

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE ADESÃO DA PROTEÍNA LemA DE *Leptospira interrogans* ÀS COMPONENTES DA MATRIZ EXTRACELULAR

KARINE GAWLINSKI^{1,2}; THAÍS LARRÉ OLIVEIRA²; RODRIGO ANDRADE SCHUCH²; BÁRBARA COUTO ROLOFF³; DAIANE DRAWANZ HARTWIG^{1,2}

¹Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil – kah_g@hotmail.com; daianehartwig@gmail.com

²Laboratório de Vacinologia - Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil – thais.larreoliveira@gmail.com; schuch.biotec@gmail.com

³Laboratório de Imunodiagnóstico- Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil – barbararoloff@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose com ampla distribuição mundial, causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*. É considerada um problema de saúde pública emergente, possuindo maior incidência nas populações residentes em regiões tropicais com precárias condições de saneamento básico, havendo uma estimativa de 873 mil casos humanos por ano (ABELA-RIDDER et al., 2013). A doença pode ocorrer desde uma forma assintomática, passando por um quadro clínico similar a um quadro gripal até sua forma mais grave, apresentando falência de múltiplos órgãos (KO et al., 2009). A infecção ocorre em seres humanos através do contato direto ou indireto com a urina de animais reservatórios, os quais albergam a bactéria em seus túbulos renais (ADLER, 2015).

Após a entrada no organismo hospedeiro, as leptospiras disseminam-se na corrente sanguínea, migram pelos tecidos e colonizam órgãos-alvo, como rins, fígado e pulmões. Para tanto, sua habilidade de ligação às células hospedeiras e aos componentes da matriz extracelular é fundamental para invasão e estabelecimento da infecção (ITO; YANAGAWA, 1987; KO et al., 2009). A matriz extracelular (ECM) é uma mistura complexa de proteínas e outros componentes fibrosos, incluindo 28 tipos de colágeno, laminina, fibronectina, e proteoglicanos, que suporta a arquitetura dos tecidos, bem como contribui para a viabilidade, o desenvolvimento e diferenciação celular (BATZIOS et al., 2013).

Novos alvos e estratégias vacinais têm sido avaliados contra leptospirose, uma vez que as bacterinas atualmente disponíveis induzem imunidade de curta duração e sorovar específica (DELLAGOSTIN et al., 2011). A lipoproteína hipotética LemA (LIC11058) de *Leptospira interrogans* demonstrou ser um antígeno promissor para o desenvolvimento de vacinas contra leptospirose. LemA é conservada em diferentes sorovares patogênicos e é capaz de induzir imunidade protetora em hamsters quando apresentada sob a forma de vacina de DNA e prime-boost (HARTWIG et al., 2013). No entanto, sua função biológica e sua possível participação na patogênese da *Leptospira* ainda não foram elucidadas.

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade de ligação da lipoproteína LemA às diferentes componentes da matriz extracelular. Dessa forma, pretendemos caracterizar sua possível função de adesina em *Leptospira* spp.

2. METODOLOGIA

A cepa *Escherichia coli* TOP10F' foi transformada por choque térmico com o vetor pQE/lemA, cultivada em meio Luria-Bertani e a expressão da proteína foi induzida com 1mM de IPTG. A proteína rLemA foi purificada em condições desnaturantes através de cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sefarose e dialisada contra tampão contendo concentrações decrescentes de ureia. Posteriormente, a proteína foi quantificada pelo kit BCATM Protein Assay (Pierce), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Através de *Western blot* (WB), rLemA foi caracterizada com anticorpo monoclonal (MAb) anti-6xHis (Sigma) (1:6000).

A capacidade de adesão da proteína rLemA aos componentes da matriz extracelular foi avaliada através de ELISA. Os poços de placas de ELISA foram sensibilizados com 1 µg de laminina, colágeno tipo IV, fibrinogênio, fibronectina, BSA e fetuína, diluídos em 100 µl de PBS, durante 2 h. Os poços foram lavados três vezes com PBS acrescido de 0,05% de Tween 20 (PBST) e então bloqueados com leite em pó 10% durante 1 h, seguido de mais 3 lavagens com PBST. Posteriormente, 1 µg de rLemA diluída em 100 µl de PBS foi adicionada por poço, e a proteína foi incubada durante 1 h 30 min para aderir-se aos diferentes substratos. Após cinco lavagens com PBST, as proteínas ligadas foram detectadas através da adição de soro hiperimune anti-rLemA produzido em camundongo na diluição de 1:12000. A incubação prosseguiu durante 1 h, e depois de três lavagens com PBST, 100 µl de uma diluição de 1:6000 de imunoglobulina anti-camundongo conjugado com peroxidase foi adicionado por poço durante 1 h. Todas as incubações foram realizadas à 37 °C. Os poços foram lavados três vezes, e a reação foi revelada pela adição de dihidroclorato de o-phenilenediamina (OPD - Sigma-Aldrich) e peróxido de hidrogênio. Foram realizadas três repetições dos ensaios, sendo os testes realizados em triplicata nas placas. O teste *t* de Student foi utilizado para determinar diferenças estatísticas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proteína rLemA foi expressa na forma insolúvel por *E. coli* TOP10F' e apresentou o tamanho esperado, de 17 kDa. O protocolo de solubilização da proteína em ureia foi eficiente, porém o rendimento obtido considerado baixo, 4 mg.L⁻¹. A caracterização da proteína por WB resultou no reconhecimento de rLemA no tamanho esperado pelo anticorpo monoclonal anti-histidina. A proteína rLipL32 utilizada como controle positivo foi reconhecida, enquanto que o controle negativo (BSA) não foi reconhecido.

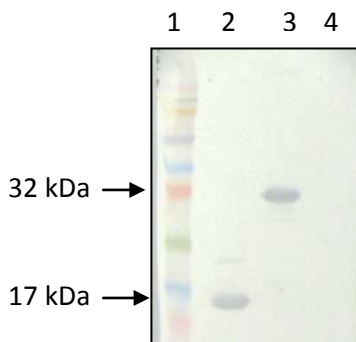


Figura 1. Caracterização de rLemA através de *Western blot* (WB) com anticorpo anti-histidina. (1) Marcador de massa molecular BenchMark™ Pre-stained (Invitrogen); (2) rLemA; (3) rLipL32, usada como controle positivo; (4) BSA usada como controle negativo.

Os resultados do ELISA mostraram que a ligação de rLemA à laminina, fibronectina, fibrinogênio e colágeno IV foi diferente estatisticamente da ligação à BSA e à fetuína, utilizados como controles negativos ($p \leq 0,01$). Os valores representam a absorbância média das triplicatas obtidas nos três ensaios realizados.

A ligação à fibronectina e ao fibrinogênio plasmáticos pode representar um importante papel na adesão das leptospiros ao endotélio dos vasos sanguíneos, possibilitando sua consequente disseminação pelos tecidos. Já a capacidade de adesão à laminina e ao colágeno tipo IV – importantes componentes das membranas basais do epitélio – pode fortalecer a habilidade da bactéria de invadir e cruzar camadas teciduais bem como de colonizar órgãos alvo (ADLER, 2015).

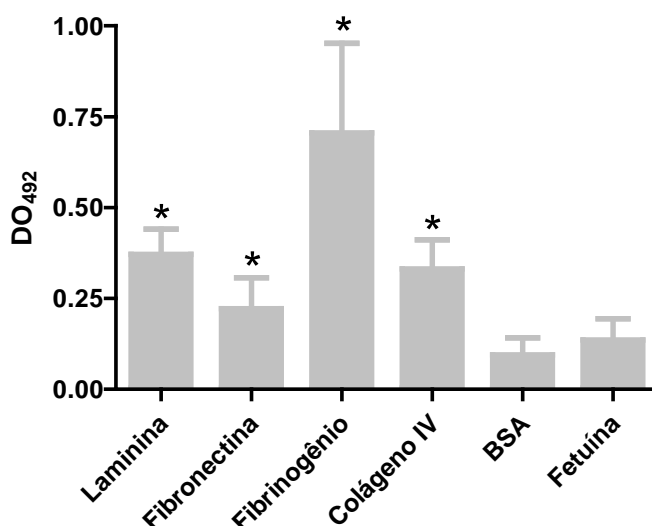


Figura 2. Ligação de rLemA aos componentes da matriz extracelular avaliada através de ELISA. Os valores representam a média \pm o desvio padrão dos três ensaios realizados. Diferenças estatísticas entre a ligação de rLemA aos componentes da EMC e aos dois controles negativos ($p \leq 0,01$) são mostradas com asterisco.

4. CONCLUSÕES

A proteína rLemA apresenta capacidade de ligação à laminina, fibronectina, fibrinogênio e colágeno IV, indicando um possível mecanismo de atuação desta proteína na patogênese de *Leptospira*. Estudos adicionais estão sendo realizados para avaliar a interação desta proteína com outros componentes da ECM, a localização celular da mesma em *Leptospira* spp., e também a capacidade de bloqueio da ligação de leptospiros vivos nestes compostos por anticorpo anti-rLemA.

5. REFERÊNCIAS

ABELA-RIDDER, B.; BERTHERAT, E.; DURSKI, K. Global burden of Human Leptospirosis and cross-sectoral interventions for its prevention and control. In: **PRINCE MAHIDOL AWARD CONFERENCE**, Bangkok, 2013.

KO, A.I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.10, p.736-747, 2009.

ADLER, B. ***Leptospira and leptospirosis***. Australia: Springer, 2015.

ITO, T.; YANAGAWA, R. Leptospiral attachment to extracellular matrix of mouse fibroblast (L929) cells. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 15, p.89–96, 1987.

BATZIOS, S.P.; ZAFEIRIOU, D.I.; PAPAKONSTANTINO, E. Extracellular matrix components: an intricate network of possible biomarkers for lysosomal storage disorders. **FEBS Letters**, v. 587, p.1258–1267, 2013.

DELLAGOSTIN, O.A.; GRASSMANN, A.A.; HARTWIG, D.D.; FELIX, S.R.; DA SILVA, E.F.; McBRIDE, A.J.A. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Human Vaccines**, v. 7, p.1215–1224, 2011.

HARTWIG, D.D.; FORSTER, K.M.; OLIVEIRA, T.L.; AMARAL, M.; McBRIDE, A.J.A.; DELLAGOSTIN, O.A. A prime-boost strategy using the novel vaccine candidate, LemA, protects 439 hamsters against leptospirosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, p.747-752, 2013.