

DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO CELULAR DE PROTEÍNAS DE LEPTOSPIRAS

GABRIANA NATHÁLIA ROSA TIMM¹; JÉSSICA DIAS SOUZA²; VITOR DA SILVEIRA ALBA³; MATHEUS ACEVEDO MONTANO⁴; ANDRÉ ALEX GRASSMANN⁵ ALAN JOHN ALEXANDER MCBRIDE⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – gabi.timm@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – gsk.souza@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – vitor.s.alba@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – matheusmontano64@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – grassmann.aa@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – alanmcb@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial e um problema de saúde pública, com impacto também na produção animal. É causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, que têm como principais reservatórios roedores que as carregam nos rins, sem desenvolver a doença, liberando-as no ambiente por meio da urina. A infecção é estabelecida principalmente pela entrada de leptospiros através de pequenos cortes ou abrasões na pele do hospedeiro e a subsequente disseminação no organismo (ADLER, 2015). Devido aos impactos na produção animal e saúde pública, uma medida profilática eficiente é necessária, já que no Brasil não existe vacina para uso humano e a vacina (bacterina) usada em animais apresenta uma série de problemas, como a proteção a curto prazo, reações adversas e a especificidade para um sorovar, não havendo proteção cruzada entre os mais de 260 sorovares de *Leptospira* conhecidos (ADLER; MOCTEZUMA, 2010). É urgente a necessidade de identificação de novos alvos vacinais contra leptospirose para desenvolvimento de uma vacina de amplo espectro para combater a doença (CULLEN et al., 2005).

As proteínas presentes na membrana externa de *Leptospira* spp. patogênicas e expostas na superfície são os antígenos mais promissores para desenvolvimento de uma vacina, pois permite que uma resposta imune gerada contra as mesmas reconheça e ataque a bactéria (CULLEN et al., 2005). As membranas de espiroquetas são facilmente rompidas *in vitro* durante manipulações experimentais, e os antígenos de sub-superfície podem ser erroneamente identificados como componentes da superfície da espiroqueta quando as precauções para garantir a integridade da membrana externa não são tomadas (BARBOUR; HAYES, 1986; COX et al., 1995; RADOLF, 1995), resultando em um falso potencial como alvo vacinal. O objetivo deste trabalho, foi adaptar a técnica de aprisionamento de espiroquetas em microesferas agarose de baixo ponto de fusão, descrita por COX et al. (1995) para demonstrar a localização de proteínas de leptospiros.

2. METODOLOGIA

Expressão, purificação e caracterização das proteínas heterólogas recombinantes: As proteínas FlaA1, FlaB1 e LigB foram expressas em *E. coli*. Vetores pAE recombinantes contendo as sequências codificadoras destas proteínas foram produzidos anteriormente. *E. coli* BL21(DE3) Star contendo cada um destes

vetores foi crescida em LB, até atingir fase exponencial de crescimento, quando a expressão foi induzida pela adição de IPTG seguido de incubação por 3 h. As proteínas foram purificadas em condições desnaturantes através de cromatografia de afinidade ao níquel e avaliadas em SDS-PAGE. Depois, foram dialisadas contra PBS. A quantificação das proteínas foi realizada através do método do ácido bicinconínico (BCA).

Produção e caracterização de soros policlonais: Ratos Wistar fêmeas (*Rattus norvegicus*), de 4-6 semanas foram utilizados para produção de soro policlonal contra cada uma das proteínas recombinantes purificadas e contra o extrato bruto de leptospiros, que foi previamente preparado através de inativação por calor. Para obtenção de soro, foram realizadas três imunizações, pela via intraperitoneal, contendo 50 µg de cada proteína recombinante, ou o extrato bruto, emulsificadas com o mesmo volume de adjuvante de Freund no intervalo de 2-3 semanas entre cada dose. Duas semanas após a última dose, os animais foram anestesiados e em seguida foi realizada a eutanásia por exsanguinação cardíaca (CEE/UFPEL, nº 4336-2015). Os soros foram separados por centrifugação e avaliados por *Western Blot*, utilizando 3-200 ng/linha de proteína recombinante. Da mesma forma, foi avaliada a capacidade de reconhecimento da proteína nativa de *L. interrogans* em *WB* com um extrato da cepa L1-130 e por teste de imunofluorescência (IF) com leptospiros fixadas por metanol.

Produção das microesferas de agarose de baixa temperatura de fusão (ABTF): Solução de agarose a 2% em PBS foi aquecida e transferida para banho-maria a 42°C. Em seguida, foi combinado 500 µl do cultivo de leptospiros com 500 µl da agarose a 42°C. Após vórtex por 15-20 s e nova incubação a 42°C, foi adicionado 5 ml de óleo mineral, seguido por vórtex de 10-15 s. Imediatamente depois, os tubos foram colocados no gelo, seguido de aquecimento a 35°C. Após vórtex e centrifugação a 500 xg por 15 min, o óleo foi cuidadosamente removido, ressuspensando as esferas de agarose em PBS. Alíquotas de 1 ml destas esferas foram incubadas com o anticorpo primário durante 1 h (diluições de 1:25, 1:200, 1:1000 e 1:1000). Foram testados os pAbs obtidos, bem como monoclonais (mAb) contra LipL32 e LigB produzidos anteriormente (fornecidos por colaboradores). Após 4 lavagens com PBS-T, o anticorpo secundário anti-IgG de rato conjugado à FITC (1:1000) foi adicionado e incubado por 1 hora à temperatura ambiente, seguido de lavagem com PBS-T. Uma terceira incubação com Hoechst foi realizada, seguido de lavagem. Quando necessário, foi realizado um pré-tratamento com EDTA (10 mM, 50 mM e 100 mM) e Triton X-114 (10%, 5%, 1%, 0.1%, 0.001%, 0.0001% e 0.00001%) por 30 minutos para lise da membrana externa. Ao final da reação de ligação de anticorpos, as esferas de agarose contendo leptospiros foram transferidas para uma lâmina de microscópio que foram analisadas e fotografadas por microscopia de fluorescência.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os anticorpos policlonais (pAbs) obtidos contra as proteínas recombinantes FlaA1, FlaB1 e LigB foram avaliados por *WB*, e foram capazes de reconhecer até 3 ng de proteína. Estes também reconheceram a proteína nativa na IF com células fixadas por metanol (Figura 1.1A). As leptospiros foram eficientemente aprisionadas em agarose e os soros anti-extrato bruto de leptospiros (1:1000), anti-LipL32 (mAb3 e 1D9 1:200) e anti-LigB mAb (1:25) foram capazes de reconhecer a proteína nativa na bactéria intacta (Figura 1.1B), sugerindo que LigB e LipL32 estão presentes na

superfície da bactéria. Não houve reação nos tratamentos realizados com Triton X-114 e somente na concentração de 50 mM de EDTA foi observado ligação do anti-LigB policlonal (1:25) na célula lisada (Figura 1.1C). Os soros anti-FlaA e anti-FlaB não reagiram nem mesmo na diluição de 1:25, seja na célula lisada a célula, ou na célula íntegra. Isto pode ser reflexo da presença de uma proteína recentemente descrita, FcpA, que recobre toda a extensão do flagelo, bloqueando a ligação dos anticorpos a FlaB1 e FlaA1.

O uso de leptospiros encapsuladas em esferas de agarose preserva a integridade da sua frágil membrana externa durante as manipulações *in vitro*, e também permite que os anticorpos detectem as proteínas nativas expostas na sua superfície como observado por COX et al., (1995). Após essas análises, será possível confirmar a localização de proteínas preditas como OMPs, sendo estas usadas como antígenos vacinais contra leptospirose.

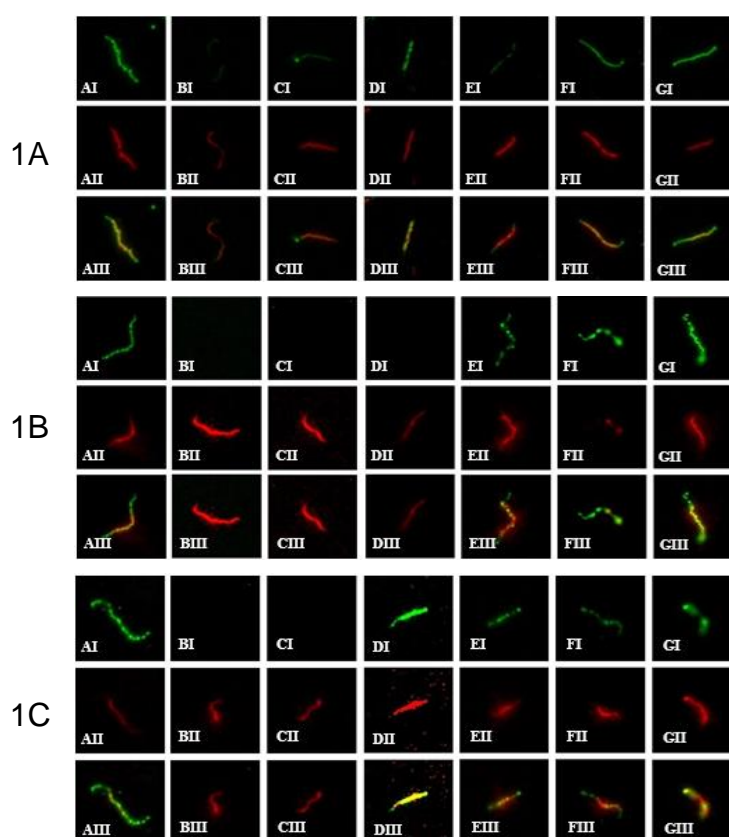


Figura 1. 1A: Leptospiros fixadas com metanol; 1B: Leptospiros íntegras em microesferas; 1C: Leptospiros lisadas por 50 mM de EDTA em microesferas. A) Anticorpo anti-extrato bruto de *Leptospira*, B) anti-rFlaA1, C) anti-rFlaB1, D) anti-rLigB pAb, E) anti-rLigB mAb, F) anti-rLipL32 mAb e G) anti-rLipL32 1D9 mAb. I. marcação com FITC, II. Marcação de DNA com Hoechst e III. Sobreposição dos filtros.

4. CONCLUSÕES

Foi confirmada a localização LigB e LipL32 na superfície da bactéria.

A técnica descrita é promissora e está em processo de otimização para determinação da localização de novas proteínas preditas como expostas na superfície de *L. interrogans*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, B. ***Leptospira* and Leptospirosis**. Current Topics in Microbiology and Immunology, Estados Unidos da América: Springer. v. 387, 2015.

ADLER, B.; MOCTEZUMA A de la P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, Austrália. v.140, p.287–296, 2010.

BARBOUR, A. G.; HAYES, S. F. Biology of *Borrelia* species. **Microbiological Reviews**, Estados Unidos da América. v.50, n.4, p.381–400, 1986.

COX, D. L.; AKINS, D. R.; PORCELLA, S. F.; NORGARD, M. V.; RADOLF, J. D. *Treponema pallidum* in gel microdroplets: a novel strategy for investigation of treponemal molecular architecture. **Molecular Microbiology**. Estados Unidos da América. v.15, p.1151–1164, 1995.

CULLEN, P. A.; XU, X.; MATSUNADA, J.; SANCHEZ, Y; KO, A. I.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Surfaceome of *Leptospira* spp. **Infection And Immunity**, Austrália. v.73, n.8, p.4853–4863, 2005.

RADOLF, J. D. *Treponema pallidum* and the quest for outer membrane proteins. **Molecular Microbiology**, Estados Unidos da América. v.16, p.1067–1073, 1995.