

SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS ESPECÍFICOS PARA ANTICORPOS ANTI *Leptospira interrogans*

Bruna Custodia Ferreira^{1*}, Anna Monteiro Correia Lima-Ribeiro², Nadia Costa Coimbra², Luiz Ricardo Goulart³, Rone Cardoso³, Fabiana de Almeida Araújo Santos³

RESUMO

Leptospira interrogans sorovar Copenhageni é o principal sorovar envolvido na leptospirose humana, nas Regiões Sudeste e Nordeste do Brasil, sendo ainda escassas as informações nas demais regiões do país. É caracterizada por ser uma doença de caráter populacional e ambiental, seu controle está intimamente ligado a medidas de prevenção, aplicadas aos animais e ao ambiente no qual os mesmos são mantidos. A pesquisa de anticorpos constitui a principal prova de diagnóstico da leptospirose, incluindo teste sorogrupos – específicos, dos quais a prova de soro aglutinação microscópica (SAM) é a mais importante e amplamente utilizada. O objetivo nesse estudo foi verificar a viabilidade do uso da técnica *Phage Display* para selecionar peptídeos similares aos epítomos de *anti Leptospira* sorovar Copenhageni para subsidiar futuramente, um novo teste de diagnóstico. Após 3 ciclos de seleção, 92 clones foram selecionados e submetidos ao seqüenciamento. Assim foram seqüenciados 57 clones que demonstraram 54 seqüências distintas. Testes ELISA foram realizados para validação dos clones reativos e 3 deles foram reativos com altas absorbâncias. A tecnologia de *Phage Display* foi capaz de demonstrar reatividade, sinalizando a mimetização de possíveis peptídeos aos epítomos da *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni.

Palavras chave: Leptospirose. Phage Display. Copenhageni

INTRODUÇÃO

No Brasil, a leptospirose é endêmica e está presente no rebanho bovino em quase todos os estados da federação. Pereira et al. (2000) relataram que *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni é o principal agente etiológico da doença em humanos, nas Regiões Sudeste e Nordeste do Brasil, sendo ainda escassas as informações nas demais regiões do país.

A técnica padronizada e recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e Ministério da Saúde no Brasil (BRASIL, 1995), estabelecida como padrão ouro no diagnóstico da leptospirose humana e animal é a Soroaglutinação Microscópica (SAM) com a utilização de antígenos vivos. No entanto, a técnica de SAM é laboriosa e complexa, o que limita seu uso, já que requer a manutenção de uma ampla gama de sorovares de *Leptospira* (antígenos vivos).

Evidencia-se a necessidade de desenvolver testes imunoquímicos mais seguros visto que o técnico manipula o antígeno *in vivo* e sensíveis e pode haver reações cruzadas com outros sorovares. Recentemente, foram produzidos diversos anticorpos monoclonais contra proteínas presentes no antígeno que poderão ser usados individualmente ou combinados, inclusive com anticorpos policlonais, no desenvolvimento dos testes (COUTINHO et al., 2007; FERNANDES et al., 2007).

¹Trabalho de iniciação científica vinculado ao CNPq desenvolvido na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

²Universidade Federal de Uberlândia - Faculdade de Medicina Veterinária.

³Universidade Federal de Uberlândia - Instituto de Genética e Bioquímica.

*Autor para correspondência: bruna_ferreira30@hotmail.com

Phage Display é uma técnica molecular a qual proteínas recombinantes ou peptídeos não pertencentes ao bacteriófago (fago) são expressos na superfície protéica deste. As seqüências de DNA de interesse são inseridas em uma determinada localização no genoma dos bacteriófagos filamentosos, de modo que a proteína codificada é expressa fusionada a uma das proteínas de superfície do fago.

Essa pesquisa teve como objetivo testar a técnica de *Phage Display*, tecnologia capaz de selecionar peptídeos ou proteínas a partir de um alvo escolhido, para selecionar peptídeos similares aos epítomos *Leptospira* sorovar Copenhageni para subsidiar futuramente, um novo teste de diagnóstico.

MATERIAL E MÉTODOS

Phage Display - A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Doenças Infecto-contagiosas da Universidade Federal de Uberlândia (LADO-UFU) e no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (INGEB-UFU). Os protocolos referidos a seguir foram sugeridos por Barbas et al. (2001).

Biopanning - Um único poço de uma placa de microtitulação de 96 poços (*Maxisorp – Nunc*) foi sensibilizado com 100 µl de anticorpo monoclonal (3 µl de anticorpo, ou seja, uma massa de 20µg para 97 µl de tampão bicarbonato 0,1 M (pH 8,6)) anti-*Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni, incubado *overnight* a 4°C em câmara úmida e adicionado 200 µl de tampão bloqueio (0.1 M NaHCO₃, pH 8.6, 5mg/ml BSA) sendo incubado por 1h a temperatura de 4°C. O sobrenadante foi retirado e armazenado. Seis lavagens foram realizadas com 250 µL de TBST (tris HCl 50 mM-pH 7,5, NaCl 150 mM – Tween 20 0,1%). Adicionou-se 4 x 10¹⁰ ufc/µL (10 µL) fagos da biblioteca Ph.D. 12 mer diluídos em 90 µL de TBST mantido sob agitação suave por 1h a temperatura ambiente. O sobrenadante foi novamente descartado da placa e armazenado. Os fagos não ligantes foram removidos pelas 10 lavagens

sucessivas com TBST (0.1% Tween-20) e foi adicionado 100 µL do tampão de eluição, (0,2 M glicina-HCl, pH 2.2, contendo 1 mg/ml BSA) mantido sob agitação por 10 minutos a temperatura ambiente e posteriormente adicionado 15 µL do tampão de neutralização (1M Tris-HCl, pH 8.0). A solução foi transferida para um microtubo e armazenada a 4°C. As alíquotas dos fagos eluídos foram utilizadas para a determinação da titulação. O eluato remanescente foi utilizado para a amplificação, feita pela infecção em *E. coli* ER2738. Esse mesmo protocolo foi realizado duas vezes seguidas como forma de selecionar e especificar o máximo possível os fagos ligantes.

Titulação - Para realizar a titulação, utilizou-se 1,0 µl do eluato diluído em 9,0 µl de meio de cultura LB. Para as diluições subseqüentes 1 µl da primeira diluição foi adicionado a 9 µL de meio LB em um novo microtubo, e assim sucessivamente até a última diluição (diluições de 10⁻⁶ a 10⁻¹².) Após as diluições preparadas, foram incubadas com 200 µl de meio LB com *E. coli* (ER2738) em fase de crescimento inicial (OD₆₀₀≤0,3). Tubos de 15,0 ml contendo, cada um, 3,0 ml de Agarose Top (210 mg de Agarose, 600mg de LB, 30 mg de MgCl₂, completado com H₂O MelliQ para volume final de 30 mL e autoclavado) foram acrescidos da solução de cada microtubo, transferidos e rapidamente colocados em placas contendo meio LB sólido, IPTG (0,5 Mm) e X-gal (40µl /ml). No momento da execução do plaqueamento, parte do protocolo da titulação, foi adicionado um substrato que promove a quebra do substrato X-Gal, e a expressão do gene da β-galactosidase dos fagos pelas bactérias ER2738, as colônias quando avaliadas no processo final são facilmente visíveis em cor azulada.

Amplificação e purificação dos fagos - Foi realizada com 90 µL do eluato anteriormente reservado na geladeira em 20 mL de cultura de *E. coli* (ER 2738) na fase inicial de crescimento (OD₆₀₀≤0,3), contendo tetraciclina, incubada sob agitação a 37°C por 4 horas e 30 minutos. Após esse período, a cultura foi transferida para tubos de acrílico (de centrifuga) e centrifugou-se

por 10 minutos a 10.000 rpm, 4°C. Descartou-se o pellet residual e o sobrenadante transferido para novos tubos e re-centrifugados. Após as centrifugações, o sobrenadante foi pipetado e transferido para um tubo de 50 ml esterilizado e adicionado 66µl, correspondente a 1/6 do volume de PEG/NaCl (20% peso/volume de Polietilenoglicol-8000, NaCl 2,5 M, água destilada) e a solução foi armazenada a 4°C *overnight*. No dia seguinte, houve nova centrifugação durante 15 minutos em 10.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e centrifugado brevemente para intensificar a remoção do sobrenadante residual. O precipitado foi ressuscitado em 1,0 ml de TBS, transferido para microtubos, e centrifugado novamente por 5 minutos, 14.000 rpm, 4°C, para sedimentar possíveis resíduos celulares. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo para adição de PEG/NaCl (1/6 do volume). O microtubo foi incubado em gelo por 1 hora e centrifugado por 10 minutos, 14.000 rpm, 4°C. O sobrenadante foi descartado e a centrifugação foi feita novamente para remoção do sobrenadante residual. O precipitado foi ressuscitado em 200 µl de TBS. O resultado final foi o eluato amplificado que foi utilizado na titulação.

Extração de DNA dos fagos - Colônias isoladas de uma placa resultante da titulação do 3º round foram transferidas para placa *deepwell* contendo 96 poços com 1000 µl de cultura de *E. coli* 2738 em fase inicial de crescimento ($OD_{600} \leq 0,3$). Sendo uma colônia por poço. A placa foi vedada com adesivo próprio e este perfurado com agulha estéril e incubada a 37°C durante 24 horas. Foi adicionado 500 µl de glicerol em cada poço para armazenamento.

Repique dos fagos em placa *Deepwell* - Para amplificar os fagos do backup para posterior validação destes, foi adicionado em placa *deepwell* autoclavada: 1000 µl de cultura de *E. coli* 2738 em fase inicial de crescimento ($OD_{600} \leq 0,3$) e 30 µl de cada clone mantendo os poços correspondentes. Vedou-se com adesivo e perfurou com agulha estéril. Foi incubado

durante 24 horas a 37°C sob agitação constante. No dia seguinte centrifugou-se a placa a 4°C, 3700 rpm durante 40 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para outra placa estéril (900 µl). Adicionou-se 150 µl de PEG/NaCl (1/6 do volume) em cada poço logo após incubou-se a 4°C *overnight*. No dia seguinte centrifugou-se novamente a 4°C, 3700 rpm durante 40 minutos. Verteu-se a placa descartando o sobrenadante e foi diluído o pellet em tampão PBS (200 µl).

Sequenciamento dos fagos - Para a reação de seqüenciamento inicialmente foi estipulada a concentração de DNA a ser utilizada, nesse caso foi 500 ng em 1,5 µl de amostra. A concentração do primer foi usualmente 5 pmol e utiliza-se 4 µl de premix. O volume final da reação foi de 10 µl. Essa reação foi para o termociclador que realiza 35 ciclos repetidamente durante 20 segundos a 95°C que desnatura a fita de DNA, após a 50°C para que o primer se ligue nas fitas de DNA e por fim a 60°C onde a termosequenase, que é uma polimerase introduz os nucleotídeos marcados continuando o primer. Então, foi obtida uma fita dupla. Para a reação de precipitação, adicionou-se a cada *deepwell* 1 µl de acetato de amônia e bateu a placa para que as gotas entrassem em contato com a reação. Acrescentou-se 27,5 µl de etanol absoluto (100%). Centrifugou-se por 45 min, 3700 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e secou em papel absorvente. Foi acrescentado 150 µl de etanol 70%. Centrifugou-se por 15 minutos a 3700 rpm, 4°C. O sobrenadante foi descartado e centrifugado novamente invertida sobre papel absorvente 800 rpm, 1 segundo. A placa foi seca por 10 minutos protegida da luz. Adicionou-se 10 µl de "loading buffer" em cada poço da *deepwell*. A placa foi embrulhada e agitada em vortex por 10 minutos. Foi mantida a 4°C até o momento da corrida. O seqüenciamento foi realizado utilizando o kit DYEnamic™ ET dye termination (GE Healthcare, USA) e um seqüenciador automático MegaBace 1000 (Amersham Biosciences). Para a reação do seqüenciamento, foram utilizados os primers

M13	(5'-
HOCCCTCATAGTTAGCGTAACG	-3'-

invitrogen), f88-4/15-mer (5'-HOAGAAGTCCGAAGACGATGA - 3' - Invitrogen) e fUSE5/6-mer (5'-HOGGAGTATGTCTTTTAAGT-3' - Invitrogen) que amplificam a região do DNA do fago correspondente aos insertos dos aminoácidos codificantes dos peptídeos randômicos fusionados na proteína PIII. A análise das seqüências de DNA provenientes do seqüenciador automático foi processada em software do próprio equipamento (Sequence Analyser, Base Caller, Cimarron 3.12, Phred 15). A tradução das seqüências de bases nitrogenadas obtidas foi feita pelo software EMBOSS Transeq, através do link: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/transeq>

Quantificação dos fagos utilizados - Inicialmente para a realização do teste de ELISA os fagos selecionados foram quantificados no espectrofotômetro (*Nano drop*) em duas absorvâncias diferentes, 269 e 320 nanômetros. A diluição foi realizada foi 2 µl de fago para 998 µl de água destilada. Aplicando na fórmula:

$$\frac{(\lambda_1 - \lambda_2) \times 6 \times 10^{16}}{7222} = \text{N}^\circ \text{ de partículas por } \mu\text{l}$$

Onde: λ_1 = Leitura de 269 nanômetros

λ_2 = Leitura de 320 nanômetros

Com essa leitura realizada, foi possível determinar a quantidade de entrada de cada fago a ser testado.

ELISA - Como testes de validação dos clones seqüenciados foram realizados ELISAs seguindo o protocolo de Ribeiro (2009) adaptado. Para a validação com anticorpo monoclonal – Fagos - A placa (*Maxisorp – Nunc*) foi sensibilizada com 50 µl/ poço da solução de 16,87 µl do estoque de anticorpo anti-*Leptospira Copenhageni* + 5483,13 µl de tampão bicarbonato *overnight* em câmara úmida a 4°C. No dia seguinte, foram realizadas três lavagens com PBST, adicionado 300 µl de tampão bloqueio (PBST-M) e incubado por 1 hora a 37°C e em seguida lavada seis vezes. Após as lavagens os fagos foram adicionados, sendo a placa novamente incubada por uma hora a 37°C. Seis novas lavagens

realizadas com PBST e foi adicionado o anticorpo secundário Anti M13 na diluição 1:5000 em PBST-M, (50µl/poço) com nova incubação a 37°C durante uma hora. Mais três lavagens foram feitas e revelou-se a reação usando OPD, em um volume final de 50 µl de tampão contendo H₂O₂ e interrompida pela adição de H₂SO₄ 4M (20 µl/poço). A leitura foi realizada pelo leitor de ELISA para posterior análise. Os melhores fagos foram selecionados para a validação com pool de soros. Padronização com Fagos - Pool de soro - Foi realizado um novo ELISA para padronização de diluição do ELISA definitivo com soros individuais. Amostras de soro bovino foram utilizadas, sendo dez amostras de soro positivos e dez soro negativas, para execução de um pool positivo e um pool negativo. Foram testadas quatro diluições: 1:25, 1:50, 1:100 e 1:200. A sensibilização foi feita com fagos na concentração 10¹¹. E os cálculos foram baseados nas quantificações no espectrofotômetro (*Nano drop*). O protocolo restante segue as mesmas ações do ELISA anterior. Validação com amostras de soro individual - Como validação confirmatória definitiva, um novo ELISA foi realizado com soros individuais em triplicata. A sensibilização foi feita com fagos previamente quantificados na concentração 10¹¹. Adicionou-se 50 µl/ poço na placa e a mesma foi incubada em câmara úmida a 4°C O protocolo restante segue as mesmas ações do ELISA anterior.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Biopanning - A cada *round* a especificidade dos clones ao alvo (anticorpo monoclonal) aumentou, pois a cada ciclo repetido em menores titulações foram obtidos quantidades esperadas de colônias. As titulações ao final de cada *round* resultaram maior concentração de fagos. Devido a isto, a titulação foi efetuada com um número de diluições maior, até 10¹². As titulações de eluatos não-amplificados, por não terem sido submetidas a um processo de amplificação, têm somente o número de bacteriófagos selecionados após as três etapas de exposição ao anticorpo, sendo então a diluição feita somente até 10⁷. A

titulação do 3° round, eluato amplificado, não foi efetuada já que a mesma seria realizada somente para saber qual o volume ideal de entrada do próximo round. O UFC obtido na titulação do eluato amplificado do 2° round foi maior do que o eluato amplificado do 1° round. A quantificação foi realizada pela contagem em placa que alcançou aproximadamente 100 colônias para o cálculo da entrada e saída da quantidade de clones nos rounds seguintes.

Sequenciamento - Após análise realizada pelo software EMBOSS Transeq, foram obtidos 57 clones viáveis, sendo identificados como possíveis mimetopos para *Leptospira* serovar Copenhageni. Foi necessária a realização de testes para validação desses peptídeos encontrados.

ELISA - O teste para validação dos clones com o anticorpo monoclonal foi satisfatório, de 57 fagos selecionados, sete foram intensamente reativos demonstrando que os repetidos ciclos de seleção selecionaram possíveis peptídeos específicos. Os clones já seqüenciados A3, A6, A7, B5, C1, D1 e F3 reagiram demonstrando alta afinidade do anticorpo monoclonal com os fagos selecionados pelo *biopanning*. Um novo teste foi realizado apenas com os três fagos mais reativos: A3, A7, e F3, onde estes, devido à intensa reação no teste anterior, supõem-se que foram os ligantes mais reativos para fazer uma padronização de entrada de amostras de soro bovino individuais que seriam o próximo passo da validação. Como demonstrado no gráfico abaixo, a melhor diluição a ser utilizada foi a 1:100 que teve um valor alto de fago selvagem mais teve a menor reatividade com o pool negativo. O teste de validação com amostras individuais de soro foi realizado, porém uma boa resposta não foi obtida do teste. Não houve reação alguma e algumas hipóteses são relevadas para essa falha: As amostras sororreagentes obtidas para execução do teste não tinham altos títulos, visto que a introdução desse serovar no país e na região é recente para bovinos

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Phage Display é uma técnica importante na sinalização de possíveis peptídeos miméticos aos epítomos da *anti Leptospira*. Apesar de sete fagos reagirem bem com o anticorpo monoclonal os mesmos não reagiram com amostras de soro obtidas de animais reagentes, indicando a necessidade de maiores estudos para utilização desta técnica para o serovar Copenhageni.

ABSTRACT

Leptospira interrogans serovar Copenhageni is the main serovar involved in the leptospirosis human, in the Southeast Regions and Northeast of Brazil, being still scarce the information in the too regions of the country. It is characterized by be an illness of his, environmental and population character control is intimate linked in proportion to prevention, applied to the animals and to the environment in which they are maintained. To research of antibodies I constituted to main test of diagnosis of the leptospirosis, including test serogroups – specific, of the which the microscopic amalgamation serum test (BE) is to more important and broadly utilized. The objective in that study was verify the feasibility of the use of the technical one Phage Display for select similar peptides to the epítomos of anti *Leptospira* serovar Copenhageni for subsidize future, a new test of diagnosis. After 3 cycles of selection, 92 clones were selected and submitted to the sequencing. So were sequenced 57 clones that showed 54 distinct sequences. ELISA tests were performed to validate the reactive clones and three of them were reactive with high absorbance. Phage display technology was able to demonstrate reactivity, signaling the possible peptides mimicking the epitopes of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni.

Keywords: Leptospirosis. Phage Display. Copenhageni

REFERÊNCIAS

BARBAS, C. F.; BURTON, D. R.; SCOTT, J. K.; SILVERMAN, G. J. ***Phage Display: a***

laboratory manual. 1. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

BRASIL. Manual de Leptospirose. **Ministério da Saúde.** Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. Programa Nacional de Leptospirose. 2ª ed. rev. Brasília: Fundação Nacional de Saúde. 98 p. 1995.

COUTINHO, M. L.; VASCONCELOS, F. A.; FERNANDES, C. P. H.; SEYFFERT, N.; SEIXAS, F. K.; KO, A. I.; DELLAGOSTIN, O. A.; ALEIXO, A. G. Evaluation of the anti-LipL32 monoclonal antibodies potential for use in leptospirosis immunodiagnostic tests. **Journal of Immunoassay & Immunochemistry**, Monticello, v. 28, n. 3, p.279 -288, 2007.

FERNANDES, C. P. H.; SEIXAS, F. K.; COUTINHO, M. L.; VASCONCELLOS, F. A.; SEYFFERT, N.; CRODA, J.; MCBRIDE, A. J.; KO, A. I.; DELLAGOSTIN, O. A.; ALEIXO, J. A. Monoclonal Antibodies against LipL32, the Major Outer Membrane Protein of Pathogenic *Leptospira*: Production, Characterization, and Testing in Diagnostic Applications. **Hybridoma**, New Rochelle, v. 26, n. 1, p. 35-41, 2007.

PEREIRA, M. M.; MATSUO, G. S.; BAUAB, A. R.; VASCONCELOS, S. A.; MORAES, Z. M.; BARANTON, G.; SAINT GIRONS, I. Clonal subpopulation of *Leptospira interrogans sensu stricto* is the major cause of leptospirosis outbreaks in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 1, p. 450-452, 2000.

RIBEIRO, V. S. **Identificação de Peptídeos Sintéticos Ligantes à Imunoglobulinas G de Pacientes com Neurocisticercose por Phage Display.** Dissertação (Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicada). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.