 a 100% (SILVA, 2007).

Recentemente, Vasconcellos et al (2010) produziram anticorpos policlonais (IgY) contra célula inteira de *L. interrogans* cepa Fiocruz L1-130, a maior causadora de doença urbana no Brasil. Estes anticorpos foram testados em diferentes formatos de ELISA de captura de antígeno, obtendo resultados promissores na detecção de leptospirosas em soros experimentalmente contaminados.

Utilizando uma estratégia semelhante a que foi descrita por Vasconcellos (2010), propomos a produção de anticorpos policlonais IgY contra as proteínas rLipL32, rLigANI e rLigBNI, importantes fatores de patogenicidade das leptospirosas. Sendo assim, em uma etapa inicial do projeto, esse trabalho teve por objetivo

avaliar a antigenicidade de proteínas recombinantes de *L. interrogans*, através de *Western Blot* com soros humanos e caninos convalescentes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amplificação das sequências dos genes e obtenção das proteínas recombinantes:

Todos os procedimentos para a obtenção das proteínas recombinantes foram realizados no laboratório de Biologia Molecular no CDTec/UFPel. As sequências codificadoras de LipL32, LigANI e LigBNI foram amplificadas através de PCR, utilizando a enzima Platinum Pfx DNA Polymerase (Invitrogen). Os produtos de PCR foram clonados nos vetores pAE para obtenção das proteínas recombinantes. Os primers foram desenhados a partir da sequência depositada no GenBank sob o número de acesso NC005823, derivada do sequenciamento de *L. interrogans* cepa Fiocruz L1-130, com o auxílio do software Vector NTI 10.0 (Invitrogen). Os vetores recombinantes pAE/LipL32, pAE/LigANI e pAE/LigBNI foram utilizados para transformar *E. coli* BL21 (DE3) Star™. A expressão das proteínas recombinantes foi induzida com 1 mM de IPTG e a purificação realizada por cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sepharose, utilizando o sistema ÄKTAprime (GE Healthcare). As proteínas purificadas foram quantificadas pelo kit comercial BCA Protein Assay (Thermo Scientific Pierce).

2.2 *Western blot*:

As proteínas de membrana externa de leptospiros patogênicas produzidas na forma recombinante, rLipL32, rLigBNI e rLigANI foram aquecidas a 100 °C por 10 minutos em tampão de amostra (0,25M Tris-HCl, 10%SDS, 0,5% azul de bromofenol, 50% glicerol). As proteínas na concentração de 7,5 µL por cavidade foram aplicadas em um gel de acrilamida 12% na presença de SDS e separadas eletroforicamente. Ao término da eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (GE) em tampão de transferência por 1,5 horas com a fonte ajustada para DDP (diferença de potencial elétrico) = 100 V e C (corrente) = 400mA. Após, as membranas foram bloqueadas com Blotto (5% de leite em pó desnatado em PBS) por 2 h. Os soros de humano convalescente e sadio, cedidos pelo centro de pesquisa da Fiocruz em Salvador, e o de canino foram diluídos (1:50) em PBS e incubados com a membrana. Conjugado anti-IgG de humano e canino e peroxidase foi utilizado diluído (1:6000) em PBS. A revelação foi desenvolvida com solução cromógena (1% de cloronaftol e peróxido de hidrogênio pH 7,6). Cada período de incubação foi realizado por 1h a temperatura ambiente sob agitação. Ao término das incubações as membranas foram lavadas com PBS 3 vezes por 5 minutos cada vez.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Produção das proteínas recombinantes:

As proteínas LipL32, LigBNI e LigANI recombinantes foram produzidas e quantificadas pelo método de BCA, tendo como resultado a concentração de 0,5 µg/µL, 0,6 µg/µL e 0,5 µg/µL, respectivamente.

3.2 Western Blot:

A antigenicidade das proteínas recombinantes rLipL32, rLigBNI e rLigANI, pode ser evidenciada através da técnica de *Western Blot*, tanto em soro humano quanto em soro canino convalescente. Porém, não foi possível visualizar bandas quando reagidas com o soro humano sadio.

Na Figura 1 é possível observar ao lado do marcador de peso molecular as proteínas recombinantes LigBNI e a LipL32 em eletroforese em gel de acrilamida. Já na Figura 2, é possível visualizar bandas reativas de LipL32, LigBNI e LigANI quando reagidas com soros positivos. A proteína LipL32 não foi reconhecida pelo soro canino utilizado, contrariando os resultados observados em outros testes (dados não apresentados). Em todas as reações as quais utilizamos soros de humano e canino saudáveis, não houve o reconhecimento de nenhuma das proteínas.

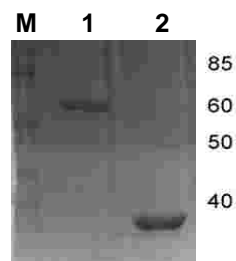


Figura 1 - Eletroforese em gel de acrilamida 12%, mostrando a presença das proteínas recombinantes rLigBNI e rLipL32, onde M= marcador 1 Kb; 1= rLigBNI; 2= rLipL32.

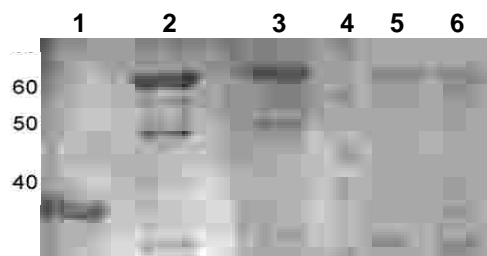


Figura 2 - *Western blot* representativo, demonstrando reação das proteínas recombinantes. 1=LipL32(soro humano); 2=LigBNI (soro humano); 3=LigBNI (soro canino); 4= marcador; 5=LigANI (soro humano); 6=LigANI (soro canino).

4. CONCLUSÕES

As proteínas recombinantes LigANI e LigBNI produzidas neste estudo são antigênicas quando testadas com soros humano e canino convalescentes de leptospirose.

A proteína recombinante LipL32 produzida neste estudo é antigênica quando testada apenas com soro humano convalescente de leptospirose.

Assim, as proteínas recombinantes LigANI e LigBNI devem ser utilizadas na imunização de galinhas para a obtenção de anticorpos policlonais (IgY). A proteína LipL32 deve ser testada com um outro painel de soros convalescentes caninos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CERQUEIRA, G.M.; PICARDEAU, M. A century of *Leptospira* strain typing. **Infection and Genetic Evolution**. v. 5, p. 760-768, 2009.

CHOY, H.A.; KELLEY, M.M.; CHEN, T.L.; MØLLER, A.K.; MATSUNAGA, J.; HAAKE, D.A. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. **Infection and Immunity**. v. 75, n.5, p. 2441-2450, 2007.

CULLEN, P.A.; HAAKE, D.A.; ADLER, B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 28, n. 3, p. 291-318, 2004.

MATSUNAGA, J.; BAROCCHI, M.A.; CRODA, J.; YOUNG, T.A.; SANCHEZ, Y.; SIQUEIRA, I.; BOLIN, C.A.; REIS, M.G.; RILEY, L.W.; HAAKE, D.A.; KO, A.I. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Molecular Microbiology**. v. 49, n. 4, p. 929-45, 2003.

McBRIDE, A.J.; ATHANAZIO, D.A.; REIS, M.G.; KO, A.I. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**. v. 18, n. 5, p. 376-86, 2005.

SILVA, E.F.; MEDEIROS, M.A.; McBRIDE, A.J.; MATSUNAGA, J.; ESTEVES, G.S.; RAMOS, J.G.; SANTOS, C.S.; CRODA, J.; HOMMA, A.; DELLAGOSTIN, O.A.; HAAKE, D.A.; REIS, M.G.; KO, A.I. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**. v. 25, n. 33, p. 6277-628, 2007.

VASCONCELLOS, F.A.; COUTINHO, M.L.; SILVA, E.F.; FERNANDES, C.P.; MONTE, L.G.; SEYFFERT, N; DELLAGOSTIN, O.A.; ALEIXO, J.A. 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.