

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola



Dissertação

**Produção e Caracterização de Anticorpos
Monoclonais contra LipL32, uma Proteína de
Membrana Externa de Leptospiras Patogênicas**

Mariana Loner Coutinho

Pelotas, 2005

MARIANA LONER COUTINHO

**Produção e Caracterização de Anticorpos
Monoclonais contra LipL32, uma Proteína de
Membrana Externa de Leptospiras Patogênicas**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Agrícola da
Universidade Federal de Pelotas,
como requisito parcial à obtenção
do título de Mestre em Ciências
(área do conhecimento: Imunologia
Aplicada).

Orientador: José Antonio Guimarães Aleixo

Pelotas, 2005

Dados de catalogação na fonte:

Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

C871p Coutinho, Mariana Loner

Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra LipL32, uma proteína de membrana externa de leptospiros patogênicas/ Mariana Loner Coutinho ; orientador José Antonio Guimarães Aleixo. – Pelotas, 2005. – 34f. : il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2005.

1.Biotecnologia. 2.Leptospirose . 3. Anticorpos

À minha família: José Bernardo, Beatriz,
Lúcia, Eleonora e Vilma por toda a minha vida.

Ao Daniel, especialmente pelo amor, apoio e carinho.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de aprendizado que me proporcionou.

Ao meu orientador Professor José Antonio Guimarães Aleixo pelo incentivo, paciência, amizade, ensinamentos profissionais e pessoais e principalmente por sempre ter confiado na minha capacidade.

Às minhas colegas de laboratório Ângela, Flávia e Núbia por compartilharem comigo a alegria de bons resultados.

Aos estagiários do Laboratório de Imunologia Aplicada, Paula, Gabriela, Leonardo e Clarice, pela valiosa ajuda nas tarefas do dia-a-dia.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular, em especial à Fabiana e Fabrício, pelas discussões.

Aos demais colegas do Centro de Biotecnologia pelo convívio agradável.

À minha família por ter fornecido todo o suporte físico e emocional para chegar onde cheguei e por realmente se esforçarem para entender todos os experimentos e desabafos realizados dia após dia.

Ao Daniel pelo seu amor, carinho, paciência, conselhos e interesse em todos os aspectos da minha vida e por ter a visão mais errada e mais certa de quem sou eu realmente.

Aos meus amigos fora do laboratório que sempre me proporcionaram momentos de descontração quer seja em jantares, conversas em bares, ao telefone, ou troca de e-mails, e por me fazerem perceber a realidade do mundo.

Muito obrigada!

Resumo

COUTINHO, Mariana Loner. **Produção e Caracterização de Anticorpos Monoclonais contra Proteína de Membrana Externa de Leptospiras Patogênicas.** 2005. 34f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

A leptospirose é causada por espiroquetas do gênero *Leptospira* e apresenta sinais clínicos comuns a várias doenças febris como influenza, malária e dengue, sendo uma enfermidade de difícil diagnóstico. A confirmação da doença é baseada em testes sorológicos que demonstram o aumento do título de anticorpos séricos em amostras pareadas ou no isolamento da bactéria a partir de fluídos corpóreos. Estes testes são realizados em laboratórios de referência, entretanto possuem baixa sensibilidade especialmente na fase inicial da doença. A LipL32 é a principal lipoproteína reconhecida pelo soro de pacientes infectados e somente está presente na membrana de leptospiras patogênicas. Nove anticorpos monoclonais anti-LipL32 foram produzidos e o seu potencial avaliado em relação a características de interesse para testes de diagnóstico. Foram realizados testes de isotipagem, mensuração da constante de afinidade, do índice de aditividade (IA) e testes de especificidade com diferentes sorovares de leptospiras. Os MABs produzidos são na sua maioria do isotipo IgG_{2b} (7 MABs), e os dois restantes são dos isotipos IgG_{2a} e IgG₃. O mapeamento de epítomos foi determinado por ELISA de competição. A constante de afinidade (K_a) dos MABs, medida através de ELISA e calculada através de regressão linear, situou-se entre 6×10^6 e $5 \times 10^7 \text{L.mol}^{-1}$ e o IA foi menor do que 30% para todos os pares de MABs. Nos testes para verificar a especificidade de cada um dos MABs, em ELISA indireto e em Western blot, foram utilizados diferentes sorovares de leptospiras patogênicas e saprófitas. Os anticorpos demonstraram reação específica com LipL32 em todos os sorovares patogênicos testados e não apresentaram reação com sorovares saprófitas. Estes resultados sugerem que os

anticorpos são adequados para uso em testes imunológicos, desde que não simultaneamente, para o diagnóstico precoce de leptospirose.

Palavras-Chave: Leptospirose. Imunodiagnóstico. Anticorpos Monoclonais.

Abstract

COUTINHO, Mariana Loner. **Produção e Caracterização de Anticorpos Monoclonais contra Proteína de Membrana Externa de Leptospiras Patogênicas.** 2005. 34f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

Leptospirosis is a disease of difficult diagnosis, since its symptoms are easily mistaken with feverish diseases like influenza, malaria and dengue. The confirmation of the disease is based on laboratory testing of paired sera to demonstrate serum conversion or isolation of the agent. However the tests available have low sensitivity, especially in the acute phase of the disease. LipL32 is the major lipoprotein recognized by the serum of infected patients and it is only present in the membrane of pathogenic leptospira. Nine monoclonal antibodies (MAbs) anti-LipL32 were produced and had their potential evaluated for use as a reagent in diagnostic tests. Isotype testing, measurement of the affinity and dissociation constants, additivity index (AI) and specificity determination by indirect ELISA and Western blot were performed. The isotypes were determined by ELISA. AI was carried out by competitive ELISA. Seven MAbs were found to be of the IgG_{2B} isotype, 1 was IgG_{2A} and 1 was IgG₃. The MAbs reacted specifically with LipL32 in all pathogenic serovars tested and no reaction was detected with non-pathogenic serovars or related bacteria. The affinity constants of MAbs, measured through ELISA and evidenced through linear regression, were between 6×10^6 and $5 \times 10^7 \text{L.mol}^{-1}$ and the AI resulted in all cases lower than 30%. These results suggest that the MAbs are well suited for use in immunological tests for diagnosis of leptospirosis as long as they are not used simultaneously.

Keywords: Leptospirosis. Immunodiagnosics. Monoclonal Antibodies.

Lista de Figuras

- Figura 1: Distribuição de leptospiros, produção de anticorpos e testes laboratoriais aplicáveis nas diferentes fases da doença (Reproduzido de LEVETT, 2001). ... 12
- Figura 2: Curvas obtidas a partir de ELISA para determinação das constantes de afinidade e dissociação dos anticorpos monoclonais anti-rLipL32..... 28
- Figura 3: Western blot representativo demonstrando reação de diferentes sorovares de leptospira com o MAb LipL5. 1 – rLipL32; 2 – Australis; 3 – Autumnalis; 4 – Ballum; 5 -Brasiliensis; 6 – Canicola; 7 – Celledoni; 8 – Gripphotyphosa; 9 – Copenhageni; 10 – Icterohaemorrhagiae; 11 – Panama; 12 – Pomona; 13 – Patoc..... 30

Lista de Tabelas

Tabela 1: Resultados da isotipagem dos anticorpos monoclonais**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 2: Resultados da determinação do índice de aditividade dos MAbs (%)**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 3: Constantes de afinidade e dissociação dos anticorpos monoclonais**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 4: Resultado das reações dos anticorpos monoclonais com diferentes sorovares de leptospiras..... **Erro! Indicador não definido.**

Sumário

<u>RESUMO</u>	6
<u>ABSTRACT</u>	8
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	9
<u>LISTA DE TABELAS</u>	10
<u>1. INTRODUÇÃO</u>	9
1.1. <u>LEPTOSPIROSE</u>	9
1.2. <u>LEPTOSPIRA</u>	10
1.3. <u>DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSE</u>	11
1.4. <u>PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA</u>	15
1.5. <u>ANTICORPOS MONOCLONAIS</u>	16
<u>2. OBJETIVOS</u>	18
2.5. <u>GERAL</u>	18
2.6. <u>ESPECÍFICOS</u>	18
<u>3. MATERIAL E MÉTODOS</u>	19
3.1. <u>PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE LIPL32 RECOMBINANTE</u>	19
3.2. <u>CULTIVO DE LEPTOSPIRAS</u>	19
3.3. <u>PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS</u>	20
3.3.1. <u>Fusão Celular</u>	20
3.3.2. <u>Seleção de Cavidades Positivas</u>	21
3.3.3. <u>Cultivo e Estocagem dos Hibridomas</u>	21
3.3.4. <u>Produção de Ascite em Camundongos BALB/c</u>	21
3.3.5. <u>Purificação dos MAbs</u>	21
3.3.6. <u>Isotipagem dos MAbs</u>	22
3.4. <u>ÍNDICE DE ADITIVIDADE (IA)</u>	22
3.5. <u>CONSTANTE DE AFINIDADE (KA) E CONSTANTE DE DISSOCIAÇÃO (KD)</u>	23
3.6. <u>ELISA COM LIPL32 NATIVA</u>	24
3.7. <u>WESTERN BLOTTING</u>	25
<u>4. RESULTADOS</u>	26
4.1. <u>PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS</u>	26
4.2. <u>ISOTIPAGEM DOS MABS</u>	26
4.3. <u>ÍNDICE DE ADITIVIDADE</u>	27
4.4. <u>CONSTANTE DE AFINIDADE E DE DISSOCIAÇÃO</u>	27
4.5. <u>ELISA COM LIPL32 NATIVA</u>	28
4.6. <u>WESTERN BLOT</u>	30
<u>5. DISCUSSÃO</u>	31
<u>6. CONCLUSÕES</u>	34
<u>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	35

1. Introdução

1.1. *Leptospirose*

A leptospirose é uma importante zoonose que ocorre de forma endêmica em todo o mundo. A infecção é causada por espécies patogênicas de bactérias do gênero *Leptospira*. Os reservatórios naturais das espécies patogênicas são animais selvagens, e roedores como o *Rattus norvegicus*, que albergam a bactéria nos túbulos renais, embora os animais domésticos também estejam frequentemente infectados com leptospirosas (LEVETT, 2001). O homem é um hospedeiro acidental que se infecta através do contato com água, urina e tecidos animais contaminados.

A imunidade desenvolvida pela infecção é mediada por anticorpos que opsonizam a bactéria e induzem à fagocitose por neutrófilos e macrófagos. Anticorpos começam a ser detectados na circulação entre 2 e 10 dias após a infecção dependendo da espécie, estado imunológico do paciente e do número de partículas infectantes. A principal resposta é contra o LPS e a imunidade conferida é sorovar específica, podendo ocorrer o desenvolvimento de uma resposta menos eficaz contra outros sorovares do mesmo grupo (FAINE et al., 1999).

Em países desenvolvidos a leptospirose é considerada uma doença ocupacional, acometendo principalmente veterinários e outros profissionais que trabalham em açougues e frigoríficos, além de profissões que exigem a exposição a coleções de água, como camponeses ou praticantes de esportes aquáticos, ou a população em geral quando a região onde vivem é submetida a furacões e enchentes (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 1998).

Em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, como o Brasil, a doença assume caráter endêmico entre a população de baixa renda que está continuamente exposta a fatores de risco, uma vez que geralmente vive em locais sem saneamento básico, propício a enchentes e ao acúmulo de lixo, que favorecem a proliferação de roedores (KO et al., 1999).

A grande maioria das infecções por leptospirosas ocorre de forma assintomática ou com poucos sintomas. Quando ocorre manifestação clínica, os sintomas podem ser parecidos com outras doenças comuns como influenza, dengue e febre tifóide. A forma leve da doença pode incluir febre de começo repentino, calafrios, cefaléia e mialgias (LEVETT, 2001). Além disso, a leptospirose apresenta duas formas graves, a síndrome de Weil e a Síndrome Hemorrágica Pulmonar Severa (SPHS). A síndrome de Weil apresenta 10% de mortalidade e pode causar icterícia, falência hepática e renal, já a SPHS possui mais de 50% de mortalidade podendo causar insuficiência respiratória, arritmias e estado mental alterado (DUPONT et al., 1997). Por ter sintomas parecidos com influenza, o paciente muitas vezes demora a procurar atendimento médico e, quando procura, é necessário que o diagnóstico confirmatório de leptospirose seja imediato para que o tratamento seja iniciado o mais rapidamente possível.

1.2. *Leptospira*

O gênero *Leptospira* pertence à ordem das *Spirochaetales*, diferindo das demais espiroquetas pela presença de ganchos nas extremidades (OMS, 2003). Atualmente coexistem dois tipos de classificação de *Leptospira*, a sorológica e a genotípica. A classificação sorológica é a mais antiga e é feita em duas espécies de leptospirosas, a *Leptospira interrogans* e a *Leptospira biflexa*, que são separadas de acordo com suas características bioquímicas de cultivo. A *L. biflexa* cresce a 13°C e na presença de 8-azaguanina, e não forma células esféricas na presença de 1M de NaCl (LEVETT, 2001).

Neste tipo de classificação, todas as leptospirosas patogênicas pertencem à espécie *L. interrogans* e todas as saprófitas pertencem à espécie *L. biflexa*. A unidade sistemática básica da leptospira é o sorovar; atualmente já foram descritos mais de 60 sorovares saprófitas e 200 sorovares patogênicos agrupados em 25 sorogrupos que são classificados de acordo com a soroaglutinação observada após adsorção cruzada com antígeno homólogo. Caso haja a permanência de título maior que 1:10 no antisoro testado repetidamente, então duas cepas são definidas como pertencendo a diferentes sorovares. As principais estruturas responsáveis por esta

aglutinação são as cadeias laterais de carboidratos do lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana da bactéria (LEVETT, 2001).

Atualmente a classificação sorológica vem sendo substituída pela classificação genômica, que divide as leptospirosas em 16 espécies genômicas de acordo com o perfil obtido em hibridização de DNA e confirmado através da técnica *multilocus enzyme electrophoresis* (LEVETT, 2001). Por esta nova metodologia de classificação sorovares patogênicos e saprófitas podem estar contidos dentro de uma mesma espécie genômica, e um mesmo sorovar, dependendo da cepa, pode fazer parte de mais de uma espécie genômica (BRENNER et al., 1999).

1.3. Diagnóstico de Leptospirose

Clinicamente a leptospirose é uma enfermidade de difícil diagnóstico uma vez que a sintomatologia apresentada inicialmente pelo paciente é muito variável e pode ser facilmente confundida com outras doenças febris. Faz-se necessário, portanto, o diagnóstico laboratorial usando amostras de órgãos e tecidos dos pacientes suspeitos.

O diagnóstico laboratorial da leptospirose pode ser realizado por metodologias que se baseiam na detecção das leptospirosas diretamente nos órgãos e tecidos, ou na detecção de anticorpos específicos que são produzidos durante a infecção.

A Figura 1 ilustra como ocorre a distribuição das leptospirosas e a produção de anticorpos, assim como os testes de laboratório aplicáveis nas fases aguda e convalescente da doença. Observa-se que a bactéria, inicialmente encontrada somente no sangue, após alguns dias começa a ser eliminada na urina e a presença no sangue pode não ser mais detectada. Também apresenta a resposta de anticorpos em cada fase, percebendo-se que a soroconversão sofre influência da antibioticoterapia, se começada precocemente e identifica tecidos próprios para cada tipo de investigação laboratorial de acordo com a fase da doença.

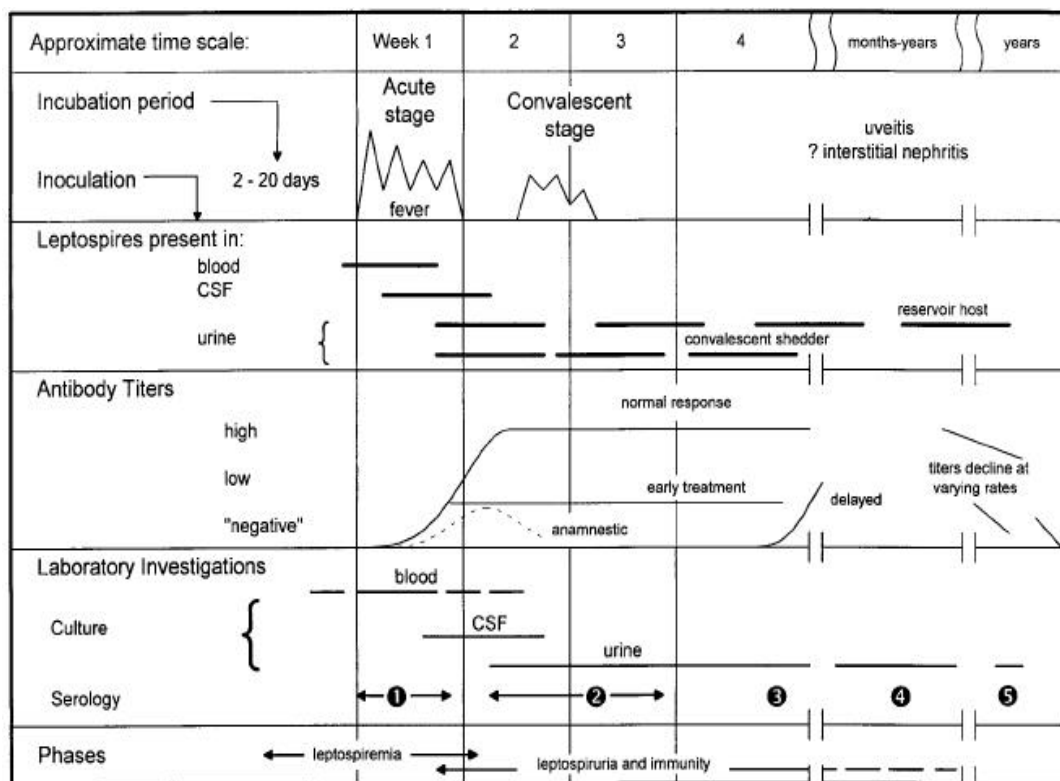


Figura 1: Distribuição de leptospiros, produção de anticorpos e testes laboratoriais aplicáveis nas diferentes fases da doença (Reproduzido de LEVETT, 2001).

O isolamento do agente e cultivo do mesmo é o padrão ouro de diagnóstico laboratorial, mas sua realização somente é possível se a amostra for coletada antes de serem administrados antibióticos ao paciente. Além disso, apesar de este método apresentar um diagnóstico bastante confiável, os cultivos devem ser observados por pelo menos 16 semanas, já que o tempo necessário para o crescimento de leptospiros pode variar de 7 dias a várias semanas de acordo com o sorovar infectante e o número inicial de bactérias viáveis (OIE, 2004).

A demonstração do agente infeccioso em órgãos internos de animais clinicamente suspeitos como fígado, pulmões e cérebro, ou em fluídos corpóreos como sangue, leite e líquidos cérebro-espinhal, torácico e peritoneal, serve como resultado confirmatório da fase aguda da doença. Contudo, o isolamento de leptospiros dos rins, urina e trato genital de um animal sem a sintomatologia clínica apenas indica que o animal é um portador do agente infeccioso (OIE, 2004).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica que vem sendo utilizada experimentalmente na detecção de leptospiros em fluídos biológicos, tendo sido publicados vários pares de *primers* para amplificação de diversos genes (OIE,

2004). Em urina, a PCR apesar de apresentar alta sensibilidade pode ter baixa especificidade como resultado de amostras contaminadas por inibidores e outras bactérias. Uma tentativa efetiva de concentrar as leptospiros presentes na urina de bovinos além de eliminar possíveis inibidores e contaminantes da PCR foi descrita (TAYLOR et al., 1997) utilizando separação imunomagnética com esferas cobertas com MAb's específicos contra *L. interrogans* sorovar hardjo. Este tipo de diagnóstico, embora sensível, é restrito a alguns laboratórios de referência, pois exige mão-de-obra altamente especializada e infra-estrutura laboratorial cara.

Por outro lado, existem vários métodos sorológicos para a demonstração de anticorpos específicos anti-leptospiros. O teste de aglutinação microscópica (MAT) é o teste de referência recomendado pela Organização Internacional de Epizootias (OIE, 2004), sendo seu resultado avaliado juntamente com os dados epidemiológicos e do diagnóstico clínico do paciente. Neste método o soro em teste reage com antígenos de uma bateria de sorovares representativos dos diversos sorogrupos, e a sua aglutinação é observada em microscópio de campo escuro. Soroconversão do título de anticorpos em amostras de soros pareadas, ou mesmo um alto título contra um determinado sorovar na primeira coleta, é considerado confirmatório de infecção aguda.

Este teste apresenta boa especificidade, embora ocorram reações-cruzadas entre sorovares, especialmente dentro de um mesmo sorogrupo. Entretanto, nem sempre a sensibilidade do MAT é satisfatória uma vez que os anticorpos só aparecem em níveis detectáveis na corrente circulatória 7 a 10 dias após o início dos sintomas. A MAT normalmente só é utilizada em laboratórios de referência porque é necessária a manutenção de uma grande quantidade de antígenos vivos no laboratório, o que pode ser laborioso principalmente se a bateria de antígenos a ser testada for muito grande. Um fator que poderia melhorar a sensibilidade deste teste é a utilização de isolados locais (OIE, 2004).

Há vários testes sorológicos disponíveis no mercado, porém todos apresentam baixa sensibilidade na fase inicial da doença e diferentes graus de especificidade uma vez que, em sua maioria, utilizam extratos de leptospira do sorovar saprófita Patoc (EFFLER et al., 2002; MCBRIDE et al, 2005).

Uma avaliação realizada no Hawai (EFFLER et al., 2002) com 8 tipos diferentes de testes sorológicos utilizados no diagnóstico de leptospirose humana demonstrou que todos apresentaram baixa sensibilidade nos primeiros 14 dias após o início dos

sintomas, com exceção do teste de aglutinação de látex que nos primeiros 7 dias após o início dos sintomas apresentou sensibilidade de 90%. Porém, este teste foi desconsiderado para uso pois a especificidade foi de apenas 10%.

Um formato de teste interessante, que pode ser facilmente realizado como triagem de pacientes em locais longe de laboratórios de referência, é o ensaio imunocromatográfico ou de fluxo lateral (SMITS et al., 2001; EAPEN et al., 2002) que detecta anticorpos IgM. Contudo este teste enfrenta o mesmo problema de outros testes sorológicos que é o de não apresentar sensibilidade suficiente com a primeira amostra de sangue coletada (menos de 10 dias) (MCBRIDE et al., 2005).

Testes ELISA têm sido amplamente utilizados em vários formatos para detecção de anticorpos anti-leptospira, principalmente imunoglobulinas M (LEVETT & BRANCH, 2002), apresentando sensibilidades entre 87% e 95% e especificidades entre 87% e 96%. Nestes resultados deve-se levar em consideração que o antígeno utilizado foi obtido do sorovar Patoc (saprófita) e o fato de não poderem ser confirmatórios, mas apenas presuntivos, uma vez que a IgM pode persistir no soro por algum tempo, sendo necessária a análise de uma segunda amostra de sangue para demonstrar a soroconversão.

Alguns autores já relataram o uso de anticorpos monoclonais para detecção de anticorpos em ELISA competitivo (SURUJBALLI & ELMGREN, 2000) ou em ELISA de captura de anticorpos (YAN et al., 1999), mas ambos detectam anticorpos sorovar-específicos. Em formato de dot-ELISA (SAENJARUK et al., 2002), há um teste relatado para captura de antígeno em urina de pacientes. Este teste utilizou 3 anticorpos monoclonais que reagem com 3 proteínas diferentes (35kDa, 36kDa e 38kDa) presentes em vários sorovares patogênicos. Foram testadas urinas de pacientes admitidos com suspeita de leptospirose em um hospital, do dia zero ao 7º do aparecimento dos sintomas, e o resultado foi de que até o 4º dia pós-admissão todos os pacientes apresentaram positividade no teste.

Atualmente vários testes estão disponíveis para o diagnóstico de leptospirose, mas nenhum apresenta as características desejadas de sensibilidade e especificidade para orientar um tratamento específico para esta infecção. Vários testes utilizam extratos inteiros de leptospirosas como antígeno, resultando em testes que não detectam o amplo espectro de sorovares patogênicos e, portanto, não podem ser utilizados isoladamente para diagnóstico.

1.4. Proteínas de Membrana Externa

Para o correto diagnóstico da leptospirose, tanto na detecção de anticorpos como na do agente, é de extrema importância a identificação das estruturas da membrana externa da bactéria, pois estes componentes serão utilizados para detectar a bactéria ou o desenvolvimento de resposta imune humoral no paciente.

O LPS é uma estrutura da membrana externa de bactérias gram-negativas altamente imunogênica, tanto que inicialmente pensava-se que ele era o único antígeno importante nas leptospirosas e que provocava uma resposta protetora exclusivamente humoral (FAINE et al., 1999). Atualmente se sabe que também existem várias proteínas expostas na superfície da membrana que interagem com o sistema imune (CULLEN et al., 2004; CULLEN et al. 2005), e que embora o LPS continue sendo a estrutura mais imunogênica, não é a única.

O LPS da leptospira é atípico, diferindo do LPS de outras bactérias gram-negativas em propriedades bioquímicas, físicas e biológicas. Foi comprovado que o LPS da leptospira requer a ligação ao CD14 e TLR2 (Toll-like receptor 2) na superfície de uma célula apresentadora de antígeno para ativar o sistema imune, ao contrário das outras bactérias gram-negativas que se ligam ao TLR4 (WERTS et al., 2001). Também, como discutido anteriormente, o LPS gera uma resposta sorovar-específica e, assim, apresenta limitações quando utilizado como antígeno para detecção de anticorpos anti-leptospirosas em testes sorológicos.

Neste contexto tornam-se importantes as proteínas da membrana externa (OMPs) das leptospirosas, uma vez que elas também estão expostas na superfície da célula, são imunogênicas e muitas são conservadas apenas em sorovares patogênicos (CULLEN et al., 2004; MATSUNAGA et al., 2005; CULLEN et al., 2005).

As OMPs de leptospirosas foram divididas em 3 classes (CULLEN et al., 2003). A maior classe de OMPs é composta pelas lipoproteínas LipL32, LipL21, LipL36, LipL48 e LipL41. LipL32 é uma proteína de 32kDa com atividade de hemolisina (HAUK et al., 2005). É a OMP mais abundante em leptospirosas patogênicas, não existindo em saprófitas, além de ser a proteína mais reconhecida pelo soro de pacientes infectados com leptospirose (HAAKE et al., 2000). As proteínas LipL41, LipL21 e LipL32, são expressas tanto *in vivo* com *in vitro*, e também somente são

detectadas em sorovares patogênicos (CULLEN et al., 2003). Outra proteína, a LipL36 está ancorada à face interna da membrana externa e somente é expressa *in vitro*, portanto não tem aplicação em testes de diagnóstico (HAAKE et al., 2000).

A segunda e terceira classes de proteínas são compostas por apenas um representante cada uma. A OmpL1 (segunda classe) é uma proteína transmembrana com função de porina, e a P31_{LipL45} (terceira classe) é uma proteína periférica da membrana que usa o canal de secreção das lipoproteínas para se lançar nas membranas internas e externas da bactéria (CULLEN et al., 2003).

Recentemente, uma quarta classe de proteínas de membrana foi descrita. Ela é constituída pelas Ligs (leptospiral immunoglobulin-like proteins) e possui 3 proteínas identificadas até agora: Lig A (Palaniappan *et al.*, 2002), Lig B e Lig C (MATSUNAGA et al., 2003). Este é um conjunto interessante de proteínas que possuem funções de adesão e invasão celular e sua expressão ocorre principalmente *in vivo*, sendo marcadamente atenuada após algum tempo em cultivo.

O sistema imune dos pacientes infectados com leptospirose responde a essas proteínas de forma muito efetiva e, por isso, elas têm sido consideradas para uso no desenvolvimento de novos testes de diagnóstico, tanto para detecção de anticorpos (OKUDA et al., 2005; FLANNERY et al., 2001) como para detecção de antígenos (TAYLOR et al., 1997; SAENJARUK et al., 2002). Nosso grupo está interessado no desenvolvimento de testes de diagnóstico que se baseiam na detecção destes antígenos específicos de leptospirosas patogênicas.

1.5. Anticorpos Monoclonais

A tecnologia de produção de anticorpos monoclonais (MAbs) foi desenvolvida na primeira metade da década de setenta (KOHLENER e MILSTEIN, 1975) e desde então os MAbs têm sido largamente empregados em métodos de diagnóstico (BERRY, 2005), como produtos terapêuticos (CAMPBELL, 1991; BERRY, 2005) e como reagentes em pesquisa. Além disso, MAbs são muito úteis na identificação de epítomos ou proteínas para uso em vacinas recombinantes (BERRY, 2005).

Apesar de ser uma técnica ainda cara, o seu uso é justificado uma vez que os hibridomas obtidos, que secretam os MAbs, possuem muitas vantagens em relação aos animais usados para obter os anticorpos policlonais. Hibridomas podem ser facilmente congelados, estocados e descongelados vários anos depois sem alterações das suas características. A produção de MAbs também é vantajosa pelo fato de utilizar camundongos, que são de fácil manuseio quando comparados a animais maiores normalmente utilizados no preparo de soros policlonais. Anticorpos policlonais são inconstantes, no sentido de que as características dos anticorpos purificados refletem o exato momento no qual o sangue foi retirado do animal. Apesar de serem muito mais baratos e fáceis de obter.

Um anticorpo monoclonal reconhece uma única especificidade de epítopo em um patógeno, e este fato pode influenciar tanto positivamente quanto negativamente um teste de diagnóstico. A influência é positiva no que diz respeito à especificidade do teste que só reconhecerá antígeno que contém aquele epítopo; a influência negativa se dá em relação à sensibilidade do teste, que não será capaz de reconhecer variantes do mesmo antígeno ou se o epítopo for expresso em pouca quantidade na superfície do patógeno. Por outro lado, um anticorpo policlonal, por reconhecer vários determinantes antigênicos, geralmente apresenta um sinal mais forte em testes de diagnóstico, mas perde em especificidade (CAMPBELL, 1991).

Uma outra desvantagem no uso de MAbs em testes de diagnóstico em relação aos anticorpos policlonais ocorre na sua produção, uma vez que o estabelecimento de uma linhagem secretora de anticorpos é muito trabalhosa, especialmente na fase de triagem de hibridomas produtores de anticorpos para clonagem.

Para que seja possível a utilização de MAbs em testes de diagnóstico é necessário que eles possuam alta afinidade pelo seu antígeno, não apresente reações inespecíficas e não necessite grandes quantidades do antígeno para emitir um sinal detectável (BOENISCH, 2003).

2. Objetivos

2.5. *Geral*

- Produzir um painel de anticorpos monoclonais contra LipL32 e identificar aqueles apropriados para uso em ensaios de captura de antígeno na fase aguda da leptospirose.

2.6. *Específicos*

- Produzir anticorpos monoclonais contra LipL32 recombinante.
- Comprovar a reatividade dos anticorpos com LipL32 nativa.
- Determinar as constantes de afinidade e dissociação dos anticorpos.
- Investigar a possibilidade de uso conjunto dos anticorpos em um mesmo teste diagnóstico.

3. Material e Métodos

3.1. Produção e Purificação de LipL32 recombinante

Toda as etapas constantes da parte de clonagem do gene e produção e purificação de LipL32 recombinante foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas pela doutoranda Fabiana Kömmling Seixas sob orientação do Professor Odir Antonio Dellagostin.

O gene *lipL32* de *Leptospira interrogans* foi amplificado por PCR e clonado no vetor de expressão pAE. Este plasmídeo foi utilizado na transformação de *E. coli* BL21 (DE3). A purificação da proteína foi realizada através de cromatografia de afinidade com uma resina Ni-NTA do kit QIA EXPRESSIONIST (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. O eluído foi dializado contra PBS (0,1% glicina, pH 8.0). A avaliação da pureza foi verificada através de eletroforese em gel de acrilamida e a concentração final da proteína foi medida através do método de Bradford (1976).

3.2. Cultivo de *Leptospiras*

Os sorovares de *Leptospira* utilizados neste trabalho foram fornecidos pelo Centro de Controle de Zoonoses da UFPel. As bactérias foram cultivadas em meio EMJH a 30°C até atingir a densidade de 2×10^8 leptospiras.mL⁻¹ e então foram centrifugadas a 18.000g durante 10 minutos. O precipitado foi ressuspenso em PBS de forma a obter aproximadamente 1×10^9 leptospiras. mL⁻¹. Os sorovares utilizados incluíram Australis, Bratislava, Butembo, Bataviae, Brasiliensis, Hebdomadis, Copenhageni, Lai, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Proechymis, Pyrogenes, Hardjo, Wolffi, Cynopteri, Ballum, Celledoni, Javanica, Tarassovi, Shermani, Panama e sorovares saprófitas como Andamana e Patoc.

3.3. Produção de Anticorpos Monoclonais

3.3.1. Fusão Celular

Fêmeas BALB/c entre 6 e 8 semanas de vida foram inoculadas intraperitonealmente com 50µg de rLipL32; na primeira dose foi utilizado Adjuvante Completo de Freund e nas doses subseqüentes utilizou-se Adjuvante Incompleto de Freund. As inoculações ocorreram nos dias 0, 14 e 21. Uma semana após a terceira inoculação o soro dos animais foi retirado por punção do plexo retro-orbital e o título de anticorpos foi determinado por ELISA indireto utilizando rLipL32. O camundongo que apresentou melhor título (1:25000) foi utilizado na fusão. Quatro dias antes da fusão foi feita uma inoculação de reforço da proteína (50µg).

O animal foi sacrificado por deslocamento cervical e imediatamente seu baço foi removido em ambiente estéril. O baço foi macerado em meio de cultivo DMEM incompleto (MI) e centrifugado a 180g por 8 minutos, as células foram ressuspendidas em MI e novamente centrifugadas. Após repetir este processo três vezes as células foram ressuspendidas em 10mL de MI.

Células de mieloma da linhagem celular SP2/O cultivadas em DMEM completo (MC) foram removidas dos frascos de cultivo e centrifugadas a 180 g por 8 minutos. Após lavar três vezes com MI, as células foram ressuspendidas em 10mL de MI e contadas em câmara de Neubauer.

As células do baço foram misturadas com 2 a 5×10^7 células SP2/O e centrifugadas a 180g por 8 minutos, o sobrenadante foi desprezado e 1mL de uma solução de PEG 3.000 a 50% em MI foi adicionado durante 1 minuto. Esta suspensão foi agitada gentilmente por 1 minuto e, após, 9mL de meio incompleto foram adicionados durante 5 minutos. As células foram centrifugadas, ressuspendidas em 80mL de meio DMEM HAT e distribuídas em 4 placas de cultivo de 96 cavidades (0,2 mL/cavidade).

3.3.2. Seleção de Cavidades Positivas

O meio de cultivo das cavidades que apresentavam crescimento celular foram testadas em ELISA indireto utilizando rLipL32 ($3\mu\text{g.mL}^{-1}$) como antígeno. Cavidades positivas foram clonadas duas vezes pela técnica da diluição limitante (Campbell, 1991).

3.3.3. Cultivo e Estocagem dos Hibridomas

As linhagens celulares obtidas foram cultivadas em MC, expandidas para garrafas de 75cm^2 e então congeladas em nitrogênio líquido ou injetadas em camundongos para produção de ascites.

3.3.4. Produção de Ascite em Camundongos BALB/c

Camundongos BALB/c com 6-10 semanas de vida foram sensibilizados com 0,5mL de Pristane (2, 6, 10,14-tetra-metil-pentadecano). Após 10 dias, 5×10^6 células de hibridomas suspensas em MI foram injetadas intraperitonealmente em cada camundongo. Cerca de 10 a 12 dias após, os camundongos foram puncionados para retirada da ascite. O fluido ascítico foi centrifugado a 180 g por 5 minutos e o sobrenadante foi estocado a -18°C até o uso.

3.3.5. Purificação dos MABs

As ascites foram descongeladas, passadas em filtro com poro de $0,8\mu\text{m}$ e purificadas em coluna de proteína A-Sepharose (Hi-Trap) conforme as instruções do fabricante (Amersham, MS). As frações obtidas foram dializadas contra tampão

fosfato salino (PBS) (500 vezes o volume das frações) e então concentradas em solução de polietilenoglicol (PM 20.000) a 20%. A concentração de anticorpos nas preparações concentradas foi determinada por UV a 280nm, utilizando o coeficiente de extinção da IgG (1,35) para o cálculo. Os anticorpos foram estocados a -18°C até o uso.

3.3.6. Isotipagem dos MAbs

Uma placa de poliestireno com 96 cavidades (Nunc, EUA) foi sensibilizada com 50µL de rLipL32 (3µg.mL⁻¹) em tampão carbonato-bicarbonato (0,05M, pH 9,6), por 1h a 37°C. Após lavar cada cavidade 3 vezes com 200µL de PBS, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T), foi adicionado 50µL do meio de cultivo de cada hibridoma. A placa foi novamente incubada a 37°C por 2h e lavada 3 vezes com 200µL de PBS-T. Anticorpos anti-isotipo específicos (Sigma, EUA) foram diluídos em PBS-T na proporção de 1:4000 e 50µL foi adicionado às cavidades. A placa foi incubada a temperatura ambiente por 30 minutos, após os quais foi novamente lavada com PBS-T. O conjugado de peroxidase de coelho anti-IgG de cabra foi diluído 1:5000 em PBS-T e 50µL foi adicionado à cada cavidade. Após 15 minutos a placa foi lavada como acima e 50µL de solução do cromógeno ortofenilenodiamina diluído em tampão citrato-fosfato (0,2M, pH 4,0), contendo 0,01% de peróxido de hidrogênio, foi adicionado nas cavidades. A leitura foi realizada após 15 minutos de reação no escuro em espectrofotômetro para microplacas (Titertek Multiscan MCC/340) com filtro de 450nm.

3.4. Índice de Aditividade (IA)

O IA foi determinado conforme a metodologia descrita por Friguet *et al.* (1983). Primeiramente foi realizado um ELISA indireto para determinação da curva de saturação do antígeno com cada um dos MAbs. Este ELISA utilizou rLipL32

($2\mu\text{g.mL}^{-1}$) para sensibilizar as cavidades da placa e diluições seriadas em base 2 de cada MAb purificado. Após, foi realizado um novo ELISA que utilizou a mesma concentração de antígeno com os MAbs, adicionados individualmente ou em pares, nas suas respectivas diluições de saturação. A seguir foi adicionado a cada cavidade conjugado de peroxidase-imunoglobulinas de coelho anti-Ig de camundongo diluído 1:1000 em PBS-T. Após 15 minutos a placa foi lavada como descrito abaixo e a solução do cromógeno ortofenilenodiamina ($0,4\text{mg.mL}^{-1}$) diluído em tampão citrato-fosfato (0,2M, pH 4,0), contendo 0,01% de peróxido de hidrogênio, foi adicionado às cavidades. A leitura foi realizada após 15 minutos em comprimento de onda de 450nm. O resultado foi analisado de acordo com a fórmula $\{[2A_{1+2}/(A_1+A_2)]-1\} \times 100$, onde A_1 , A_2 e A_{1+2} são, respectivamente, os valores da absorvância do MAb 1 quando adicionado individualmente, do MAb 2 individualmente e da soma dos dois MAbs adicionados juntos. O volume dos reagentes usados neste ELISA foi $50\mu\text{L}$, todas as incubações foram de 1h e todas as lavagens foram repetidas três vezes com PBS-T. A determinação dos IA foi repetida pelo menos duas vezes com cada par de MAbs.

3.5. Constante de Afinidade (K_a) e Constante de Dissociação (K_d)

A determinação da K_a dos MAbs foi realizada de acordo com o descrito por Friguet *et al.* (1985), com algumas modificações. Inicialmente, a concentração de MAb a ser utilizada na determinação da K_a foi selecionada através de ELISA indireto. A proteína rLipL32 diluída em tampão carbonato-bicarbonato à concentração de $1\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi aplicada em placa de poliestireno de 96 cavidades ($100\mu\text{L/cavidade}$) e incubada a 20°C . Após 24h a placa foi lavada 3 vezes com PBS-T ($200\mu\text{L/cavidade}$) e $150\mu\text{L}$ do MAb diluído em PBS-T, em 10 diluições nas quais as concentrações que variavam entre $10^{-4} \text{mg.mL}^{-1}$ e $10^{-5} \text{mg.mL}^{-1}$, foi adicionado em cada cavidade. A seguir foi adicionado conjugado de cabra anti-camundongo com peroxidase ($150\mu\text{L/cavidade}$) na diluição 1:2000 e, após incubação e lavagem, foi adicionado $150\mu\text{L}$ de solução cromógena de ortofenilenodiamina diluído em tampão citrato-fosfato (0,2M com 0,01% de H_2O_2 , pH 4,0), em cada cavidade. Após 15 minutos a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 450nm.

Depois de selecionada a concentração de MAb a ser usada passou-se à determinação da K_a conforme descrito a seguir. Uma placa foi sensibilizada com $1\mu\text{g.mL}^{-1}$ de rLipL32 como anteriormente. Seis diluições de antígeno (4×10^{-10} a $2 \times 10^{-7}\text{M}$) foram preparadas em microtubos e incubadas com o MAb por 16 h a 20°C para que a reação atingisse o equilíbrio, também foi preparado um microtubo sem antígeno, somente com o MAb na concentração escolhida. Após, o conteúdo dos microtubos foi adicionado à placa ($150\mu\text{L}$ por cavidade) para ligação dos MAbs livres. A seguir foi adicionado conjugado de cabra anti-camundongo com peroxidase ($150\mu\text{L/cavidade}$) na diluição 1:2000 e, após incubação e lavagem, foi adicionado $150\mu\text{L}$ de solução cromógena de ortofenilenodiamina diluído em tampão citrato-fosfato ($0,2\text{M}$ com $0,01\%$ de H_2O_2 , $\text{pH } 4,0$), em cada cavidade. Após 15 minutos a leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro a 450nm .

Nestes ELISAs, cada período de incubação (entre as etapas) foi realizado por 1h a 37°C , exceto quando indicado. Ao término das incubações as cavidades foram lavadas 3 vezes com $200\mu\text{L}$ de PBS-T.

As absorvâncias do ELISA realizado após o complexo Ag-MAb ter atingido o equilíbrio foram utilizadas na equação $(A_0 - A_i)/A_i = K_a \cdot I$, conforme sugerido por Bobrovnik (2003), para obter as retas para determinação da K_a . Nesta equação A_0 é a absorvância obtida com o MAb na concentração selecionada, sem haver reagido com Ag no microtubo; A_i é a absorvância obtida na reação feita após o complexo Ag-MAb ter atingido o equilíbrio; K_a é a constante de afinidade e I é a concentração de Ag utilizada. Um gráfico foi construído utilizando esta equação e K_a foi determinada pela equação da reta obtida, onde a inclinação da reta é K_a .

A constante de dissociação foi calculada pela equação $K_d = 1/K_a$.

3.6. ELISA com LipL32 Nativa

Uma suspensão de *Leptospiras* ($2 \times 10^7.\text{mL}^{-1}$) foi inativada a 56°C por 16h e adicionada à uma placa de ELISA ($100\mu\text{L/cavidade}$) previamente sensibilizada com poli-L-Lisina 2,5%. Os MAbs foram diluídos em concentrações entre $17\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0,4\mu\text{g.mL}^{-1}$. Conjugado anti-Ig de camundongo e peroxidase diluído (1:2000) foi utilizado e após foi adicionada a solução cromógena. Após 15 minutos a leitura foi

realizada em espectrofotômetro a 450nm. Cada período de incubação (entre cada uma das etapas) foi realizado por 1h a 37°C, exceto quando indicado. Ao término das incubações as cavidades foram lavadas 3 vezes com 200µL de PBS-T.

3.7. Western blotting

As suspensões de leptospiras contendo 1×10^9 leptospiras.mL⁻¹ foram aquecidas a 100°C por 3 minutos em tampão de amostra (0,25M Tris-HCl, 10%SDS, 0,5% azul de bromofenol, 50% glicerol) em presença de agente redutor (β -mercaptoetanol). O extrato de 5×10^7 leptospiras por cavidade foram aplicadas em um gel de acrilamida 12% na presença de SDS e separadas eletroforeticamente. Ao término da eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Amersham) em tampão de transferência por 1,5 horas com a fonte ajustada para DDP (diferença de potencial elétrico) = 100V e C (corrente) = 400mA. Após, as membranas foram bloqueadas com Blotto (5% de leite em pó desnatado em PBS) por 2h. Os MAbs foram diluídos (1:1000) em PBS e incubados com a membrana. Conjugado anti-IgG de camundongo e peroxidase foi utilizado diluído (1:1000) em PBS. A revelação foi desenvolvida com o Kit ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System (Amershan, Reino Unido) ou 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, exceto quando indicado. Ao término das incubações as membranas foram lavadas com PBS 3 vezes por 5 minutos cada vez.

4. Resultados

4.1. Produção de Anticorpos Monoclonais

Foi realizada uma fusão celular e obtidos seis hibridomas estáveis que secretaram MAbs anti-rLipL32 (LipL2, LipL3, LipL4, LipL5, LipL6 e LipL7). Estes MAbs, juntamente com outros três (1D9, 36C4 e 412H) cedidos pelo Prof. José Antonio Guimarães Aleixo e pela doutoranda Cláudia Pinho Hartleben Fernandes disponíveis de fusões anteriores, foram utilizados nos experimentos de caracterização. Com exceção da isotipagem, que utilizou o sobrenadante do cultivo dos hibridomas, os outros experimentos de caracterização utilizaram MAbs purificados a partir de fluído ascítico.

4.2. Isotipagem dos MAbs

Os 9 MAbs foram isotipados conforme descrito e o resultado é mostrado na Tabela 1. Como controles positivo e negativo neste experimento foram utilizados, respectivamente, soro de camundongo não imunizado diluído em tampão carbonato-bicarbonato (0,05M, pH 9,6) e soro de camundongo não imunizado diluído em PBS-T.

Tabela 1: Isotipagem dos anticorpos monoclonais anti-rLipL32

		Anticorpos Monoclonais							
	1D9	36C4	412H4	LipL2	LipL3	LipL4	LipL5	LipL6	LipL7
Isotipo	IgG2b	IgG2a	IgG3	IgG2b	IgG2b	IgG2b	IgG2b	IgG2b	IgG2b
Mouse monoclonal antibody isotyping reagents									

4.3. Índice de Aditividade

O índice de aditividade é utilizado para verificar se a ligação de um MAb interfere com a ligação de outro MAb. Se o índice encontrado for maior do que 50% então pode ser considerado que os dois anticorpos testados reagem em regiões diferentes do mesmo antígeno (Friguet, 1983). Como pode ser observado na Tabela 2, a ligação de qualquer um dos MAbs obtidos resulta na incapacidade de outro MAb reagir com o antígeno. Na realização deste experimento os MAbs foram utilizados na forma de ascite em diluições entre 1:25 e 1:400 em PBS-T. Foram feitos dois experimentos independentes com três repetições de cada diluição.

Tabela 2: Determinação do índice de aditividade dos MAbs* (%)

	1D9	LipL2	LipL3	LipL4	LipL5	LipL6	LipL7	36C4	412H4
1D9	---	-17,2	-7,9	-8,3	-14,3	2,0	3,7	-4,2	12,8
LipL2		---	-14,1	-0,9	-15,4	1,5	1,4	5,9	23,7
LipL3			---	-4,7	-11,7	-10,6	-11,3	-8,2	9,2
LipL4				---	-4,9	10,2	13,7	23,5	13,3
LipL5					---	9,1	6,1	4,1	25,7
LipL6						---	-1,3	-3,2	10,3
LipL7							---	8,1	1,6
36C4								---	-13,1
412H4									---

*Os resultados são médias de dois experimentos independentes.

4.4. Constante de Afinidade e de Dissociação

A Figura 3 mostra as retas obtidas com as absorbâncias do ELISA realizado para determinação das constantes de afinidade e dissociação dos MAbs. A partir da

inclinação destas retas foram calculadas K_a e K_d (Tabela 3). Observa-se que os MAb's 1D9, LipL3 e LipL4 foram os que demonstraram K_a mais alta.

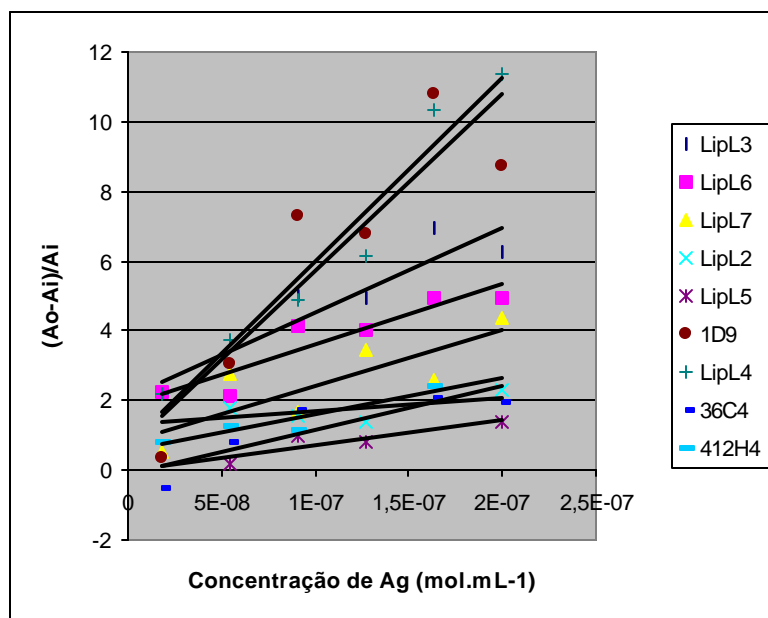


Figura 2: Curvas obtidas a partir de ELISA para determinação das constantes de afinidade e dissociação dos anticorpos monoclonais anti-rLipL32.

Tabela 3: Constantes de afinidade e dissociação dos anticorpos monoclonais

Característica	Anticorpos Monoclonais								
	1D9	LipL2	LipL3	LipL4	LipL5	LipL6	LipL7	36C ₄	412H ₄
K_a (L.mol ⁻¹)	5×10^7	9×10^6	3×10^7	3×10^7	6×10^6	2×10^7	2×10^7	10^7	10^7
K_d (mol.L ⁻¹)	2×10^{-9}	10^{-7}	3×10^{-8}	3×10^{-8}	$1,6 \times 10^{-7}$	5×10^{-8}	5×10^{-8}	10^{-7}	10^{-7}

4.5. ELISA com LipL32 nativa

Os nove MAb's foram testados em ELISA indireto para observar sua reatividade com LipL32 na forma nativa. Foram utilizados vários sorovares patogênicos de diversos sorogrupos e saprófitas (Andamana e Patoc). Conforme se observa na Tabela 4, todos os MAb's demonstraram reações positivas com sorovares patogênicos e não apresentaram reação com sorovares saprófitas. Foi considerado como reação positiva densidades óticas iguais ou maiores do que 2 vezes a densidade ótica obtida com um sorovar saprófita (Patoc).

Tabela 4: Resultado das reações dos anticorpos monoclonais com diferentes sorovares de leptospiras.

Leptospira		Anticorpo monoclonal								
Sorogrupo	Sorovar	LipL2	LipL3	LipL4	LipL5	LipL6	LipL7	1D9	36C4	412 H4
Australis	Australis	+	+	+	+	+	+	+	N	N
	Bratislava	+	+	+	+	+	+	+	N	N
Autunnalis	Butembo	N	N	N	N	N	N	+	+	+
Bataviae	Bataviae	+	+	+	+	+	+	+	N	N
	Brasiliensis	+	+	+	+	+	+	N	+	+
Hebdomadis	Hebdomadis	+	+	+	+	+	+	N	N	N
Icterohaemorr hagiae	Copenhageni	+	+	+	+	+	+	+	N	N
	Lai	N	N	N	N	N	N	+	+	+
	Icterohaemorr hagiae	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pomona	Pomona	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Proechymis	N	N	N	N	N	N	+	+	+
Pyrogenes	Pyrogenes	+	+	+	+	+	+	+	N	N
Sejroe	Hardjo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Wolffi	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cynopteri	Cynopteri	+	+	+	+	+	+	+	+	N
Ballum	Ballum	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Whitcombi	Celledoni	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Javanica	Javanica	+	+	+	+	+	+	+	N	N
Tarassovi	Tarassovi	+	+	+	+	+	+	N	+	+
Shermani	Shermani	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Panama	Panama	+	+	+	+	+	+	N	N	N
Andamana	Andamana	0,04	0,02	0,02	0,03	0,01	0,01	N	N	N
Semarang	Patoc	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,00	0,02	0,01	0,02

N = Não realizado

4.6. Western blot

Para confirmar se a reação positiva do ELISA com a proteína nativa era fruto da reação dos MAbs com a LipL32 foi realizado *Western blot* com diferentes sorovares de *Leptospira*, sendo utilizado como controles positivo e negativo a rLipL32 e o sorovar Patoc, respectivamente. Observa-se que é possível visualizar bandas claramente reativas contra todos os sorovares patogênicos testados e nenhuma reação com o sorovar saprófita testado (Figura 3). Todos os MAbs apresentaram resultados similares.

Esta técnica foi realizada com duplo propósito, pois ao usar o agente desnaturante (SDS) as proteínas ficam linearizadas, sendo então possível determinar se os MAbs reagem em epítomos lineares ou conformacionais. Todos os MAbs reagiram com a proteína sob condições redutoras, significando que todos reagem com epítomos lineares.

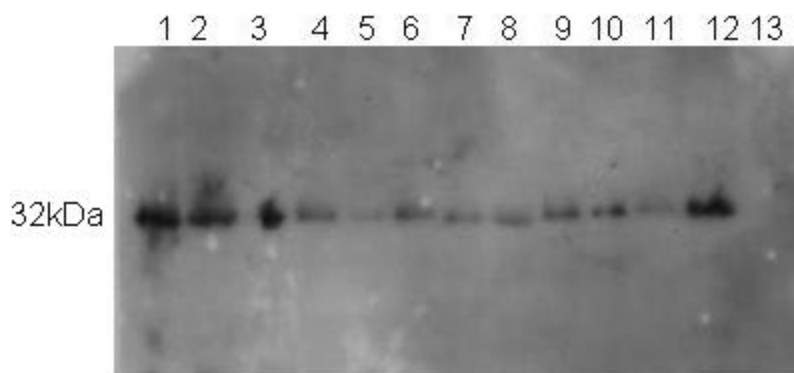


Figura 3: Western blot representativo demonstrando reação de diferentes sorovares de leptospira com o MAb LipL5. 1 – rLipL32; 2 – Australis; 3 – Autumnalis; 4 – Ballum; 5 -Brasiliensis; 6 – Canicola; 7 – Celledoni; 8 – Grippityphosa; 9 – Copenhageni; 10 – Icterohaemorrhagiae; 11 – Panama; 12 – Pomona; 13 – Patoc.

5. Discussão

A leptospirose é uma antrozooponose de distribuição mundial que ocorre de forma endêmica em países tropicais (KO et al., 1999). Devido a sua sintomatologia clínica ser muito semelhante a outras doenças o diagnóstico geralmente necessita ser confirmado por testes laboratoriais sorológicos.

Alguns autores descreveram o uso de anticorpos monoclonais em testes para diagnóstico de leptospirose. Surujballi et al. (2000) descreveu a produção e uso de dois MAb's específicos contra o sorovar pomona em um ELISA competitivo. Yan et al. (1999) descreveu o uso de MAb's contra o sorovar hardjo em um teste de captura de anticorpos. Nos dois trabalhos os MAb's são sorovares específicos ou apresentam pequena reação cruzada com outros sorovares.

Um dos interesses do nosso grupo de pesquisa é o desenvolvimento de um teste ELISA de captura de antígeno que possa ser utilizado na detecção dos diversos sorovares patogênicos de *Leptospira*. Neste trabalho 9 MAb's que reagem especificamente com uma proteína de superfície conservada em todos os sorovares patogênicos foram produzidos e tiveram suas características avaliadas para posterior uso em teste de diagnóstico.

A constante de afinidade de um MAb é um parâmetro importante quando o assunto é diagnóstico, pois ela fornece informações sobre a quantidade de antígeno necessário para saturar os paratopos do anticorpo quando a reação atinge o equilíbrio (BOENISCH, 2001). Isto significa que um MAb que requer uma baixa concentração de antígeno para saturar seus paratopos consegue detectar melhor este antígeno e é melhor para um teste de diagnóstico do que um MAb que requer uma maior concentração. Normalmente antígenos leptospirais não são abundantes no soro humano de pacientes acometidos de leptospirose, e uma concentração de cerca de 10^4 bactérias.mL⁻¹ indica fortemente o desenvolvimento de síndrome pulmonar hemorrágico, uma forma grave da infecção (MCBRIDE et al., 2005). A leptospira também possui uma fase transiente no sangue, o que dificulta a sua detecção neste fluido corpóreo (OMS, 2004).

Para a determinação da K_a foi escolhida a equação matemática proposta por Bobrovník (2003), pois é uma equação mais simples do que a originalmente sugerida por Friguier et al. (1985) e que possui a vantagem de não utilizar a concentração de MAb no cálculo, já que os erros de calibração dos equipamentos utilizados na diluição dos MABs fazem com que geralmente a diluição calculada no experimento não seja a real diluição utilizada. Os MABs produzidos neste trabalho demonstraram boa constante de afinidade e baixa constante de dissociação e são adequados para uso como reagentes no desenvolvimento de testes de captura de antígeno, especialmente os MABs 1D9, LipL3 e LipL4.

Outro experimento realizado foi a determinação do índice de aditividade que agrupa os MABs de acordo com o sítio antigênico que reagem. Os resultados sugerem que todos os MABs reagem no mesmo epítipo ou em regiões próximas, de forma que a ligação de um MAb causa um impedimento espacial (*steric hindrance*) para a ligação do outro anticorpo. Este resultado provavelmente se deve ao fato de que a seleção dos hibridomas foi realizada com ELISA que utilizou a proteína recombinante e não em sua forma nativa. Esta característica é muito importante uma vez que com o bloqueio da ligação de um MAb pelo outro eles não podem ser utilizados simultaneamente em um teste de diagnóstico de captura de antígeno.

Todas as características mencionadas anteriormente são muito importantes na escolha de um MAb entre vários para ser utilizado em testes de diagnóstico, mas mais importante ainda é definir se os anticorpos realmente reagem com a proteína na sua forma nativa na bactéria. Os resultados mostram, conforme esperado, que os Mabs reagem com todos os sorovares patogênicos testados e não reagem com sorovares saprófitas (andamana e patoc). Em um trabalho realizado anteriormente (LÜDTKE, 2003), foi observado que o MAb 1D9 não apresentou reação com o sorovar Sejroe cepa M84, apresentando, porém, reação com outros sorovares do mesmo sorogrupo. Este sorovar não estava disponível quando os demais MABs foram caracterizados e não foi, portanto, utilizado. No entanto, outros sorovares pertencentes ao mesmo sorogrupo foram utilizados e a reação observada com os novos MABs foi positiva. Estes resultados sugerem que um teste de diagnóstico que utiliza esses MABs terá a vantagem de propiciar um diagnóstico para leptospirose.

Nossos resultados sugerem que os MABs produzidos neste trabalho reagem com leptospirosas patogênicas e apresentam outras características como reação com epítopos lineares e constante de afinidade apropriada que fazem deles anticorpos

propícios para uso no desenvolvimento de novos testes de diagnóstico para leptospirose, desde que não sejam usados simultaneamente.

6. Conclusões

- Foram obtidos 6 MAbs que reagem especificamente com LipL32 nativa e recombinante.
- Os MAbs reagem com o mesmo epítipo ou com epítipos situados em regiões próximas na molécula do antígeno.
- Dois MAbs apresentam constantes de afinidade e dissociação adequados para o uso em testes de diagnóstico.
- Os MAbs produzidos não podem ser usados no mesmo teste de diagnóstico simultaneamente, pois a ligação de um dos MAbs bloqueia a ligação de outro.

7. Referências Bibliográficas

BERRY, J.D. Rational monoclonal antibody development to emerging pathogens, biothreat agents and agents of foreign animal disease: The antigen scale. **The Veterinary Journal** 170: 193 – 211. 2005.

BRADFORD, MM. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72: 248-254. 1976.

BOBROVNIK, S.A.. Determination of antibody affinity by ELISA. Theory. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**. 57: 213 – 236. 2003

BOENISCH, T. (Ed.) **Immunochemical Staining Methods**, 3^a ed., Califórnia: Dako, 2001.

BRENNER, D. J.; KAUFMANN, A. F.; SULZER, K. R.; STEIGERWALT, A. G.; ROGERS, F. C.; WEYANT, R. S.. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 49: 839–858. 1999

CAMPBELL, A.M.; **Monoclonal and immunosensor technology**. Amsterdam: Elsevier, 1991

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION . Outbreak of acute febrile illness among athletes participating in triathlons – Wisconsin and Illinois. **Morbidity and Mortality Weekly Report** 47: 585-588. 1998.

CULLEN, P.; HAAKE, D.; ADLER, B.. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. **FEMS Microbiology Reviews** 28(3): 291 – 318. 2004.

CULLEN, P.A.; HAAKE, D.A.; BULACH, D.M.; ZUERNER, R.L.; ADLER, B.. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. **Infection and Immunity** 71 (5): 2414 - 2421. 2003.

CULLEN, P.A.; XU, X.; MATSUNAGA, J.; SANCHEZ, Y.; KO, A.I.; HAAKE, D.; ADLER, B. . Surfaceome of *Leptospira* spp. **Infection and Immunity** 73 (8): 4853 – 4863. 2005.

DUPONT, H.; DUPONT-PERDRIZET, D.; PERIE, J.L.; ZEHNER-HANSEN, S.; JARRIGE, B.; DAIJARDIM, J.B.; Leptospirosis: prognostic factors associated with mortality. **Clinical and Infectious Disease** 25 (3): 720 – 724. 1997.

EAPEN, C.K.; SUGATHAN, S.; KURIAKOSE, M.; ABDOEL, T.; SMITS, H.L. . Evaluation of the clinical utility of rapid blood test for human leptospirosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 42: 221 – 225. 2002.

EFFLER, P.V.; BOGARD, A.K.; DOMEN, H. Y.; KATZ, A.R.; HIGA, H.Y.; SASAKI, D.M. . Evaluation of eight rapid screening tests for acute leptospirosis in Hawaii. **Journal of Clinical Microbiology** 40: 1464 – 1469. 2002.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis**, 2^a ed.. Melbourne: MediSc, 1999.

FLANNERY, B.; COSTA, D.; CARVALHO, F.P.; GUERREIRO, H.; MATSUNAGA, J.; SILVA, E.D.; FERREIRA, A.G.P.; RILEY, L.W.; REIS, M.G.; HAAKE, D.A.; KO, A.I.; Evaluation of recombinant leptospira antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology** 39 (9): 3303 – 3310. 2001.

FRIGUET, B.; CHAFFOTTE, A.F.; DJAVADI-OHANIANCE, L.; GOLDBERG, M. E.; Measurements of the true affinity constant in a solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Immunological Methods** 77: 305-319. 1985

FRIGUET, B.; DJAVADI-OHANIAN, L.; PAGES, J.; BUSSARD, A.; GOLDBERG, M. E.. A convenient enzyme-linked immunosorbent assay for testing whether monoclonal antibodies recognize the same antigenic site. Application to hybridomas specific for the α -subunit of *Escherichia coli* tryptophan synthase. **Journal of Immunological Methods** 60: 351-358. 1983.

HAAKE, D.A.; CHAO, G.; ZUERNER, R.L.; BARNETT, J.K.; BARNETT, D.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; LEVETT, P.N.; BOLIN, C. A.. The Leptospiral Major Outer Membrane Protein LipL32 is a Lipoprotein Expressed During Mammalian Infection. **Infection and Immunity** 68: 2276-2285. 2000.

HAUK, P.; NEGROTTO, S.; ROMERO, E.C.; VASCONCELLOS, S.A.; GENOVEZ, M.E.; WARD, R.J.; SCHATNER, M.; GOMÉZ, R.M.; HO, P.L.. Expression and characterization of HIX hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar copenhageni: Potentiation of hemolytic activity by LipL32. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 333:1341 – 1347. 2005.

KO, A.I.; REIS, M.G.; DOURADO, C.M.R.; JONHSON, W.D.; RILEY, L.W.; Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group **Lancet** 354: 820-825. 1999.

KOHLER, G. MILSTEIN, C.. Continuous culture of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity. **Nature** 256: 495. 1975.

LEVETT, P. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews** 14 (2): 296 – 326. 2001.

LEVETT, P.; BRANCH, S.L.. Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay methods for detection of immunoglobulin M antibodies in acute leptospirosis. **American Journal of Tropical Medical Hygiene** 66 (6): 745 – 748. 2002.

LÜDTKE, C. B.; COUTINHO, M.L.; JOUGLARD, S.D.D.; MOREIRA, C.N.; FERNANDES, C.P.H.; BROD, C.S.; HAAKE, D.A.; KO, A.I.; DELLAGOSTIN, O.A.; ALEIXO, J.A.G. Monoclonal antibodies against an outer membrane protein from pathogenic leptospira. **Brazilian Journal of Microbiology** 34 (Suppl.1). 1-4. 2003

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** 49(4): 929–945. 2003.

MATSUNAGA, J.; SANCHEZ, Y.; XU, X.; HAAKE, D.. Osmolarity, a key environmental signal controlling expression of leptospiral proteins Lig A and Lig B and the extracellular release of Lig A. **Infection and Immunity** 73 (1) 70 – 78. 2005.

MCBRIDE, A.J.A.; ATHANAZIO, D.A.; REIS, M.G.; KO, A.I.. Leptospirosis. **Current Opinions in Infectious Disease** 18: 376 – 386. 2005.

OKUDA, M.; SAKAI, Y.; MATSUUCHI, M.; OIKAWA, T.; WATANABE, M.; ITAMOTO, K.; IWATA, H.; KANO, R.; HASEGAWA, A.; ONISHI, T.; INOKUMA, H.. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of canine leptospira antibodies using recombinant OmpL1 protein. **Journal of Veterinary Medical Science** 67 (3): 249 – 254. 2005.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS; **Manual of diagnostic tests and vaccines for Terrestrial Animals**. disponível em <http://www.oie.int/>, acessado em 1/10/2005, Chapter 2.2.4. leptospirosis.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE **Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis**, Surveillance and Control. Malta, WHO Library ; 2003 (2004).

PALANIAPPAN, R.U.M.; CHANG, Y.; JUSUF, S.S.D.; ARTIUSHIN, S.; TIMONEY, J.F.; MCDONOUGH, S.P.; BARR, S.C.; DIVERS, T. J.; SIMPSON, K. W.; MCDONOUGH, P.L.; MOHAMMED, H.O.. Cloning and molecular characterization of an immunogenic Lig A protein of *Leptospira interrogans*. **Infection and Immunity** 70 (11): 5924 – 5930. 2002.

SAENGJARUK, P.; CHAICUMPA, W.; WATT, G.; BUNYARAKSYOTIN, G.; WUTHIEKANUN, V.; TAPCHAI SRI, P.; SITTINONT, C.; PANAPHUT, T.; TOMANAKAN, K.; SAKOLVAREE, Y.; CHONGSA-NGUAN, M.;

MAHAKUNKIJCHAROEN, Y.; KALAMBAHETI, T.; NAIGOWIT, P.; WAMBANGCO, M.A.L.; KURAZONO, H.; HAYASHI, H.. Diagnosis of human leptospirosis by monoclonal antibody-based antigen detection in urine. **Journal Of Clinical Microbiology**, 40 (2): 480–489 .2002.

SMITS, H.L.; EAPEN, C.K.; SUGATHAN, S.; KURIAKOSE, M.; GASEM, M.H.; YERSIN, C.; SASAKI, D.; PUJIANTO, B.; VESTERING, M.; ABDOEL, T.H.; GUSSENHOVEN, G.C.. Lateral-flow assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology** 8: 166 – 169. 2001.

SURUJBALLI, O.; ELMGREN, C.; Monoclonal antibodies suitable for incorporation into a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of specific antibodies to *Leptospira interrogans* serovar Pomona. **Veterinary Microbiology** 71: 149-159. 2000.

TAYLOR, M.J.; ELLIS, W.A.; MONTGOMERY, J.M.; YAN, K.T.; MCDOWELL, S.W.J.; MACKIE, D.P.; Magnetic immuno capture PCR assay (MIPA): detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. **Veterinary Microbiology** 56: 135-145.1997.

WERTS, C.; TAPPING, R.I.; MATHISON, J.C.; CHUANG, T.; KRAVCHENKO, V.; GIRONS, I.S.; HAAKE, D.A.; GODOWSKI, P.J.; HAYASHI, F.; OZINSKY, A.; UNDERHILL, D.M.; KIRSCHNING, C.J.; WAGNER, H.; ADEREM, A.; TOBIAS, P.S.; ULEVITCH, R.J.. **Nature Immunology** 2 (4): 346 – 352. 2001.

YAN, K.T.; ELLIS, W.A.; MACKIE, D.P.; TAYLOR, M.J.; MCDOWELL, S. W.J.; MONTGOMERY, J.M.. Development of an ELISA to detect antibodies to a protective lipopolysaccharide fraction of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo in cattle. **Veterinary Microbiology** 69: 173 -187. 1999

YI-HUI, L.; JIE, Y.; YA-FEI, M.; SHU-PING, L. . Determination of the genus-specific antigens in outer membrane proteins from the strains of *Leptospira interrogans* and *Leptospira biflexa* with different virulence. **Journal of Zhejiang University Science** 5 (4): 462 – 466. 2004.

