

DETERMINAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DE *LEPTOSPIRA INTERROGANS* POR IMUNOFLOURESCÊNCIA

GABRIANA NATHÁLIA ROSA TIMM¹; JÉSSICA DIAS SOUZA²; ANDRÉ ALEX GRASSMANN³; ALAN JOHN ALEXANDER MCBRIDE⁴

¹ LPDI, Núcleo de Biotecnologia, CDTec, UFPel – gabi.timm@hotmail.com

² LPDI, Núcleo de Biotecnologia, CDTec, UFPel – gsk.souza@gmail.com

³ LPDI, Núcleo de Biotecnologia, CDTec, UFPel – grassmann.aa@gmail.com

⁴ LPDI, Núcleo de Biotecnologia, CDTec, UFPel – alan.mcbride@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é a principal causa zoonótica de mortalidade e morbidade em todo o mundo (COSTA et al., 2015). 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 pela entrada de leptospiros através de pequenos cortes ou abrasões na pele do hospedeiro e sua disseminação no organismo (ADLER, 2015).

Devido aos impactos na saúde pública e produção animal, uma medida profilática eficiente é necessária, já que no Brasil não existe vacina para uso humano e a vacina animal (bacterina) apresenta uma série de problemas, como a proteção a curto prazo, reações adversas e a falta de proteção cruzada entre os mais de 260 sorovares patogênicos conhecidos (ADLER, 2015). É urgente identificar novos alvos para o desenvolvimento de uma vacina de amplo espectro (CULLEN et al., 2005). As proteínas presentes na membrana externa (ME) de *Leptospira* spp. patogênicas e expostas na superfície são os mais promissores, pois permitem que uma resposta imune gerada contra as mesmas reconheça e ataque a bactéria. Porém, as membranas são facilmente rompidas *in vitro* durante manipulações, e os antígenos de sub-superfície podem ser erroneamente identificados como componentes da superfície (COX et al., 1995; RADOLF, 1995). O objetivo deste trabalho foi adaptar a técnica de aprisionamento de espiroquetas em microesferas agarose de baixo ponto de fusão, descrita por Cox e colegas (1995), para demonstrar a localização de proteínas de leptospiros.

2. METODOLOGIA

2.1. Produção das proteínas recombinantes: Por meio de bioinformática e vacinologia reversa, foram selecionadas 9 proteínas para análise de localização celular (Tabela 1). Para isso, as sequências codificadoras foram amplificadas por PCR, clonadas no vetor pAE e expressas em *Escherichia coli*. As proteínas foram purificadas, dialisadas e analisadas por SDS-PAGE. Além destas, outras proteínas de interesse foram produzidas da mesma forma: rFlaA1, rFlaB1, rFcpA, rLigBrep, rLcpA e rLenA. As primeiras três são proteínas flagelares, enquanto as últimas são lipoproteínas descritas como expostas na superfície de *L. interrogans*.

2.2. Produção e caracterização de soros policlonais: Para obtenção dos anticorpos policlonais (pAb), dois ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) para cada proteína e extrato bruto de leptospiros foram inoculados com 50 µg de proteína recombinante, diluída em PBS e emulsificada com volume equivalente de adjuvante de Freund, pela via intraperitoneal. Foram realizadas três imunizações, no intervalo de 2-3 semanas

entre cada dose (CEEA/UFPEL, nº 4336-2015). Duas semanas após a última dose, o sangue dos animais foi coletado (por punção cardíaca após overdose de anestésico) e o soro foi separado por centrifugação. Foi avaliada a capacidade de reconhecimento da proteína nativa de *L. interrogans* em *Western blot* (WB) e por testes de imunofluorescência (IF).

2.3 IF de superfície: As bactérias foram incubadas com metanol (lise e fixação) ou com paraformaldeído 2% (membrana intacta). O bloqueio foi feito com BSA 1% a 28 °C por 90 min. O DNA foi marcado com DAPI (Fluoroshield, Sigma-Aldrich). Os controles utilizados incluíram o extrato bruto de leptospiros (controle positivo para superfície), as flagelinas FlaA1, FlaB1 e FcpA (controle de sub-superfície) e o soro negativo, de animal que não foi inoculado. Também foram avaliados anticorpos monoclonais (mAbs) anti-LipL32 e anti-LigB. A diluição dos pAbs e mAbs variaram de 1:25 a 1:300, enquanto que a do secundário conjugado a FITC foi de 1:1000 e foram incubados por 1 h e 45 min, respectivamente. A análise das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência e todas as imagens foram obtidas utilizando a mesma exposição para cada filtro, as quais foram montadas utilizando o software ImageJ.

2.4. IF em microesferas de agarose (adaptada de Cox et al. (1995)): 1×10^8 leptospiros (0,5 ml EMJH) foram aquecidas a 42 °C, 45-60 s, e foi adicionado 0,5 ml da agarose 2%. Após vórtex leve, o tubo foi incubado a 42 °C (30 s) e 5 ml de óleo mineral foi adicionado, vórtex (10-15 s), e a agarose foi solidificada no gelo por 5 min. Foi adicionado 5 ml de PBS e as esferas coletadas a 500xg, 15 min. As esferas (50 µl) foram processadas em PBS (ME íntegra); Triton X-100 e Triton X-114 (0,00001-25%); EDTA (10-100 mM); etanol (0,5-80%); metanol ou EDTA/etanol (100 mM/50%, respectivamente) para romper a ME, incubada por 10 a 30 minutos a 23° C. Os pAbs ou mAbs, puros ou em diluições de até 1:1000, foram incubados em agitação junto as esferas a 4 °C, 16 h. Na etapa seguinte foi adicionado o anti-Ig de rato (ou de camundongo) conjugado a FITC (1:1000), 1 h a 23° C. O DNA da bactéria foi marcado com Hoechst ou DAPI. Os controles incluíram o extrato bruto de leptospiros (controle positivo) e o soro negativo. A observação das leptospiros foi realizada por microscopia de fluorescência. Todos os ensaios foram realizados comparando os mesmos soros entre si em diferentes tratamentos (células integras e permeabilizadas).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os pAbs obtidos foram avaliados por WB. As quantidades detectadas variaram de 1,5 ng para os soros anti-rLIC11086, anti-rFlaA1 e anti-rFcpA até 200 ng para o soro anti-rLIC11458. Todos os pAbs foram avaliados quanto à capacidade de reconhecimento da bactéria fixada por metanol em lâminas de microscopia. Com exceção dos pAbs anti-rLIC11086 e anti-rLIC12374, todos os demais reconheceram as bactérias fixadas por metanol, onde a membrana encontra-se permeabilizada e as proteínas desnaturadas. As diluições encontradas para cada anticorpo variaram entre de 1:1000 a 1:25.

O controle positivo reconheceu a bactéria tanto permeabilizada quanto fixada por paraformaldeído. Todos os soros positivos reconheceram as bactérias permeabilizadas. As bactérias fixadas por paraformaldeído (intactas) foram reconhecidas pelos pAbs anti-rLigBrep e anti-rFcpA, enquanto os demais soros não reconheceram a bactéria neste estado. Alguns pAbs não reconheceram a *L. interrogans* em nenhuma situação. O controle para proteínas abaixo da superfície da célula, o anti-rFlaB1 não reconheceu a proteína nativa quando a bactéria estava íntegra, mas apresentou ligação ao flagelo quando a bactéria foi permeabilizada.

Nenhum anticorpo gerado contra proteínas localizadas abaixo da superfície da bactéria apresentou ligação quando a mesma era mantida intacta (incubação com PBS). Porém, surpreendentemente, a incubação com estes anticorpos não apresentava fluorescência quando incubados com leptospiros, mesmo depois que estas sofreram tratamentos para a remoção e permeabilização da ME com detergentes, álcool ou EDTA. A única exceção observada foi o tratamento com 50 mM de EDTA por 30 minutos, que parece ter permeabilizado a célula, permitindo a ligação dos anticorpos anti-rFcpA (Figura 1). Da mesma forma, o tratamento com EDTA 50 mM permitiu a ligação dos anticorpos anti-LcpA, anti-LipL32 e anti-LigB (mAbs). Estes também reconheceram a superfície da bactéria intacta, sugerindo que as proteínas LcpA, LipL32 e LigB estão localizadas na superfície da bactéria. O soro negativo não teve ligação à célula inteira ou permeabilizada.

Todavia, assim como na descrição original da técnica, o pAb gerado contra FcpA reconheceu a bactéria teoricamente intacta. Por esse motivo, Pinne e colaboradores (2009) sugeriram que esta é uma proteína de ME, nomeando-a OmpL36. Porém, foi demonstrado que ela é um componente da bainha do flagelo periplasmático em um completo e elegante experimento, que a renomeou como FcpA. Uma possível explicação para qual os pAbs gerados contra as b β -OMPs não reconhecerem a proteína na superfície da bactéria é a pouca exposição da molécula fora da célula.

Dentre as alternativas para demonstração *in vitro* da localização de proteínas em *Leptospira*, o encapsulamento da bactéria em esferas de ABPF se destaca pela simplicidade, facilidade de obtenção e pouca manipulação das células, sem necessidade de centrifugação, por exemplo.

Tabela 1. Resumo das análises aplicadas as proteínas selecionadas e aos anticorpos policlonais correspondentes.

Alvo do PAb	Proteínas (kDa)			Detecção da proteína em WB			Imunofluorescência				
	Proteína recombinante ¹	Proteína nativa, predito ²	Proteína nativa, observado ³	DMC	IVC	LD (ng) ⁴	Fixada por metanol	IF de superfície		IF em esferas de agarose	
								Intacta	Lisada	Intacta	Lisada
LIC10496	55,9	57,6	~120*	P	P	12,5	P	S	S	NA	NA
LIC10881	61,9	63,2	~65	P	P	12,5	P	P	P	NA	NA
LIC10964	55,0	86,6	~85	P	P	100	P	S	P	NA	NA
LIC11086	36,7	37,4	~60?	IC	IC	1,5	S	S	S	NA	NA
LIC11268	35,2	68,8	~70	IC	P	12,5	P	S	P	NA	NA
LIC11458	65,4	113,6	~115	IC	P	200	P	S	P	NA	NA
LIC12374	34,8	80,2	x	IC	IC	25	S	S	P	NA	NA
LIC20019	39,5	43,4	x	IC	IC	12,5	P	S	P	NA	NA
LIC20151	63,8	80,9	~80	P	P	12,5	P	S	S	NA	NA
LigB/LigA	54,0	200,8/128,1	~200 e ~130	P	P	3,12	P	S	P	P	P
LcpA (LIC11947)	20,0	22,6	~22	P	P	3,12	P	S	P	P	P
LenA (LIC10009)	24,0	27,7	~34	P	P	6,25	P	S	P	S	S
FlaA1	33,0	34,9	~35	P	P	1,5	P	S	S	NA	NA
FlaB1	32,0	31,3	~30	P	P	25	P	S	P	S	S
FcpA (LIC13166)	35,7	36,2	~35	P	P	1,5	P	P	P	S	P
LipL32	28,5	29,6	~30	P	P	NA	P	NA	NA	P	P

¹Predito pelo Vector NTI 11. ²Predito pelo Uniprot. ³Conforme observado na figura 9. ⁴Quantidade mínima de proteína recombinante detectada por WB utilizando pAb específico. IC = inconclusivo. LD = Limite de Detecção. NA = não avaliado. P = detecção positiva. S = sem detecção. DMC = câmara de membrana de diálise. IVC = cultura *in vitro*. IF = imunofluorescência.

4. CONCLUSÕES

Por fim, a técnica de encapsulamento das leptospiros em esferas de agarose é promissora e pode fornecer informações importantes sobre a localização de proteínas de ME, fator essencial na busca por antígenos vacinais contra a leptospirose.

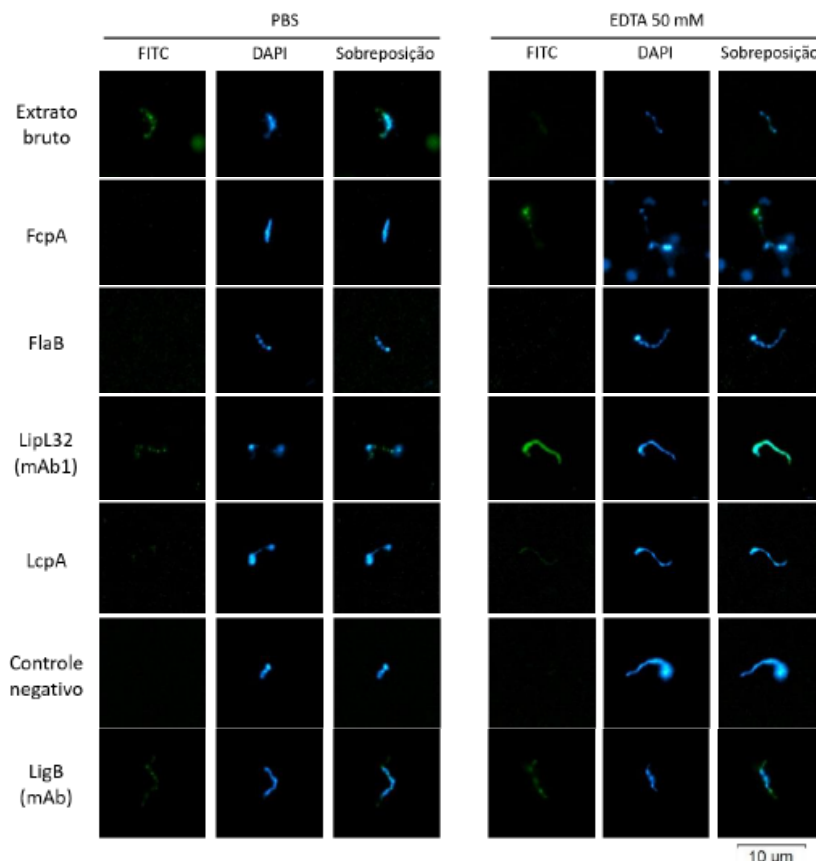


Figura 1. Imunofluorescência em esferas de ABPF. O anticorpo anti-IgG de rato era conjugado com FITC (verde), enquanto o DNA foi marcado com DAPI (azul).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, B. *Leptospira and Leptospirosis*. Cur Top Microbiol Immunol, Springer. v. 387, 2015.

COSTA, F.; HAGAN, J. E.; CALCAGNO, J.; KANE, M.; TORGERSO, P.; MARTINEZ-SILVEIRA, M. S.; STEIN, C.; ABELA-RIDDER, B.; KO, A. I. Global morbidity and mortality of leptospirosis: A systematic review. **PLoS Neg Trop Dis**. v.9, n.9. 2015.

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. **Mol Microbiol**. 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. **Infect Immun**, v.73, n.8, p.4853–4863, 2005.

RADOLF, J. D. *Treponema pallidum* and the quest for outer membrane proteins. **Mol Microbiol**, v.16, p.1067–1073, 1995.

PINNE, M.; HAAKE, D. A. A comprehensive approach to identification of surface-exposed, outer membrane-spanning proteins of *Leptospira interrogans*. **PLoS One**, 4, e6071. 2009.