



CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA A REGIÃO IDÊNTICA DE LigA E LigB DE *Leptospira interrogans*

MONTE, Leonardo Garcia¹; GOUVÊA, Lidiane Pires¹; SILVA, Éverton Fagonde²; SEIXAS, Fabiana Kömmling²; COUTINHO, Mariana Loner¹; CONCEIÇÃO, Fabrício Rochedo¹; DELLAGOSTIN, Odir Antônio²; ALEIXO, José Antonio Guimarães¹.

1 Laboratório de Imunologia Aplicada – Centro de Biotecnologia – CenBiot/UFPEL

2 Laboratório de Biologia Molecular – Centro de Biotecnologia – CenBiot/UFPEL

Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900.

lidi_pel@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose causada por espécies patogênicas de bactérias pertencentes ao gênero *Leptospira*. Diversos mamíferos albergam este microrganismo, sendo os do gênero *Rattus* a fonte mais importante de infecção humana no ambiente urbano. O amplo espectro clínico da doença varia desde casos leves com febre e dores de cabeça até os mais graves com falha renal e hepática que podem levar o indivíduo à morte. Devido aos distintos graus de severidade a leptospirose é freqüentemente confundida com outras doenças como gripe e dengue (McBride *et al.*, 2005; Athanzio *et al.*, 2008).

O teste de aglutinação microscópica (MAT) é o ensaio laboratorial de referência para a leptospirose, entretanto, ele não permite o diagnóstico durante a fase inicial da doença devido à ausência de anticorpos detectáveis contra os antígenos leptospirais nos primeiros dias após a infecção (Thongboonkerd, 2008).

Recentemente foram identificadas as lipoproteínas de superfície LigA e LigB que podem estar relacionadas à virulência das leptospiras por terem uma estrutura de adesina semelhante a intimina de *Escherichia coli* e invasina de *Yersinia pseudotuberculosis*. Essas proteínas interagem com moléculas da matriz extracelular como a laminina, o fibrinogênio e o colágeno (Yi-Pin Lin, Yung-Fu Chang 2008; Choy *et al.*, 2007).

Em vista dos problemas encontrados para diagnosticar a fase precoce da leptospirose, o presente trabalho objetivou aferir a reatividade de anticorpos monoclonais (mAbs), produzidos contra um fragmento recombinante correspondente a região idêntica entre LigA e LigB (LigBrep), com o antígeno nativo presente em *L. interrogans* visando a elaboração de novos testes de imunodiagnóstico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os mAbs R1, R2, R3, R4 e R6 utilizados no presente estudo, para os ensaios de imunofluorescência e *immunoblotting* foram produzidos em 2007 no Centro de Biotecnologia da UFPEL contra a região idêntica das proteínas LigA e LigB (Figura 1).

A imunofluorescência indireta foi realizada em lâminas de vidro previamente sensibilizadas com poli-L-lisina (1%). Alíquotas de cultivos de *Leptospira spp.* patogênica e saprófitas (cepas Fiocruz L1-130 e Patoc I, respectivamente) contendo $3,5 \times 10^6$ células viáveis e intactas foram adicionadas à lâmina e deixadas até secar. Após as lâminas serem bloqueadas com 10% de soro fetal bovino (SFB) os mAbs anti-LigB (ascite) foram adicionados. Os anticorpos que se ligaram a superfície da bactéria foram detectados com anticorpo de cabra polivalente anti-camundongo conjugado com FITC (isotiocianato de fluoresceína). Para confirmar a presença da bactéria na lâmina o DNA foi corado com Hoechst. Como controle positivo foi usado um mAb anti-LipL32 (1D9), contra a proteína de membrana externa mais abundante em leptospiros patogênicos e como controle negativo soro normal de camundongo (SNC).

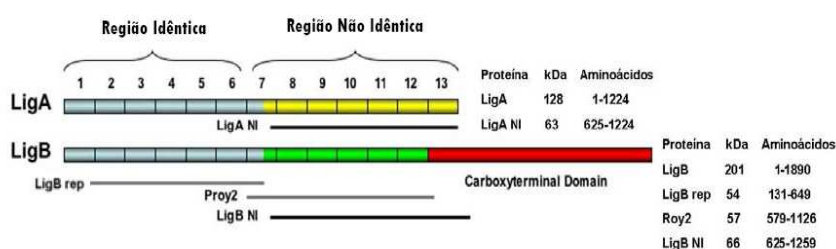


Figura 1 Esquema das regiões idênticas e não idênticas das proteínas LigA e LigB

Para o *immunoblotting* as proteínas presentes em uma suspensão de leptospiros contendo $5,3 \times 10^9$ células/mL foram submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) e depois transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Após o bloqueio da membrana com leite em pó desnatado (5%) os mAbs anti-LigB (ascite diluída 1:300) foram adicionados. Os anticorpos ligados às proteínas leptospirais foram detectados com anticorpo de cabra polivalente anti-camundongo conjugado com peroxidase. A reação foi revelada com cromógeno utilizando diaminobenzidina (DAB). Como controles positivos foram usados o mAb 1D9 (anti-LipL32) e soro policlonal de coelho (anti-LigBrep) e como controle negativo foi usado Soro normal de camundongo (SNC).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através do ensaio de imunofluorescência foi possível conferir a reatividade de todos os anticorpos com o epítipo do antígeno nativo exposto na superfície da *Leptospira sp.* patogênica (cepa Fiocruz L1-130) e, sob as mesmas condições, não houve reação dos anticorpos com a *Leptospira sp.* saprófita (cepa Patoc I). O ensaio realizado com o mAb R2 foi usado para ilustrar estes resultados (Figura 2).

Os anticorpos testados contra a *Leptospira* patogênica (cepa Fiocruz L1-130) no *immunoblotting* reconheceram duas bandas com peso molecular de 128-kDa (LigA) e 201-kDa (LigB) (Figura 3). As bandas demonstram a reatividade com a região idêntica compartilhada por LigA e LigB. Devido às condições desnaturantes em que as proteínas leptospirais foram submetidas durante a eletroforese, verificou-se a capacidade dos anticorpos reconhecerem um epítipo linear em LigA e LigB.

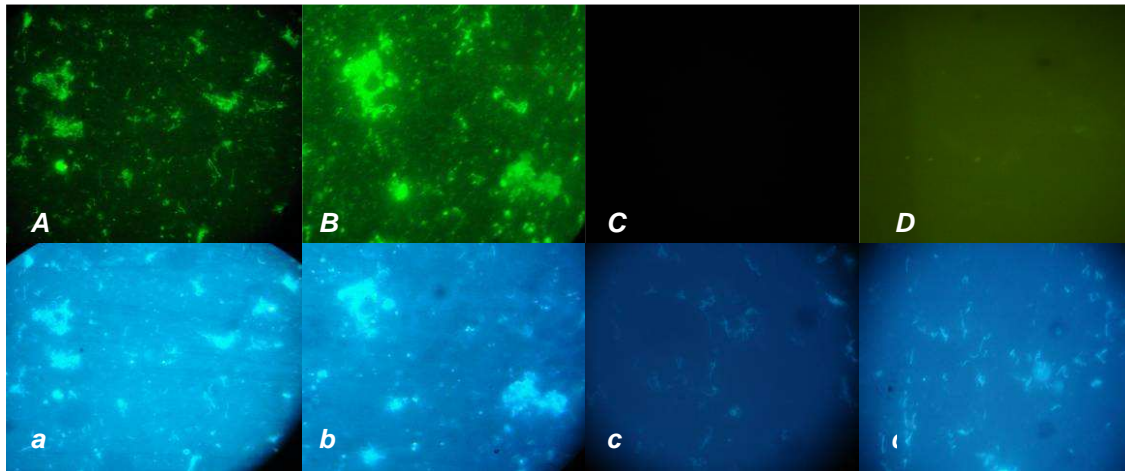


Figura 2. Reatividade dos anticorpos monoclonais com LigB nativa. Painel A: detecção do mAb R2 ligado à superfície da cepa Fiocruz L1-130. Painéis B e C: controles positivo e negativo, respectivamente. Painel D: mAb R2 contra a cepa Patoc I. DNA de *Leptospira* corado com Hoechst nos painéis a, b, c e d. Visualização realizada em microscópio de fluorescência com aumento de 1000X.

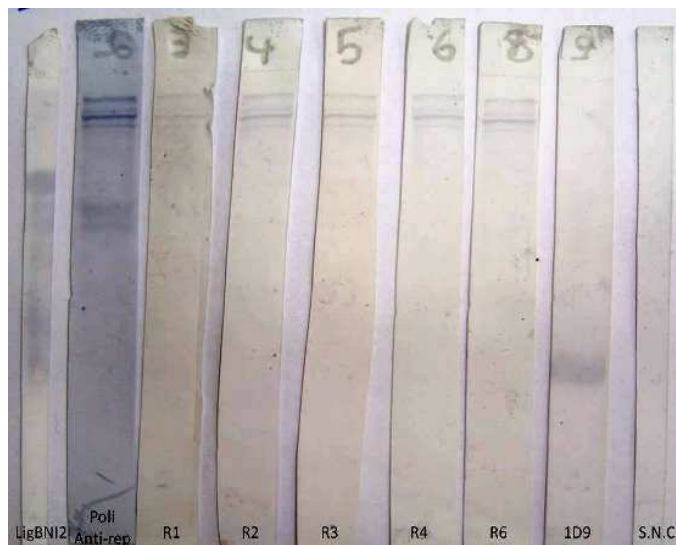


Figura 3. Immunoblotting com os mAbs R1, R2, R3, R4 e R6 com a *Leptospira interrogans* cepa Fiocruz L1-130. Controle positivo 1D9 e policlonal de coelho anti-LigBrep, e controle negativo SNC. O mAb LigBNI2 contra a proteína recombinante LigBNI de 66KDa foi usado como marcador de peso molecular.

4. CONCLUSÕES

Os mAbs R1, R2, R3, R4 e R6 foram capazes de reconhecer epítomos da região idêntica de LigA e LigB em suas formas nativas e somente na *Leptospira* patogênica. Estes resultados sugerem que os anticorpos possuem potencial para serem utilizados no desenvolvimento de ensaios de imunodiagnóstico que confirmem a fase inicial da leptospirose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATHANAZIO, D. A.; SILVA E. F.; SANTOS, C. S.; ROCHA, G. M.; VANNIER-SANTOS, M. A.; MCBRIDE, A. J. A.; KO A. I.; REIS, M. G. *Rattus norvegicus* as a Model for Persistent Renal Colonization by Pathogenic *Leptospira interrogans*, **Acta Tropica**, 2008, 105, p. 176-180.

CHOY, H. A.; KELLEY, M. M.; CHEN, T. L.; MOLLER, 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**, 2007, v. 75 n°5, p. 2441-2450.

MCBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G., KO, A. I. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, 2005, 18 p 376-386.

THONGBOONKERD, V. Proteomics in Leptospirosis Research: Towards Molecular Diagnostics and Vaccine Development. **Expert Reviews of Molecular Diagnostics**, 2008, 8(1), p 53-61.

LIN, Y.; CHANG, Y. The C-terminal Variable Domain of LigB from *Leptospira* Mediates Binding to Fibronectin, **The Journal of Veterinary Science**, 9(2), p. 133-144. 2008.