

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Agrícola



Dissertação

§

Anticorpos monoclonais contra as proteínas LigA e
LigB de leptospiras patogênicas: produção e
caracterização

Núbia Seyffert

Pelotas, 2007

NÚBIA SEYFFERT

**Anticorpos monoclonais contra as proteínas LigA e LigB
de leptospiros patogênicos: produção e caracterização**

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 de conhecimento: Imunologia Aplicada).

Orientador: José Antônio Guimarães Aleixo

Pelotas, 2007

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

S519a Seyffert, Núbia

Anticorpos monoclonais contra as proteínas LigA e LigB de leptospiros patogênicas: produção e caracterização / Núbia Seyffert ; orientador José Antônio Guimarães Aleixo. – Pelotas, 2007. – 54f. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2007.

1.Biotecnologia. 2.Leptospirose. 3.Proteínas de superfície.
4.ELISA. 5.Imuno-histoquímica. I.Aleixo, José Antônio
Guimarães. II.Título.

CDD: 614.56

Banca examinadora:

Prof^a Dr^a Josiane Bonel Raposo, Universidade Federal de Pelotas

Prof^a Dr^a Sandra Denise Jougard, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Fabio Leivas Leite, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Jose Antônio Guimarães Aleixo, Universidade Federal de Pelotas

A Deus

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha vida, amor, saúde, conforto, paz e proteção.

Aos meus pais pelos conselhos, cuidados e carinho em todos os momentos.

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realização do curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor José Antônio Guimarães Aleixo por sua orientação e confiança dispensadas na execução deste trabalho.

Aos amigos, colegas, estagiários e colaboradores do Centro de Biotecnologia Cláudia H. P. Fernandes, Flávia A. Vasconcellos, Fabiana K. Seixas, Éverton F. da Silva, Tessália Luerce, Carina Moraes, Natália Camacho, Ângela Moreira, Josiane B. Raposo, Bel, Vanusa P. da Hora, Mariana L. Coutinho, Gustavo Cerqueira, Luana Dummer, Leonardo G. Monte, Gabriela e Michele pela amizade, carinho, incentivo e auxílio na realização dos experimentos.

E a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

RESUMO

SEYFFERT, Núbia. **Anticorpos monoclonais contra as proteínas LigA e LigB de leptospiros patogênicas: produção e caracterização**. 2007. 54f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

As proteínas *leptospiral immunoglobulin-like* (Lig) estão expostas na superfície da membrana das leptospiros patogênicas e podem estar envolvidas no ataque e penetração às células do hospedeiro durante a infecção. Recentemente, foi identificado um par de Ligs, nomeadas LigA e LigB, com regiões polipeptídicas idênticas e não-idênticas. As duas proteínas estimulam uma resposta humoral forte durante a infecção aguda no hospedeiro e têm sido sugeridas como alvos para o desenvolvimento de vacinas e testes diagnósticos para leptospirose. Este estudo relata a produção e caracterização de anticorpos monoclonais (Mabs) contra fragmentos recombinantes não idênticos de LigA (rLigANI) e LigB (rLigBNI). Os fragmentos recombinantes foram utilizados para a imunização dos camundongos e triagem dos hibridomas por ELISA indireto. Quatro Mabs obtidos contra rLigANI e 6 Mabs contra rLigBNI foram isotipados e avaliados quanto ao seu potencial para uso em estudos de imunoproteção e desenvolvimento de testes diagnósticos. Os Mabs foram dos isotipos IgM (1), IgG_{2b} (3) and IgG₁ (6) e reagiram com as proteínas nativas de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa L1 130 em ELISA indireto e imunofluorescência. A constante de afinidade dos Mabs manteve-se entre $4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ and $2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, e o mapeamento de epitopos por ELISA de aditividade demonstrou que cada Mab reage com o mesmo epitopo na molécula recombinante ou causa um impedimento espacial (*steric hindrance*). Finalmente, os Mabs reagiram positivamente em testes imuno-histoquímicos de seções do tecido renal de hamsters experimentalmente infectados com leptospiros. Esses dados sugerem que os Mabs obtidos podem ser usados para estudos de imunoproteção e desenvolvimento de testes de diagnóstico de leptospirose.

Palavras-chaves: leptospirose, proteínas de superfície, ELISA, imuno-histoquímica.

ABSTRACT

SEYFFERT, Núbia. **Monoclonal antibodies against LigANI and LigBNI of pathogenic leptospires: production and characterization.** 2007. 54f. Dissertation (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

Leptospiral immunoglobulin-like (Lig) proteins are exposed on membrane surface of pathogenic *Leptospira* and may play a role in host cell attachment and invasion during infection. A pair of Ligs, named LigA and LigB, with identical and non-identical polypeptide regions has recently been identified. The two proteins elicit a strong humoral immune response during acute host infection and have been suggested as targets for development of vaccines and diagnostic tests for leptospirosis. This study reports the production and characterization of monoclonal antibodies (Mabs) against recombinant non-identical fragments of LigA (rLigANI) and LigB (rLigBNI). The recombinant fragments were used for mice immunization and screening hybridomas by indirect ELISA. Four Mabs obtained against rLigANI and six Mabs obtained against rLigBNI were isotyped and evaluated regarding their potential for use in studies of immunoprotection and diagnostic test development. The Mabs were of the IgM (1), IgG_{2b} (3) and IgG₁ (6) isotypes and reacted with the native proteins from a pathogenic strain of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni L1 130 in an indirect ELISA and immunofluorescence. Mabs affinity constants felt between $4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ and $2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, and epitope mapping by additive ELISA has shown that each Mab either react with the same epitope in the recombinant molecule or cause steric hindrance. Tissue sections from kidneys of hamsters experimentally infected with leptospires and probed with the Mabs reacted positively by immunohistochemistry. These findings suggest that the Mabs obtained can be useful for the studies of immunoprotection and development of diagnostic tests.

Key words: leptospirosis, outer membrane proteins, ELISA, immunohistochemistry.

Lista de Figuras

Figura 1-	Western blot com os Mabs anti-LigA e proteína recombinante.....	36
Figura 2-	Western blot com os Mabs anti-LigB e proteína recombinante.....	36
Figura 3 -	Imunofluorescência indireta do Mab LigANI1 com leptospiras fixadas com metanol.....	37
Figura 4-	Imunofluorescência indireta do Mab LigBNI5 com leptospiras fixadas com metanol.....	38
Figura 5-	Lesões causadas pelas leptospiras no tecido renal de hamsters infectados.....	39
Figura 6-	Imuno-histoquímica em tecido renal de hamsters experimentalmente infectados utilizando os Mabs LigANI2 e LigBNI2.....	41

Lista de Tabelas

Tabela 1-	Caracterização isotópica dos Mabs anti-LigA e anti-LigB através de ELISA indireto.....	31
Tabela 2-	Índice de aditividade (%) dos Mabs anti-LigA com a proteína recombinante como antígeno.....	32
Tabela 3-	Índice de aditividade (%) dos Mabs anti-LigB com a proteína recombinante como antígeno.....	32
Tabela 4-	Índice de aditividade (%) dos Mabs anti-LigA com a proteína nativa <i>L. interrogans</i> L1 130.....	33
Tabela 5-	Índice de aditividade (%) dos Mabs anti-LigB com a proteína nativa <i>L. interrogans</i> L1 130.....	33
Tabela 6-	Índice de aditividade (%) dos Mabs anti-LigA combinados com Mabs anti-LigB com a proteína nativa <i>L. interrogans</i> L1 130 como antígeno.....	34
Tabela 7-	Constante de afinidade dos anticorpos monoclonais anti-LigA determinadas com o antígeno recombinante.....	34
Tabela 8-	Constante de afinidade dos anticorpos monoclonais anti-LigB determinadas com o antígeno recombinante.....	34
Tabela 9-	Reatividade dos Mabs anti-LigA e anti-LigB com <i>L. interrogans</i> L1 130 intactas e inativadas pelo calor em ELISA indireto.....	35
Tabela 10-	Intensidade das reações imuno-histoquímicas dos Mabs anti-LigA e anti-LigB em tecido renal de hamsters experimentalmente infectados com leptospiros.....	39

Lista de símbolos e abreviações

Lig	<i>Leptospiral Immunoglobulin-like</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
mL	mililitro(s)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
µg	micrograma(s)
µl	microlitro(s)
°C	grau(s) Cécius
ELISA	<i>Enzyme-linked immunossorbent assay</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
MI	Meio Incompleto
MC	Meio Completo
HAT	<i>Hypoxanthine Aminopterin Thymidine</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
IHQ	Imuno-histoquímica
nm	nanômetros
UV	ultravioleta
M	molar
min	minutos
h	hora
mg	miligramas
cm ²	centímetros quadrados
g	força da gravidade
NI	não idêntico
SDS	dodecil-sulfato de sódio
PVDF	difluoreto de polivinilideno
V	volts
mA	miliampere
BSA	albumina sérica bovina
DNA	ácido desoxirribonucléico
mM	milimolar
kDa	kilodalton

SUMÁRIO

Anticorpos monoclonais contra as proteínas LigANI e LigBNI de leptospiiras patogênicas: produção e caracterização.....	1
AGRADECIMENTOS.....	5
RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Importância da leptospirose e epidemiologia.....	13
1.2 Patogênese e manifestações clínicas.....	14
1.3 Vacinas e diagnóstico laboratorial.....	16
1.4 Proteínas Lig.....	17
1.5 Anticorpos monoclonais.....	19
2 OBJETIVO GERAL.....	21
2.1 Objetivos específicos.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Clonagem e expressão das proteínas Lig.....	22
3.2 Cultivo das leptospiiras.....	22
3.3 Produção de Anticorpos monoclonais.....	22
3.3.1 Imunização dos camundongos.....	22
3.3.2 Preparação das células de mieloma.....	23
3.3.3 Fusão celular.....	23
3.3.4 Triagem dos hibridomas e clonagem celular.....	24
3.3.5 Estocagem dos hibridomas.....	24
3.3.6 Produção de ascite e purificação.....	24
3.4 Caracterização dos Mabs.....	25
3.4.1 Isotipagem.....	25
3.4.2 Índice de aditividade.....	26
3.4.3 Constante de afinidade.....	26
3.4.4 ELISA com a proteína nativa <i>L. interrogans</i> L1 130.....	27
3.4.5 Western blot com as proteínas recombinantes e nativas.....	28
3.4.6 Imunofluorescência Indireta.....	28
3.4.7 Imuno-histoquímica.....	29

4 RESULTADOS	31
4.1 Produção dos Mabs	31
4.2 Caracterização dos Mabs	31
4.2.1 Classificação em isotipos	31
4.2.2 Avaliação da aditividade dos Mabs	31
4.2.3 Afinidade dos Mabs pelos antígenos	34
4.2.4 ELISA indireto com a proteína nativa <i>L. interrogans</i> L1 130	35
4.2.5 Western blot com as proteínas recombinantes e nativas	35
4.2.6 Reconhecimento das Ligs em leptospiros fixadas com metanol	37
4.2.7 Reconhecimento das Ligs em tecido renal de hamsters	38
5 DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÕES	47
7. REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

1.1 Importância da leptospirose e epidemiologia

A leptospirose é uma doença infecciosa endêmica causada por espécies patogênicas de bactérias do gênero *Leptospira*, que afeta humanos e animais e constitui um sério problema de saúde pública (WHO, 2003). As condições precárias de saneamento básico associadas à elevada intensidade das chuvas, principalmente em países tropicais, têm contribuído para o aumento da incidência da enfermidade tanto nos centros urbanos (KO et al., 1999) como no meio rural (BHARTI et al., 2003).

No Brasil a leptospirose é uma zoonose muito importante, pois apresenta uma alta prevalência em várias regiões do país. No período de 2004 a 2006 foram notificados 39.494 casos de leptospirose no país, sendo que 10.341 foram confirmados e a taxa de letalidade foi de 11% (SINAN, 2007).

A enfermidade também pode estar relacionada a perdas econômicas na pecuária, devido a abortos, baixa na produção de leite, mamites e infecções inaparentes que comprometem a eficiência reprodutiva dos animais (BHARTI et al., 2003; FAINE et al., 1999).

Na epidemiologia da leptospirose, a fonte de infecção mais comum é representada pelos mamíferos que produzem uma leptospiúria de longa duração. O rato de esgoto *Rattus norvegicus* é considerado o principal reservatório do agente, tendo por característica a urina alcalina, que é propícia à sobrevivência das leptospiros. É provável que todas as espécies de roedores, marsupiais e mamíferos sejam os principais portadores e excretadores de leptospiros. Entretanto, há relatos do isolamento do agente de anfíbios, répteis, aves, peixes e invertebrados em diversos locais do mundo (BINDER, 1998).

A excreção da bactéria ocorre por um período variável, podendo persistir por toda a vida do hospedeiro (LEONARD; QUINN; ELLIS, 1992); neste caso a bactéria mantém com o hospedeiro uma relação simbiótica e permanece nos túbulos renais sem danificar os rins (BINDER, 1998). A sobrevivência da *Leptospira* no meio ambiente depende das condições encontradas fora do organismo do hospedeiro (LEVETT, 2001).

O agente da enfermidade é transmitido aos organismos susceptíveis através da urina infectada de diversas espécies animais (CDC, 2003), ou pelo contato com o ambiente contaminado com leptospiros viáveis. O homem se infecta principalmente através da água e do solo contaminados. (CORRÊA, 1987; ACHA; SZYFRES, 1986).

A prevalência de determinados sorovares leptospirais em uma localidade pode estar relacionada com os tipos de reservatórios animais existentes, assim como com as condições do ambiente e práticas ocupacionais. Dentre os profissionais com risco potencial de se contaminarem encontram-se mineiros, pescadores, médicos veterinários, técnicos de laboratório, trabalhadores de esgoto, magarefes e agricultores (BHARTI et al., 2003).

Uma mesma espécie animal pode hospedar diferentes sorovares dependendo da região geográfica em que se encontra. A biodiversidade das leptospiros pode ser influenciada pelas variações climáticas, interações bióticas e atividades antropogênicas (VINETZ et al., 1996). As atividades culturais e comportamentais associadas à miséria e às condições de sobrevivência podem contribuir na disseminação da doença.

1.2 Patogênese e manifestações clínicas

A patogênese da *Leptospira* ocorre a partir da penetração ativa através da pele lesionada ou intacta quando o hospedeiro permanece na água contaminada durante um período de tempo longo (BHARADWAJ, 2004).

Após ter superado os mecanismos de defesa não-específicos, as leptospiros se multiplicam no sangue, na linfa, no fluido cérebro espinhal e em todos os tecidos, constituindo a fase aguda da doença que cursa com leptospiremia (FAINE et al., 1999).

Na lesão primária as leptospiros danificam as membranas das células endoteliais de pequenos vasos sanguíneos pela ação dos fatores de virulência, ocorrendo o rompimento dos capilares e a migração das bactérias para os espaços extravasculares. As lesões preliminares são atribuídas à ação mecânica dos microrganismos dentro da parede dos vasos sanguíneos e são seguidas por hemorragias (BAROCCHI et al., 2002).

Provavelmente, os mecanismos de patogenicidade mais importantes sejam a adesão (BAROCCHI et al., 2002) e a toxicidade (DORIGATTI et al., 2005). Os efeitos secundários da isquemia, anóxia e aumento da pressão nos tecidos, reforçam os danos e resultam na perda da função e morte celular (FAINE et al., 1999). Contudo, o entendimento sobre o mecanismo de patogenicidade da leptospirose ainda é limitado. Os efeitos do patógeno no organismo podem ser determinados geneticamente de acordo com a resposta imune do hospedeiro, permanecendo assim indefinidos (LEVETT, 2001; LINGAPPA et al., 2004).

A fase crônica da infecção é caracterizada pela presença de anticorpos e de leptospirúria (WHO, 2003). Neste momento a colonização renal é observada, principalmente dentro dos túbulos contorcidos proximais, onde os microrganismos podem sobreviver (FAINE et al., 1999; BHARTI et al., 2003).

Os fatores de virulência das leptospiplas têm sido estudados para um melhor entendimento dos mecanismos de ação dessas bactérias no hospedeiro, como também a resposta imune contra esses patógenos (CULLEN; HAAKE; ADLER, 2003; KLIMPEL; MATTHIAS; VINETZ, 2003; VIRIYAKOSOL et al., 2006; VERMA et al., 2006).

Um importante foco desse estudo inclui a identificação das proteínas da membrana externa (OMPs) envolvidas na patogênese da leptospirose (HAAKE, 2000). Devido a sua localização sobre a superfície celular, as OMPs leptospirais são relevantes para o entendimento das interações hospedeiro-patógeno. A maior classe de OMPs é composta pelas lipoproteínas LipL32, LipL21, LipL36, LipL45 e LipL41 (CULLEN; HAAKE; ADLER, 2003). A LipL32 é a proteína mais abundante em leptospiplas patogênicas e a mais reconhecida pelo soro de pacientes com leptospirose (HAAKE et al., 2000). As proteínas LipL41 e LipL21, assim como a LipL32, são expressas tanto *in vivo* com *in vitro*, e somente são detectadas em sorovares patogênicos (CULLEN; HAAKE; ADLER, 2003).

Os sinais clínicos apresentados pelo hospedeiro infectado dependem da área afetada e da extensão das lesões causadas pela disseminação das leptospiplas (FAINE et al., 1999; NALLY et al., 2006).

No início da enfermidade, normalmente observam-se febre, dores de cabeça e articulares, dor na panturrilha, vômitos e sintomas de um resfriado, podendo ser facilmente confundida com outras enfermidades como gripe e dengue (WHO, 2003).

Algumas pessoas com leptospirose podem evoluir para um quadro severo que é chamado de Doença de Weil, caracterizada pelo comprometimento renal, hepático, icterícia e hemorragias cutâneas e de mucosas, podendo ocorrer meningite e também comprometimento funcional de outros órgãos (WHO, 2003). Outra forma grave de leptospirose, a Síndrome Hemorrágica Pulmonar Severa (SPHS) pode causar insuficiência respiratória e arritmias podendo levar o indivíduo à morte em mais de 50% dos casos (SEIJO et al., 2002; SILVA et al., 2002; NALLY et al., 2006).

Devido a variedade de sintomas e a severidade da doença em estágio avançado, o diagnóstico precoce da leptospirose é essencial para um tratamento eficiente que previna a evolução da enfermidade para um quadro severo.

1.3 Vacinas e diagnóstico laboratorial

Atualmente não existe uma vacina contra a leptospirose humana recomendada pela Organização Mundial da Saúde. Porém, vários estudos têm sido realizados para avaliar o potencial imunogênico de vacinas em alguns países como Cuba, Rússia e China (MARTINEZ et al., 2000; IKOEV et al., 1999; ZHUO; WANG; LAN, 1995).

As vacinas veterinárias contra a leptospirose disponíveis no mercado são as chamadas bacterinas, que conferem imunidade pouco duradoura e são sorovar-específicas. Além da necessidade de repetição da dose vacinal para manter a imunidade, o fato de ser produzida apenas com um sorovar ou um conjunto restrito de sorovares limita a proteção dos animais quando aplicada, já que as espécies de leptospiros incluem cerca de 250 sorovares patogênicos (GAMBERINI et al., 2005).

O diagnóstico laboratorial de leptospirose humana depende da fase evolutiva da doença e baseia-se na detecção do microrganismo em amostras clínicas ou em uma quadruplicação ou aumento no título de anticorpos no teste de soroaglutinação microscópica (MAT) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1995). Porém, o isolamento do microrganismo em meio de cultura é demorado, assim o diagnóstico laboratorial da leptospirose tem sido baseado principalmente em testes sorológicos.

Embora o MAT seja recomendado pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico sorológico da leptospirose, apresenta uma série de problemas. Por um lado, o teste é complexo e requer a manutenção de grande número de

microrganismos em meio de cultura para garantir uma variedade antigênica dos diferentes sorogrupos de *Leptospira*. Por outro lado, apresenta reações cruzadas entre diferentes sorovares e baixa sensibilidade na fase inicial da doença, já que os níveis de anticorpos somente são detectáveis 6-7 dias após aparecerem os sintomas.

Para obter uma melhora no diagnóstico laboratorial diversos testes sorológicos como ELISA, Dipstick, Immunoblot e Dot-ELISA foram desenvolvidos com algumas modificações (YAN et al., 1999; GUSSENHOVEN et al., 1997; LEVETT; BRANCH, 2002; PETCHCLAI; HIRANRAS; POTHAN, 1991; RIBEIRO; SOUZA; ALMEIDA, 1995; SILVA et al., 1997; EFLER et al., 2002), mas a maioria deles são sorovar-específicos.

Com o estudo das OMPs de leptospiros patogênicas, tem surgido uma nova perspectiva de melhora no diagnóstico laboratorial da leptospirose. Os antígenos recombinantes LipL32, LipL41, OmpL1 de *Leptospira* foram testados em ELISA (BOMFIM; KO; KOURY, 2005; MARIYA et al., 2006; OKUDA et al., 2005; FLANNERY et al., 2001) a fim de observar a acurácia desses ensaios. Mais recentemente, um teste diagnóstico denominado ELISA Cinético foi desenvolvido não somente para detectar a infecção por leptospiros, mas também diferenciar animais infectados de animais vacinados através da utilização de proteínas similares às imunoglobulinas (Ligs) existentes na superfície bacteriana (PALANIAPPAN et al., 2004).

O teste diagnóstico eficiente para a leptospirose deveria ter sensibilidade e especificidade necessárias para detectar leptospiros circulantes ou anticorpos da classe IgM que caracterizam infecção recente, o que proporcionaria a confirmação da doença.

1.4 Proteínas Lig

Uma família de proteínas com estrutura similar às adesinas bacterianas foi recentemente identificada e pode ter um papel importante na patogênese das leptospiros. Essas proteínas têm domínios repetidos em *tandem* semelhantes às imunoglobulinas e, por isso, foram denominadas Lig (*leptospiral immunoglobulin-like*) (CULLEN; HAAKE; ADLER, 2003).

As proteínas LigA e LigB estão expostas na superfície bacteriana e a expressão delas está correlacionada com a virulência das cepas de *Leptospira* (MATSUNAGA et al., 2003). Essas proteínas de superfície possivelmente mediam a interação das leptospiros com as células do hospedeiro (MATSUNAGA et al., 2003), um papel análogo ao da intimina e da invasina existente em outras bactérias (LUO et al., 2000; HAMBURGER et al., 1999). Por exemplo, foi demonstrado que as proteínas Lig são responsáveis pela capacidade de penetração, disseminação, persistência e translocação das leptospiros nos tecidos dos hospedeiros (MATSUNAGA et al., 2003; BAROCCHI et al., 2002).

Além disso, foi também demonstrado que as proteínas Lig são osmoreguladas e expressas no hospedeiro principalmente na fase aguda da enfermidade, onde parecem ser reguladas positivamente. Em meio de cultivo, as proteínas Lig não são expressas com êxito pelas leptospiros, devido ao baixo nível de expressão ou instabilidade protéica (PALANIAPPAN et al., 2002; MATSUNAGA et al., 2005).

O conhecimento sobre a conservação dos genes *lig* nas diferentes espécies de leptospiros constitui uma ferramenta importante para dar continuidade a estudos envolvendo elaboração de vacinas e testes diagnósticos. Recentemente, um estudo demonstrou que o gene *ligA* está presente somente nas espécies *L. interrogans* e *L. kirschneri*, enquanto que o gene *ligB* é conservado em todas as espécies de leptospiros patogênicas (CERQUEIRA, 2006).

As proteínas Lig foram avaliadas quanto ao seu potencial de proteção no desafio em camundongos e hamsters, tendo a proteína LigA demonstrado eficiente proteção (KOIZUMI; WATANABE, 2004; PALANIAPPAN et al., 2006). No diagnóstico, foi desenvolvido um teste ELISA Cinético utilizando as proteínas Lig para diferenciar animais vacinados de animais infectados, já que os testes ELISA e MAT convencionais não possuem essa característica (PALANIAPPAN et al., 2004); também a amplificação dos genes *lig* por PCR convencional e *real-time* foi utilizada para a detecção de leptospiros patogênicos em estágio inicial da infecção (PALANIAPPAN et al., 2005).

1.5 Anticorpos monoclonais

Em 1975, Georges Köhler e Cesar Milstein conseguiram obter uma célula híbrida tumoral (hibridoma), originária da fusão de um linfócito B normal com uma célula proveniente de um mieloma múltiplo (KÖHLER; MILSTEIN, 1975). A célula híbrida apresentava o caráter imortal da célula mielomatosa e a capacidade de secretar anticorpos com a mesma especificidade daqueles secretados pelo linfócito B normal. O hibridoma constitui-se em uma fonte duradoura de anticorpos monoclonais (CAMPBELL, 1991; PASQUALINI; ARAP, 2004).

Desde então, várias aplicações para esses anticorpos têm sido descritas em pesquisas biomédicas, na detecção de proteínas para o uso em vacinas recombinantes e tratamento de doenças infecciosas e cancerígenas. Por reconhecerem determinantes antigênicos únicos, os anticorpos monoclonais (Mabs) são amplamente utilizados no desenvolvimento de testes diagnósticos específicos (BERRY, 2005; CAMPBELL, 1991).

Os Mabs possuem diversas vantagens comparando com os anticorpos policlonais por serem produzidos por clones híbridos derivados de células progenitoras linfóides únicas, secretando anticorpos homogêneos. A produção e seleção dos hibridomas podem ser controladas para se obter especificidade, afinidade e funções efectoras desejadas. Além disso, esse método de produção apresenta enorme reprodutibilidade não somente em meio de cultivo, mas também no fluido extraído das ascites que proporciona uma quantidade ilimitada de anticorpos específicos. O congelamento e descongelamento dos hibridomas também podem ser realizados sem a alteração de suas propriedades de acordo com a necessidade de uso (CAMPBELL, 1991).

Apesar de os hibridomas terem sido a fonte de Mabs específicos durante anos, essa produção envolve uma série de fatores limitantes por ser um processo trabalhoso, com múltiplas etapas, risco de contaminação, geneticamente instável e requer células alimentadoras (PASQUALINI; ARAP, 2004). Na tentativa de solucionar esses inconvenientes, outras tecnologias para a geração de Mabs *in vitro* foram desenvolvidas nos últimos 30 anos (WINTER et al., 1994; PETERSON, 2005), porém a metodologia convencional ainda é a mais empregada.

Em estudos envolvendo leptospirose, Mabs já foram utilizados na identificação de sorovares (TERPSTRA et al., 1985), na diferenciação de leptospiras

patogênicas e saprófitas (CINCO, 1990), na identificação de gêneros e espécies (ADLER; FAINE, 1983), em Dot-ELISA (SAENGJARUK et al., 2002; CHAICUMPA et al., 2005) e em ELISA competitivo (SURUJBALLI; HOWLETT; HENNING, 1999; SURUJBALLI, ELMGREN, 2000).

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi produzir e caracterizar anticorpos monoclonais que reajam contra LigA e LigB nativas para uso em testes de imunodiagnóstico e imunoproteção.

2.1 Objetivos específicos

- Produzir Mabs contra fragmentos não idênticos de LigA e LigB recombinantes;
- Avaliar se os Mabs reagem com as proteínas nativas de *L. interrogans* L1 130 utilizando diferentes técnicas;
- Determinar a constante de afinidade dos anticorpos com as proteínas recombinantes;
- Investigar a possibilidade de uso simultâneo dos Mabs em testes de imunodiagnóstico através do mapeamento de epitopos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Clonagem e expressão das proteínas Lig

Os fragmentos não idênticos das proteínas LigA (LigANI) e LigB (LigBNI) foram clonados e expressos no laboratório de Biologia Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). As proteínas recombinantes LigANI e LigBNI foram preparadas para a imunização dos animais utilizados na fusão celular, como também na sensibilização das placas de ELISA usadas para a triagem dos hibridomas e testes de caracterização.

3.2 Cultivo das leptospiiras

Leptospira interrogans sorovar Copenhageni cepa L1 130 (KO et al., 1999) baixa passagem e *L. biflexa* sorovar Patoc foram cultivadas em meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) (Difco Laboratories, USA).

Os antígenos vivos foram mantidos a uma temperatura de 30 °C em estufa bacteriológica, sendo utilizados após 6 dias de cultivo ao atingirem uma concentração de 2×10^8 leptospiiras/mL, ajustadas utilizando câmara de Petroff-Hauser (Thomas Scientific).

3.3 Produção de anticorpos monoclonais

3.3.1 Imunização dos camundongos

Quatro camundongos BALB/c com idade de 6 a 8 semanas foram injetados intraperitonealmente com 50 µg de rLigANI. A imunização dos camundongos foi realizada nos dias 0, 14 e 21. Na primeira dose a proteína foi emulsificada com um volume equivalente de Adjuvante Completo de Freund e nas duas doses subsequentes utilizou-se Adjuvante Incompleto de Freund. Três dias antes da fusão celular foi aplicada uma dose da proteína com adjuvante incompleto intraperitonealmente no camundongo selecionado e outra dose intravenosa da proteína pura. O mesmo procedimento foi utilizado para imunizar camundongos com rLigBNI.

3.3.2 Preparação das células de mieloma

Células de mieloma da linhagem celular Sp2/O foram retiradas do nitrogênio líquido, descongeladas em banho-maria a 37 °C, centrifugadas em meio DMEM incompleto (MI) a 1000 g por 8 min, e cultivadas em frascos de cultivo celular com meio DMEM completo (MC). Após cinco dias de cultivo e sucessivas trocas de meio, as células foram expandidas para frascos de cultivo maiores até a obtenção de três frascos de 75 cm².

3.3.3 Fusão Celular

Dez dias após a terceira imunização dos camundongos, o soro dos animais foi coletado por punção do plexo retro-orbital e o título de anticorpos foi determinado por ELISA indireto utilizando as proteínas rLigANI e rLigBNI como antígeno. Os camundongos com os maiores títulos de anticorpos contra as proteínas recombinantes foram selecionados para serem utilizados na fusão celular.

Na véspera da fusão, um camundongo BALB/c de 6-8 semanas não imunizado foi sacrificado e o baço removido, macerado, diluído em 50 mL de meio DMEM HAT e distribuído nas 5 placas de cultivo (0,1 mL/cavidade) a serem utilizadas na fusão celular, com a finalidade de proporcionar um meio de cultivo com células alimentadoras para o desenvolvimento dos hibridomas.

No dia da fusão, o animal imunizado foi sacrificado por deslocamento cervical e teve o baço removido em fluxo laminar. O baço foi macerado em MI e centrifugado a 1000 g por 8 min, as células foram ressuspensas em MI e centrifugadas por mais duas vezes. Ao final de três centrifugações para a remoção dos grumos maiores do baço, as células foram ressuspensas em 10 mL de MI.

As células SP2/O cultivadas em MC foram retiradas dos frascos de cultivo e centrifugadas a 1000 g por 8 min. Após três lavagens com MI, as células foram ressuspensas em 10 mL de MI e contadas em câmara de Neubauer.

As células do baço foram misturadas com 4×10^7 células SP2/O e centrifugadas a 1000 g por 8 min, o sobrenadante foi desprezado e 1 mL de uma solução de polietilenoglicol (PEG) a 50% em MI foi adicionado durante 1 min. Esta suspensão foi agitada durante 1 min e, em seguida, 9 mL de meio incompleto foram adicionados durante 5 min. As células foram centrifugadas a 1000 g por 10 min,

ressuspendidas em 50 mL de meio DMEM HAT e distribuídas nas 5 placas de cultivo celular (0,1 mL/cavidade) anteriormente preparadas com meio de cultura e células alimentadoras.

3.3.4 Triagem dos hibridomas e clonagem celular

As cavidades com crescimento de células ocupando mais de 50% da superfície da cavidade foram testadas através de um ELISA indireto utilizando a proteína de interesse como antígeno. As células que demonstraram estarem secretando os Mabs foram selecionadas para a realização da clonagem e posteriormente reclonagem pela técnica da diluição limitante (CAMPBELL, 1991).

3.3.5 Estocagem dos hibridomas

Após a reclonagem, as células secretoras dos Mabs cultivadas em MC foram expandidas para garrafas de 75 cm², misturadas em uma solução contendo soro fetal com 10% de DMSO e congeladas em nitrogênio líquido. Uma parte das células em cultivo foi injetada em camundongos para a produção de ascites.

3.3.6 Produção de ascite e purificação dos Mabs

Camundongos BALB/c com 6-10 semanas de vida foram sensibilizados com 0,5 mL de Pristane (2, 6, 10,14-tetra-metil-pentadecano) (Sigma), e após 10 dias, 5x10⁶ células de hibridomas em MI foram injetadas intraperitonealmente. Quatorze dias depois os camundongos foram puncionados para retirada do fluído ascítico que foi centrifugado 1500 g por 10 min. Os sobrenadantes dos quatro Mabs anti-LigA e cinco Mabs anti-LigB foram purificados em coluna de proteína G-Sepharose de acordo com as instruções do fabricante (Amersham, MS). Alíquotas de 1mL foram coletadas em Tris pH 9, dialisadas em PBS (500 x o volume total das frações) e concentradas em solução de polietilenoglicol a 20% (PM 20.000). A concentração dos anticorpos foi determinada em espectrofotômetro por UV utilizando comprimento de onda de 280 nm e o cálculo foi realizado através do coeficiente de extinção da IgG (1,35). Os anticorpos foram armazenados a -18°C.

O Mab LigBNI1 foi purificado por precipitação com uma solução de sulfato de amônio saturada. A ascite foi misturada com a solução saturada na proporção 1:1 por 2 h a 4 °C. Após este período, a mistura foi centrifugada a 3000 g por 30 min a 4 °C. O pellet foi diluído em PBS na quantidade de 10% do volume inicial. A amostra foi dialisada como realizado com os demais Mabs. A concentração dos Mabs foi determinada em espectrofotômetro por UV utilizando um comprimento de onda de 280 nm e o cálculo foi realizado através do coeficiente de extinção da IgM (1,25). Os anticorpos foram armazenados a -18 °C.

3.4 Caracterização dos Mabs

3.4.1 Isotipagem

A isotipagem dos Mabs anti-LigA e LigB foi realizada através de ELISA, onde uma placa de poliestireno de 96 cavidades (Nunc, EUA) foi sensibilizada com 50 µL da proteína de interesse ($3 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em tampão carbonato-bicarbonato (0,05 M, pH 9,6) e incubada por 1 h a 37 °C. Como controles positivos foram utilizadas cavidades sensibilizadas com soros dos camundongos BALB/c imunizados com as proteínas rLigA e rLigB, diluídos em tampão carbonato bicarbonato pH 9.6. Cada cavidade foi lavada 3 vezes com 200 µL de PBS com 0,05% de Tween 20 (PBS-T), e em seguida foi adicionado 50 µL do meio de cultivo de cada hibridoma. Soro de camundongo não imunizado foi utilizado como controle negativo. Assim como entre todas as outras etapas desse ELISA, a placa foi incubada a 37 °C por 1 h e lavada 3 vezes com 200 µL de PBS-T. Após, anticorpos de cabra anti-isotipo específicos (Sigma, EUA) foram diluídos 1:4000 em PBS-T e adicionados 50 µL às cavidades da placa que foi incubada a temperatura ambiente por 30 min. Por último, foram adicionados à placa 50 µL do conjugado de anticorpo de coelho anti-IgG de cabra e peroxidase na diluição de 1:5000 em PBS-T. Após, 50 µL de solução do cromógeno ortofenilenodiamina (OPD) diluído em tampão citrato-fosfato (0,2 M, pH 4,0), contendo 0,01% de peróxido de hidrogênio, foi adicionado às cavidades da placa. Depois de a placa ser mantida em temperatura ambiente e no escuro por 15 min, foi realizada a leitura em espectrofotômetro para ELISA (Titertek Multiscan MCC/340) com filtro de 450 nm.

3.4.2 Índice de aditividade

Para a determinação do índice de aditividade inicialmente foi feito um ELISA indireto para estabelecer a curva de saturação do antígeno com cada um dos Mabs. Na sensibilização das placas de ELISA foram utilizadas rLigANI ou rLigBNI ($3 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ou a proteína nativa de *L. interrogans* L1 130 (2×10^8 leptospiras mL^{-1}) inativada a 56°C por 14 h, e diluições seriadas em base dois de cada um dos Mabs.

Em um segundo momento, foi realizado um ELISA competitivo em que as placas foram sensibilizadas com a mesma concentração de antígeno utilizada anteriormente. Os Mabs foram adicionados na diluição de saturação adequada, individualmente ou em pares. Foram testadas todas as combinações (em duplicata) possíveis entre os dez Mabs. Em cada cavidade foi adicionado o anticorpo de cabra anti-camundongo conjugado com peroxidase diluído 1:1000 em PBS-T. Entre todas as etapas mencionadas as placas foram incubadas a 37°C por 1 h e lavadas 3 vezes com PBS-T. Para a revelação do ELISA, foi adicionada 50 μL de OPD a 0,4 mg.mL^{-1} diluído em tampão citrato-fosfato (0,2 M, pH 4,0), contendo 0,01% de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) às placas e incubadas no escuro em temperatura ambiente por 15 min. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 450 nm e o resultado foi analisado através da fórmula $[A_{1+2} - (A_1 + A_2/2)/A_1 + A_2 - (A_1 + A_2/2)] \times 100$, onde A1 e A2 são os valores das absorbâncias dos Mabs 1 e 2 quando adicionados individualmente às cavidades, e A_{1+2} é a absorbância quando os dois Mabs foram adicionados juntos nas cavidades. Os pares de anticorpos com índice de aditividade maior que 50% podem ser considerados para uso em conjunto por reagirem em regiões diferentes da molécula do antígeno (BOBROVNIK, 2003).

3.4.3 Constante de afinidade

Um Elisa indireto foi inicialmente realizado para estabelecer a concentração de Mab adequada para a determinação de sua constante de afinidade (K_a). As proteínas rLigANI e rLigBNI foram diluídas em tampão carbonato-bicarbonato à concentração de $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e adicionadas (50 μL) em cada cavidade das placas de poliestireno. Após 24 h a 20°C , as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T (200 μL /cavidade) e 50 μL do Mabs diluídos em PBS-T, em concentrações de 0,1 a 1×10^{-4}

mg.mL⁻¹, foram adicionadas nas cavidades. Em seguida, um conjugado de cabra anti-camundongo com peroxidase foi diluído 1:2000 e aplicado na placa. Após 1 h de incubação e lavagem com PBS-T, a solução cromógena foi adicionada na placa na mesma quantidade (50 µL) das demais soluções. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 450 nm depois de 15 min em ambiente escuro e a temperatura ambiente.

A determinação da K_a de cada Mab foi realizada em outro ELISA que utilizou o Mab na concentração determinada acima, as mesmas concentrações das proteínas para sensibilização das placas, e os mesmos tampões para diluições e lavagens. Neste ELISA inicialmente os antígenos foram diluídos (4×10^{-10} a 2×10^{-7} M), misturados com o Mab em um tubo eppendorf e incubados por 15 h a 20 °C. Depois desse período, 50 µL da mistura foi adicionada à placa para verificar a reação entre o Mab livre e o antígeno fixado na placa. As duas últimas etapas desse ELISA foram realizadas como citadas anteriormente. O período de incubação quando não mencionado foi de 1 h a 37 °C e a lavagem das placas foi com PBS-T. As absorbâncias do ELISA foram utilizadas na equação $(A_0 - A_i)/A_i = K_a \cdot I_i$, onde A_0 é a absorbância do Mab na concentração selecionada, sem reagir com o antígeno no microtubo; A_i é a absorbância da reação após o complexo antígeno-anticorpo ter atingido o equilíbrio; K_a é a constante de afinidade e I_i é a concentração de antígeno (BOBROVNIK, 2003; COUTINHO, 2005).

3.4.4 ELISA com a proteína nativa *L. interrogans* L1 130

Cada uma de três placas de poliestireno foi sensibilizada com 2×10^8 leptospiros mL⁻¹ intactas, inativadas pelo calor a 56 °C por 14 h e a 100 °C por 10 min. Os Mabs foram diluídos 1:1000 em PBS-T e adicionados 50 µL em cada cavidade. Entre as etapas desse ELISA o período de incubação foi de 1 h a 37 °C e as placas foram lavadas com PBS-T. O anticorpo de cabra anti-camundongo conjugado com peroxidase foi diluído 1:1000 em PBS-T e adicionado à placa. Após 15 min, 50 µL da solução cromógena citada anteriormente, foi adicionada em cada uma das cavidades da placa. A leitura foi feita a 450 nm.

3.4.5 Western blot com as proteínas recombinantes e nativa

As proteínas recombinantes LigANI e LigBNI nas concentrações de 0,250 mg. mL⁻¹ foram fervidas a 100 °C por 3 min em tampão de amostra (0,25 M Tris-HCl, 10%SDS, 0,5% azul de bromofenol, 50% glicerol) em presença de agente redutor (β-mercaptoetanol). As amostras foram aplicadas em um gel de acrilamida 12% na presença de SDS para a separação eletroforética. Após, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Amersham) por 1,5 h com a fonte ajustada para diferença de potencial elétrico (DDP) = 100 V e corrente (C) = 400 mA. As membranas foram bloqueadas por 2 h com 5% de leite em pó desnatado em PBS. Os Mabs anti-LigA e anti-LigB foram diluídos (1:500) em PBS e adicionados à membrana. Depois de 1 h o conjugado anti-IgG de camundongo com peroxidase foi diluído 1:1000 em PBS e aplicado à membrana. A revelação foi realizada com a solução cromógena (1% de cloronaftol e peróxido de hidrogênio pH 7,6). A membrana foi lavada 3 vezes com PBS por 5 min entre as etapas mencionadas. O período de incubação dos anticorpos com a membrana foi de 1 h.

O mesmo procedimento descrito anteriormente foi realizado com a proteína nativa *L. interrogans* Copenhageni L1 130 baixa passagem com um concentração de 2x10⁹ leptospiros mL⁻¹.

3.4.6 Imunofluorescência indireta

Lâminas de vidro para microscopia foram cobertas com uma solução de poli-L-lisina 0,01% (Sigma Aldrich) e incubadas a 37 °C até secarem completamente. Uma cultura de *L. interrogans* L1-130 com 2x 10⁸ leptospiros mL⁻¹ foi centrifugada a 3000 g durante 5 min e ressuspensa em 5 mL de PBS. Após, 20 µL da suspensão de leptospiros foi adicionada às lâminas que foram incubadas por 1 h a 30 °C. No caso das leptospiros fixadas com metanol, as lâminas permaneceram na temperatura de 37 °C até secarem e, após, o metanol a 4 °C foi adicionado sobre elas por 10 min à temperatura ambiente.

As lâminas fixadas e não fixadas com metanol foram lavadas duas vezes com PBS contendo 1% de BSA e os dez Mabs anti-LigA e anti-LigB nas concentrações que variaram de 1,2 a 6,4 mg.mL⁻¹ foram adicionados na diluição 1:10. Após serem incubadas por 1 h a 30 °C, as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS-BSA e o

anticorpo de coelho anti-camundongo conjugado com FITC foi diluído 1:100 e adicionado às lâminas. Depois do período de incubação e lavagem das lâminas, foi adicionado o corante de DNA Hoechst por 30 min. O meio de montagem contendo 9 mL de glicerol, 100 mg de N-phenylenediamine e 1 mL de PBS foi adicionado às lâminas que foram recobertas com lamínulas. O controle positivo utilizado foi o Mab anti-LipL32 1D9 e o controle negativo foi o soro de camundongo não imunizado.

3.4.7 Imuno-histoquímica

Quatro hamsters (*Mesocricetus auratus*) fêmeas criadas no biotério da UFPel, com peso corpóreo entre 80 e 100 gramas, foram inoculados via intraperitoneal com 1 mL de PBS contendo 50 leptospiros *L. interrogans* L1 130. Outro hamster foi injetado com 1mL de PBS para ser utilizado como controle negativo. Os animais foram observados diariamente até o 21º dia pós-inoculação experimental, quando os sobreviventes e o controle negativo foram sacrificados e submetidos à necropsia para a posterior utilização em imuno-histoquímica (IHQ). Na necropsia foram coletados fragmentos de fígado, rins e pulmão e fixados por um período de 24-48 h em formol tamponado a 10%. Posteriormente foram clivados, embebidos em parafina, cortados em seções a 3µm e colocados em estufa (55-60° C) por pelo menos 2 h. Primeiramente, este material sofreu processamento histopatológico de rotina, sendo corado com Hematoxilina e Eosina. Após esta avaliação, foi realizada a técnica de IHQ para observar a reação dos Mabs produzidos com os antígenos contidos nas seções de tecido selecionadas.

A reação IHQ, com amplificação pelo Sistema HRP DakoCytomation LSAB2 (Dako), foi realizada em seções histológicas de rins, fígado e pulmões dos animais. As seções foram distribuídas em lâminas silanizadas e desparafinados com xilol frio por 10 min a temperatura ambiente por duas vezes. Em seguida foram hidratados com álcool etílico absoluto por 3 min e imersos duas vezes em uma solução contendo 100 ml de metanol com 10 ml de água oxigenada PA 30 v por 30 min para bloquear a peroxidase endógena. Após, os cortes foram hidratados consecutivamente com etanol 90, 80 e 70% por 3 min e duas vezes cada. Quatro Mabs anti-LigA e cinco Mabs anti-LigB foram adicionados sobre os cortes histológicos e incubados por 10 min. A seguir foram feitas lavagens com tampão PBS 10 mM pH 7,4 por 5 min e secagem das lâminas. Posteriormente, adicionou-se

o anticorpo biotilado de cabra anti-camundongo e as lâminas foram incubadas por 10 min, lavadas em PBS por 5 min e a secagem foi realizada a temperatura ambiente. A estreptavidina-peroxidase foi adicionada, seguindo-se os mesmos procedimentos de incubação, lavagem e secagem. A revelação foi realizada com uma solução contendo diaminobenzidina (DAB) (Sigma) a 1%, peróxido de hidrogênio a 0,3%, água destilada e PBS por 5 min. Os cortes foram lavados com PBS e contra-corados com hematoxilina de Harris por 20 s. Após a contra-coloração, os cortes foram lavados em água corrente por 5 min, água destilada por 3 min. e desidratados consecutivamente com etanol 70, 80, 90 e 100% por 2 min e xilol por 5 min. duas vezes cada. As lâminas foram secadas e montadas para análise em microscopia. Como controle positivo foi utilizado um anticorpo monoclonal (1D9) anti-LipL32 (LÜDTKE et. al., 2003), e como controles negativos de cada lâmina foram utilizados soro de cabra como anticorpo primário e cortes histológicos do animal inoculado apenas com PBS.

4 RESULTADOS

4.1 Produção dos Mabs

Foram produzidos seis hibridomas secretores de Mabs anti-rLigBNI (LigBNI1, LigBNI2, LigBNI3, LigBNI4, LigBNI5 e LigBNI6) e quatro hibridomas secretores de Mabs anti-rLigANI (LigANI1, LigANI2, LigANI3 e LigANI4).

4.2 Caracterização dos Mabs

4.2.1 Classificação em isotipos

O resultado da isotipagem dos Mabs é demonstrado na Tab. 1. Seis anticorpos pertencem ao isotipo IgG1, 3 anticorpos ao isotipo IgG2B e 1 anticorpo ao isotipo IgM. Os Mabs também foram testados com os anti-isotipos IgG2A, IgG3 e IgA, mas os resultados foram negativos.

Tabela 1- Caracterização isotípica dos Mabs anti-LigA e anti-LigB através de ELISA indireto.

Isotipo	Anticorpos Monoclonais									
	LigANI1	LigANI2	LigANI3	LigANI4	LigBNI1	LigBNI2	LigBNI3	LigBNI4	LigBNI5	LigBNI6
IgM					+					
IgG1		+	+	+		+	+			+
IgG2B	+							+		

4.2.2 Avaliação da aditividade dos Mabs

Na Tabela 2 podemos observar que os Mabs anti-LigA, testados com a proteína rLigANI, apresentaram índice de aditividade menores que 50%. O Mab LigANI1 em combinação com LigANI4 apresentou porcentagens mais próximas de 50%, enquanto que LigANI1 com LigANI3 apresentou aditividade de apenas 7%.

Tabela 2- Índice de aditividade (%) dos Mabs anti-LigA com a proteína recombinante como antígeno.

	LigANI1	LigANI2	LigANI3	LigANI4
LigANI1	-	27	7	35
LigANI2		-	23	18
LigANI3			-	31
LigANI4				-

Conforme a Tabela 3, os Mabs anti-LigB também apresentaram percentuais de aditividade menores que 50% quando testados com rLigBNI. O Mab LigBNI1 apresentou índices de aditividade bem próximos a 50% com os demais Mabs anti-LigB, exceto o LigBNI2.

Tabela 3- Índice de aditividade (%) dos Mabs anti-LigB com a proteína recombinante como antígeno.

	LigBNI1	LigBNI2	LigBNI3	LigBNI4	LigBNI5	LigBNI6
LigBNI1	-	18	48	49	46	45
LigBNI2		-	30	46	34	25
LigBNI3			-	16	29	3
LigBNI4				-	34	29
LigBNI5					-	32
LigBNI6						-

Duas combinações de Mabs anti-LigA demonstraram aditividade de 43 e 47% quando testados com a proteína nativa *L. interrogans* L1 130 (Tab. 4). No caso dos Mabs anti-LigB, somente a combinação entre os Mabs LigBNI1 e LigBNI4 apresentou índice de aditividade maior que 40% (Tab. 5). Assim, usando a proteína nativa nenhuma combinação de Mab anti-LigA ou anti-LigB rendeu aditividade superior a 50%.

Tabela 4- Índice de aditividade (%) dos Mabs anti-LigA com a proteína nativa *L. interrogans* L1 130.

	LigANI1	LigANI2	LigANI3	LigANI4
LigANI1	-	43	5	3
LigANI2		-	47	32
LigANI3			-	2
LigANI4				-

Tabela 5- Índice de aditividade (%) dos Mabs anti-LigB com a proteína nativa *L. interrogans* L1 130.

	LigBNI1	LigBNI2	LigBNI3	LigBNI4	LigBNI5	LigBNI6
LigBNI1	-	30	21	44	32	21
LigBNI2		-	20	14	31	1
LigBNI3			-	23	18	2
LigBNI4				-	9	39
LigBNI5					-	1
LigBNI6						-

A maioria das combinações de Mabs anti-LigA com Mabs anti-LigB apresentou índice de aditividade maior do que 50% quando testadas com a proteína nativa *L. interrogans* L1 130, como demonstra a Tab. 6.

Tabela 6- Índice de aditividade (%) dos Mabs anti-LigA combinados com Mabs anti-LigB com a proteína nativa *L. interrogans* L1 130 como antígeno.

	LigANI1	LigANI2	LigANI3	LigANI4
LigBNI1	117	53	93	57
LigBNI2	80	59	52	98
LigBNI3	90	20	35	131
LigBNI4	128	51	58	140
LigBNI5	83	94	125	138
LigBNI6	74	55	105	72

4.2.3 Afinidade dos Mabs pelos antígenos

Nas Tab. 7 e 8 são mostradas as constantes de afinidade dos anticorpos monoclonais determinadas com rLigANI e rLigBNI. Todos os Mabs apresentaram elevada afinidade pelos antígenos recombinantes.

Entre os Mabs anti-LigA, o LigANI1 foi o que apresentou a mais alta constante de afinidade; entre os Mabs anti-LigB o que apresentou a mais alta constante de afinidade foi o LigBNI6.

Tabela 7- Constante de afinidade dos anticorpos monoclonais anti-LigA determinadas com o antígeno recombinante.

Característica	Anticorpos Monoclonais			
	LigANI1	LigANI2	LigANI3	LigANI4
Ka (L.mol ⁻¹)	2x10 ⁸	5x10 ⁷	7x10 ⁷	5x10 ⁷

Tabela 8- Constante de afinidade dos anticorpos monoclonais anti-LigB determinadas com o antígeno recombinante.

Característica	Anticorpos Monoclonais				
	LigBNI2	LigBNI3	LigBNI4	LigBNI5	LigBNI6
Ka (L.mol ⁻¹)	4x10 ⁷	1x10 ⁸	1x10 ⁸	1x10 ⁸	2x10 ⁸

4.2.4 ELISA indireto com a proteína nativa *L. interrogans* L1 130

Sete Mabs reagiram com a proteína nativa de *L. interrogans* L1 130 intacta e inativada a 56 °C. Por outro lado, quando os Mabs foram testados com as leptospiras inativadas a 100 °C, as reações não foram observadas (Tab. 9).

Apenas os Mabs LigANI2, LigANI4 e LigBNI6 não reagiram com a *Leptospira* intacta (Tab. 9). No caso do ELISA indireto realizado para testar os Mabs com o sorovar saprófita Patoc não ocorreu reação com o microrganismo intacto e inativado, como demonstra a Tab. 9.

Tabela 9- Reatividade dos Mabs anti-LigA e anti-LigB com *L. interrogans* L1 130 e Patoc intactas e inativadas pelo calor em ELISA indireto.

Mabs	Condições das leptospiras					
	<i>L. interrogans</i> L1 130			Patoc		
	Intacta	Inativada a 56°C	Inativada a 100° C	Intacta	Inativada a 56° C	Inativada a 100° C
LigANI1	+	+	-	-	-	-
LigANI2	-	+	-	-	-	-
LigANI3	+	+	-	-	-	-
LigANI4	-	+	-	-	-	-
LigBNI1	+	+	-	-	-	-
LigBNI2	+	+	-	-	-	-
LigBNI3	+	+	-	-	-	-
LigBNI4	+	+	-	-	-	-
LigBNI5	+	+	-	-	-	-
LigBNI6	-	+	-	-	-	-

+ (positivo); - (negativo)

4.2.5 Western blot com as proteínas recombinantes e nativas

O Western blot foi realizado com as proteínas recombinantes e nativas (*L. interrogans* L1 130) para confirmar as reações positivas dos Mabs no ELISA indireto.

Os Mabs anti-LigA e anti-LigB apresentaram reações com as respectivas proteínas recombinantes como se pode observar nas Fig. 1 e 2.

Os Mabs anti-LigA e anti-LigB reagiram fracamente no Western blot com as proteínas nativas de *L. interrogans* L1 130 (dados não mostrados).

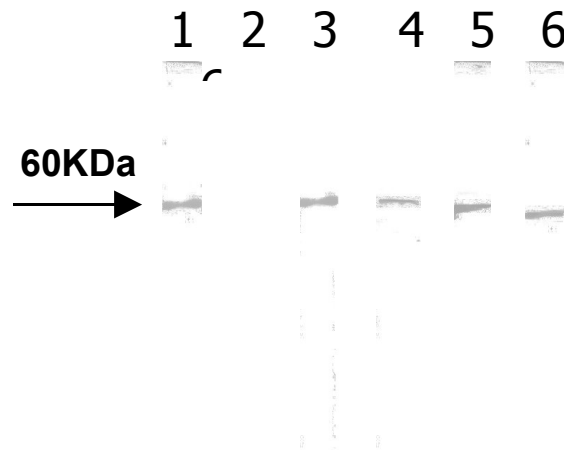


Figura 1- Western blot com os Mabs anti-LigA e proteína recombinante. Linhas: 1. Soro de camundongo imunizado com rLigANI; 2. Soro de camundongo não imunizado; 3. LigANI1; 4. LigANI2; 5. LigANI3; 6. LigANI4. A seta indica a massa molecular da proteína recombinante reconhecida pelos Mabs.

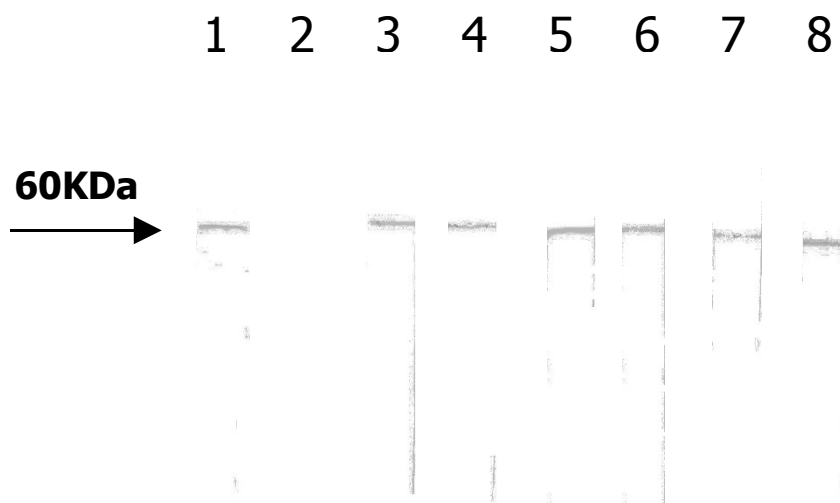


Figura 2- Western blot com os Mabs anti-LigB e proteína recombinante. Linhas: 1. Soro de camundongo imunizado com LigBNI; 2. Soro de camundongo não imunizado; 3. LigBNI1; 4. LigBNI2; 5. LigBNI3; 6. LigBNI4; 7. LigBNI5; 8. LigBNI6. A seta indica a massa molecular da proteína recombinante reconhecida pelos Mabs.

4.2.6 Reconhecimento das Ligs em leptospiiras fixadas com metanol

Quatro Mabs anti-LigA e 5 Mabs anti-LigB foram utilizados em imunofluorescência indireta com leptospiiras fixadas e não fixadas com metanol. Todos os Mabs testados foram capazes de reconhecer as proteínas LigA e LigB na membrana externa das leptospiiras fixadas com metanol. Nas Figuras 3 e 4, como exemplo dos resultados obtidos, são apresentadas as reações das leptospiiras com os Mabs LigANI1 e LigBNI5. Nos testes realizados com leptospiiras não fixadas com metanol os resultados não foram positivos (dados não mostrados).

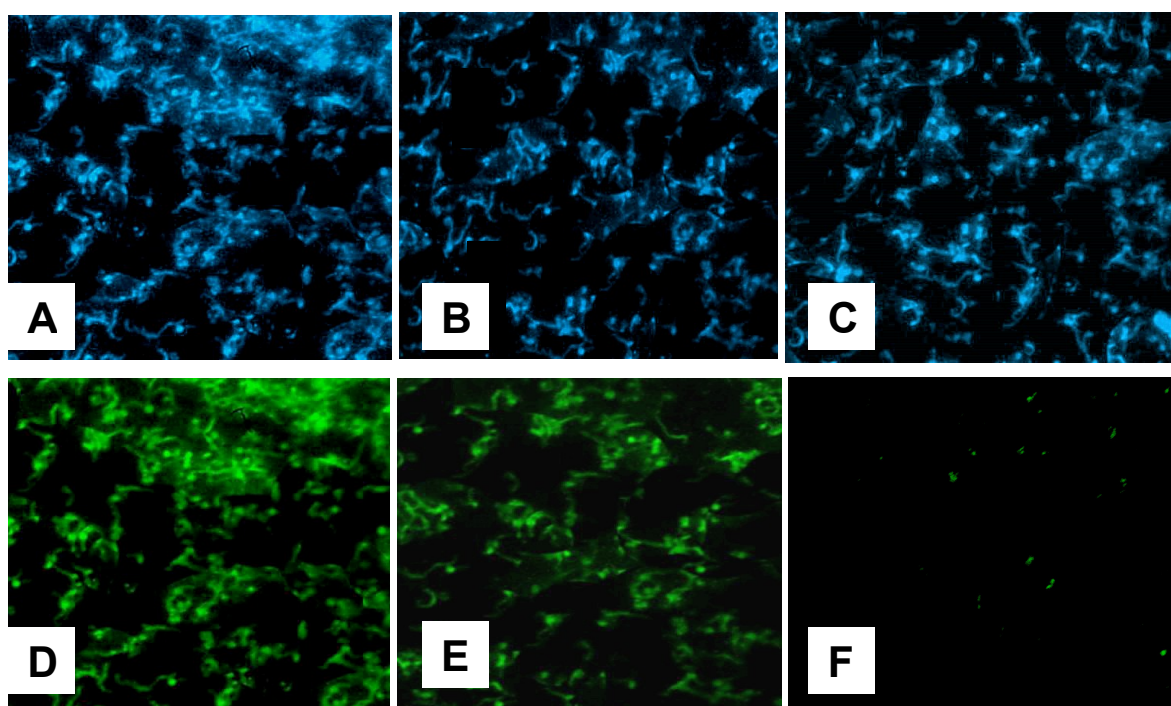


Figura 3- Imunofluorescência indireta do Mab LigANI1 com leptospiiras fixadas com metanol. Painéis A, B e C: leptospiiras coradas com Hoechst; Painel D: Mab 1D9 (controle positivo); Painel E: Mab LigANI1; Painel F: soro de animais não imunizados (controle negativo). As leptospiiras foram visualizadas em microscópio de fluorescência com aumento de 1000X.

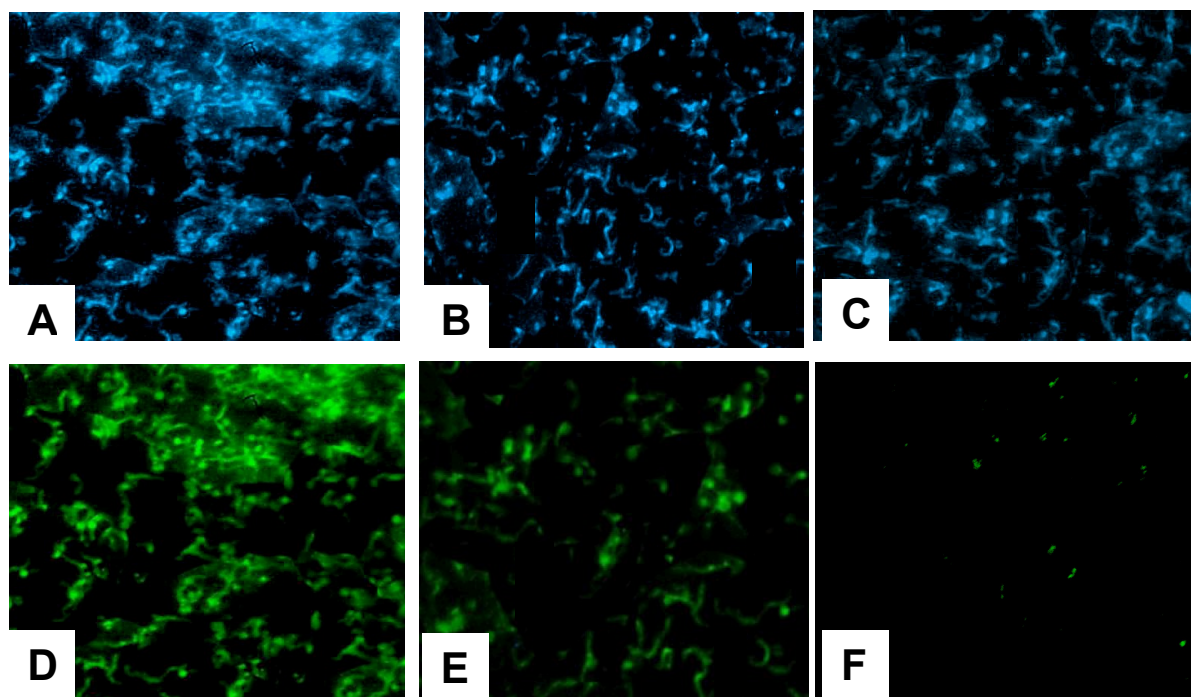


Figura 4- Imunofluorescência indireta do Mab LigBNI5 com leptospiros fixadas com metanol. Painéis A, B e C: leptospiros coradas com Hoechst; Painel D: Mab 1D9 (controle positivo); Painel E: Mab LigBNI5; Painel F: soro de animais não imunizados (controle negativo). As leptospiros foram visualizadas em microscópio de fluorescência com aumento de 1000X.

4.2.7 Reconhecimento das Ligs em tecido renal de hamsters

Nos cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina podemos observar as lesões nos tecidos renais dos hamsters causadas pelas leptospiros (Fig. 5C,D).

Os Mabs quando utilizados em testes imuno-histoquímicos de tecido renal de hamsters experimentalmente infectados apresentaram reações com diferentes intensidades como podemos observar na Tab. 10.

Os Mabs LigANI2 e LigANI4 reagiram fortemente com a proteína nativa de leptospiros nos tecidos de hamsters. As reações de imunomarcacão do Mab LigANI2 nas regiões cortical e medular podem ser observadas em marrom (Fig. 6E,F). O Mab LigBNI2 apresentou reação mais intensa que os demais Mabs anti-LigB (Fig. 6G,H).

Nas seções de fígado e pulmões não foi possível confirmar claramente a reação dos Mabs através da IHQ (dados não mostrados).

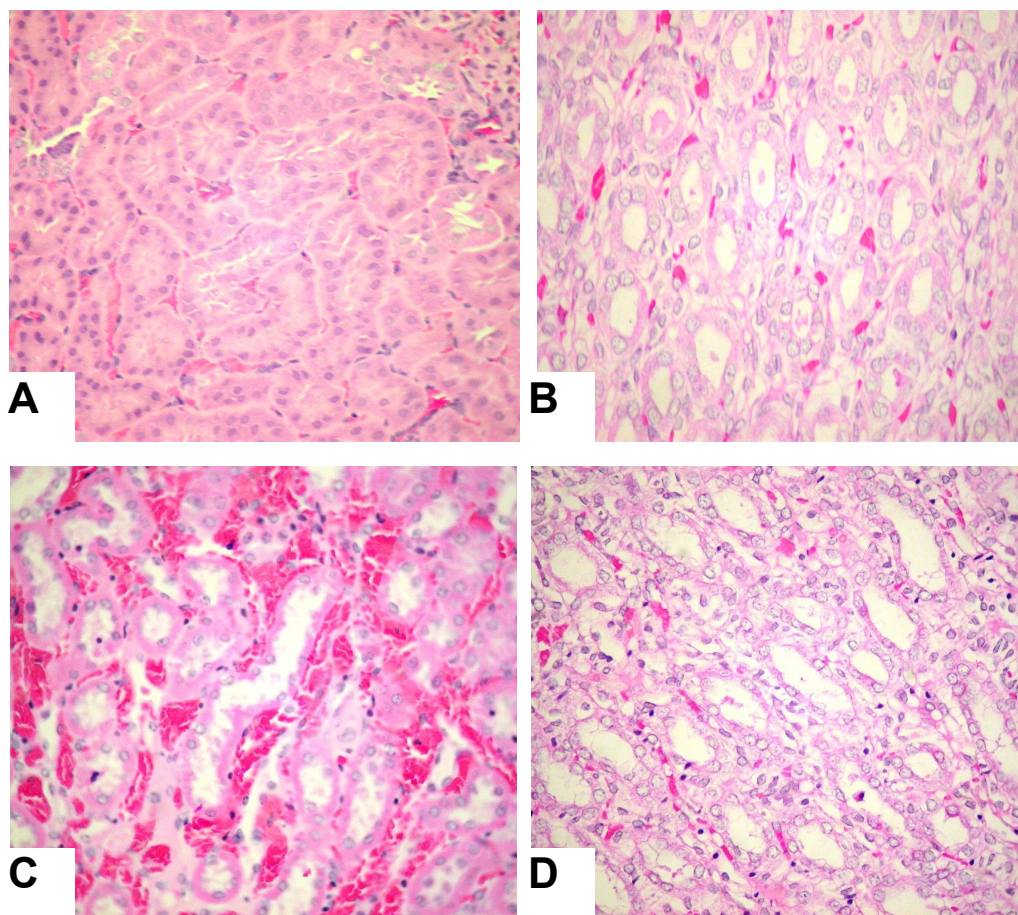
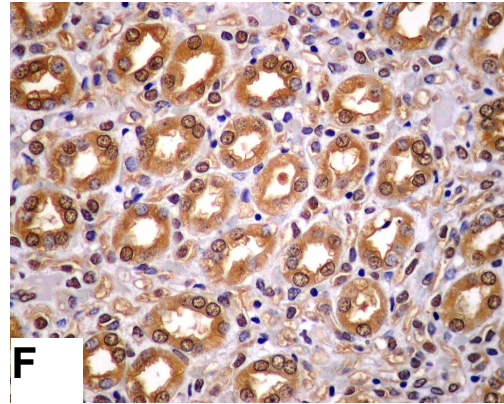
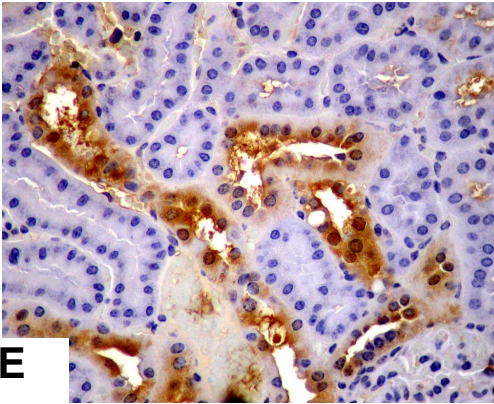
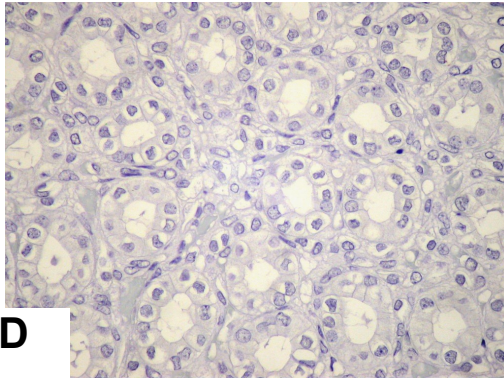
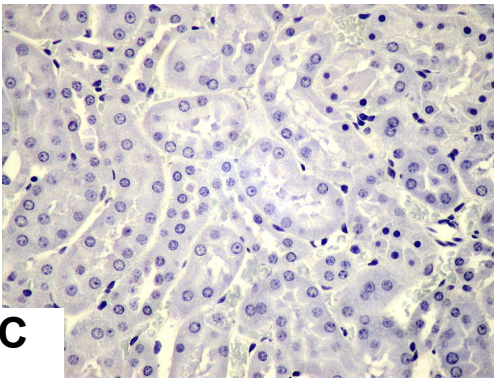
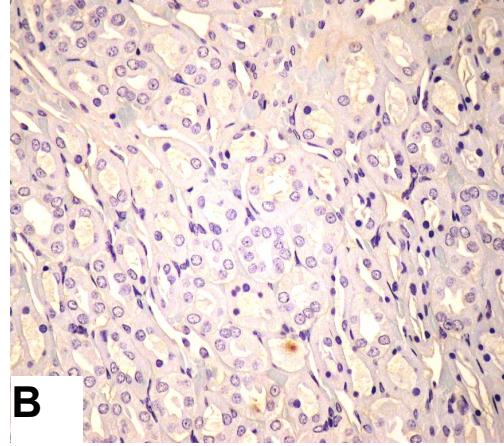
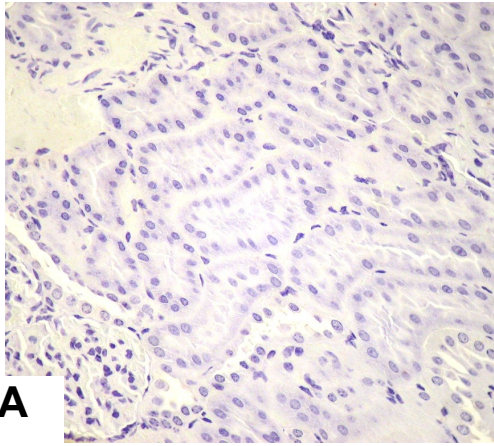


Figura 5- Lesões causadas pelas leptospiros no tecido renal de hamsters infectados. A. Região cortical do rim de hamsters não infectados. B. Região medular do rim de hamsters não infectados. C. Região cortical do rim de hamsters infectados, células epiteliais dos túbulos degeneradas e algumas em necrose. D. Região medular do rim de hamsters infectados, células epiteliais vacuolizadas e algumas em necrose. Hematoxilina-eosina. Objetiva 40x.

Tabela 10- Intensidade das reações imuno-histoquímicas dos Mabs anti-LigA e anti-LigB em tecido renal de hamsters experimentalmente infectados com leptospiros.

Mabs	Intensidade das reações
LigANI1	++++
LigANI2	+++++
LigANI3	+++
LigANI4	+++++
LigBNI2	+++++
LigBNI3	+++
LigBNI4	++++
LigBNI5	++++
LigBNI6	++++

+++ (leve); ++++ (moderada); +++++ (acentuada).



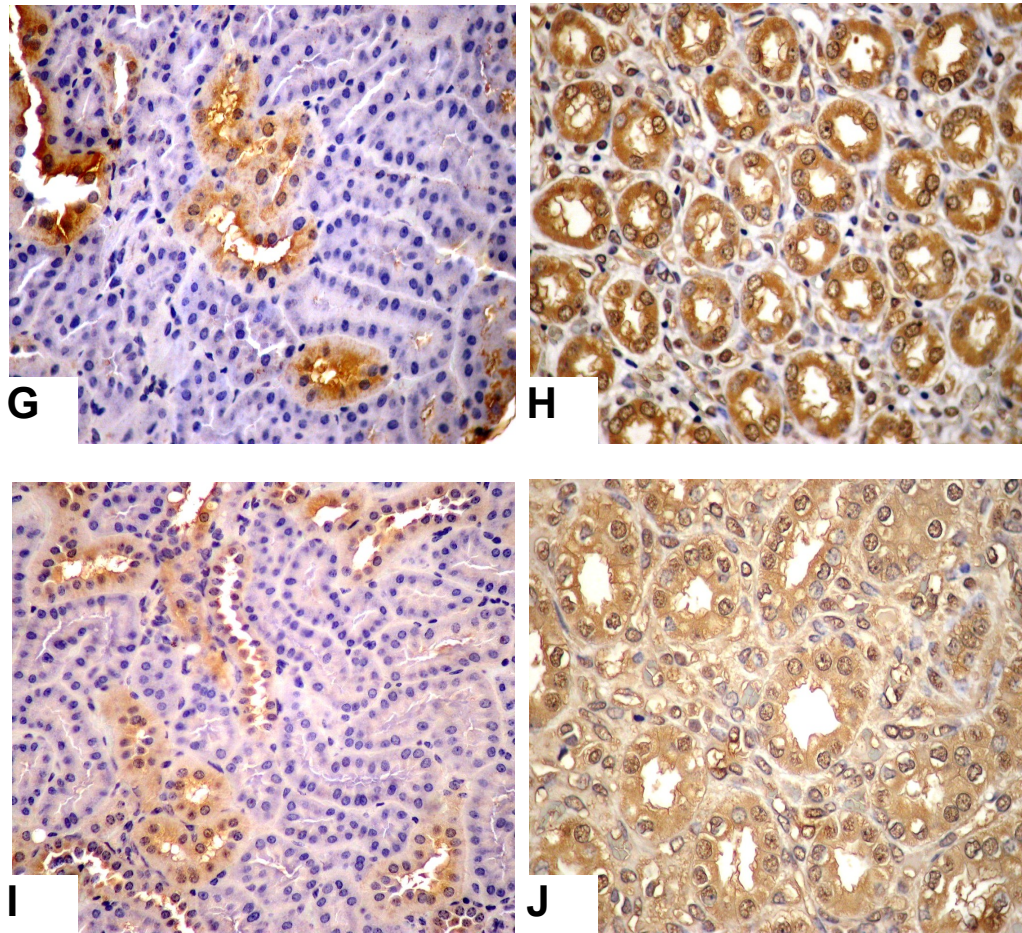


Figura 6- Imuno-histoquímica em tecido renal de hamsters experimentalmente infectados utilizando os Mabs LigANI2 e LigBNI2. A. Controle negativo, região cortical do rim de hamsters não infectados com o Mab 1D9 anti-LipL32. B. Controle negativo, região medular do rim de hamsters não infectados tratada com anticorpo 1D9. C. Controle negativo, região cortical do rim de hamsters infectados tratada com soro de cabra 10%. D. Controle negativo, região medular do rim de hamsters infectados tratada com soro de cabra 10%. E. Região cortical do rim, imunomarcção intensa do Mab LigANI2 no citoplasma e núcleo das células epiteliais renais atingidas. F. Região medular do rim, imunomarcção intensa do Mab LigANI2 no citoplasma e núcleo das células epiteliais renais atingidas. G. Região cortical do rim, imunomarcção intensa do Mab LigBNI2 no citoplasma e núcleo das células epiteliais renais atingidas. H. Região medular do rim, imunomarcção intensa do Mab LigBNI2 no citoplasma e núcleo das células epiteliais renais atingidas. I. Controle positivo: região cortical do rim, imunomarcção do Mab 1D9 anti-LipL32 no citoplasma e núcleo das células epiteliais renais atingidas. J. Controle positivo: região medular do rim de hamsters infectados, imunomarcção do Mab 1D9 anti-LipL32 no citoplasma e núcleo das células epiteliais renais atingidas. Imuno-histoquímica, LSAB2, contracoloração por hematoxilina de Harris. Objetiva 40x.

5 DISCUSSÃO

A leptospirose é reconhecida em todo o mundo como um importante problema de saúde pública por apresentar alta incidência e elevada taxa de letalidade (WHO, 2003). O controle da enfermidade é dificultado devido à inexistência de vacinas e testes laboratoriais que sejam eficazes na prevenção e diagnóstico da doença na fase aguda (GAMBERINI et al., 2005; MCBRIDE et al., 2005). A necessidade da observação de fatores como investigação epidemiológica, diagnóstico clínico e laboratorial são imprescindíveis para detectar a doença com êxito (CDC, 2003).

Na última década foram intensificados os estudos relacionados à busca por antígenos de leptospiros patogênicas para uso em vacinas e testes diagnósticos (HAAKE et al., 1999; CULLEN; HAAKE; ADLER, 2003). Várias proteínas de membrana externa (OMPs) foram identificadas, caracterizadas e testadas (HAAKE; MATSUNAGA, 2002). Recentemente, as proteínas LigA e LigB foram identificadas como sendo fatores de virulência comuns às leptospiros patogênicas, expressos principalmente na fase aguda da enfermidade (MATSUNAGA et al., 2003).

Os antígenos recombinantes Lig foram testados quanto às suas potencialidades no desenvolvimento de vacinas e ensaios diagnósticos e os resultados foram satisfatórios (PALANIAPPAN et al., 2006; PALANIAPPAN et al., 2005; PALANIAPPAN et al., 2004).

Anticorpos monoclonais produzidos contra antígenos específicos de diferentes patógenos têm sido relevantes em estudos envolvendo o desenvolvimento de vacinas e testes de diagnóstico (BERRY, 2005). Na busca de alvos para novas vacinas e metodologias laboratoriais de diagnóstico da leptospirose mais precisas, a disponibilidade de Mabs contra antígenos recombinantes de LigA e LigB seria um fator decisivo de sucesso. Nesse contexto, o presente estudo relata a produção de Mabs anti-LigA e anti-LigB de leptospiros patogênicas e a sua caracterização com vistas a identificar suas potencialidades para uso em imunoproteção e imunodiagnóstico.

Os quatro Mabs anti-LigANI e cinco Mabs anti-LigBNI produzidos apresentaram constantes de afinidade altas, o que significa requererem pequena concentração de antígeno para que a reação antígeno-anticorpo atinja o equilíbrio ou, dizendo de outra forma, para a saturação dos epítomos pelos anticorpos (LUTTMANN et al., 2006). Essa informação é de extrema importância na seleção de

Mabs candidatos à padronização de testes imunodiagnósticos, pois antígenos de leptospiros não são abundantes no soro de pacientes no início da infecção (MACBRIDE et al., 2005; BOENISCH, 2001). Além disso, anticorpos com alta afinidade devem ser preferidos para imunoensaios de fase sólida porque eles permanecem ligados ao antígeno nas várias etapas de lavagem e porque permitem incubações mais curtas (CROWTHER, 2001).

Os valores de aditividade dos Mabs anti-LigA com a proteína recombinante e nativa foram menores que 50% (Tab. 2 e 4), significando que os Mabs interferem na ligação do outro, possivelmente devido a um impedimento espacial (*steric hindrance*) por reagirem em regiões próximas na molécula do antígeno (COUTINHO, 2005). Assim, estes Mabs não podem ser utilizados em conjunto em um teste diagnóstico. Igualmente, os Mabs anti-LigB apresentaram índices de aditividade menores que 50% com a proteína recombinante e nativa (Tab. 3 e 5). Resultados similares foram encontrados por Coutinho (2005), que ao testar Mabs anti-LipL32 recombinante observou aditividade menor que 50%.

Em contraste, quando os Mabs anti-LigA e anti-LigB foram utilizados em conjunto com a proteína nativa de *L. interrogans* L1 130 para investigar o impacto no índice de aditividade, os valores atingiram 100% ou mais em várias combinações de anticorpos (Tab. 6). Este resultado sugere a possibilidade da utilização conjunta dos dois tipos de Mabs na padronização de um teste de captura de antígeno para o imunodiagnóstico da leptospirose.

Na avaliação dos Mabs quanto à reatividade com as proteínas nativas em *L. interrogans* L1 130 baixa passagem através de ELISA indireto, foi observado a reação de todos os Mabs com as leptospiros inativadas a 56 °C e de 7 Mabs com as leptospiros intactas (Tab. 9). Os Mabs não reagiram com o sorovar saprófita Patoc (dados não mostrados). Esses dados reforçam a hipótese de que estes Mabs são adequados para o desenvolvimento de testes mais específicos para a leptospirose. Mabs contra LipL32, proteína de membrana presente em todas as leptospiros patogênicas (HAAKE et al., 2000), também reagiram em ELISA indireto com leptospiros inativadas a 56°C (LÜDTKE et al., 2003; COUTINHO, 2005) e poderiam ser adicionados a um painel de anticorpos para uso em diagnóstico.

As proteínas Lig são altamente expressas no hospedeiro durante a infecção e pobremente expressas em meio de cultura (PALANIAPPAN et al., 2002; MATSUNAGA et al., 2005). Quanto à conservação, os genes *ligA* e *ligB* são

encontrados na maioria das leptospiros patogênicas e se sabe que a cepa *L. interrogans* L1 130 os possui (CERQUEIRA, 2006). A cepa *L. interrogans* L1 130 foi seqüenciada (NASCIMENTO et al., 2004) e tem sido utilizada como padrão para a realização de diversos experimentos.

Baseado nesses fatos, para a realização dos testes de caracterização dos Mabs anti-LigA e anti-LigB relacionados com o reconhecimento da proteína nativa utilizamos a cepa *L. interrogans* L1 130. Outros sorovares e espécies patogênicas não foram testados pela não disponibilidade desses antígenos em baixa passagem no período de realização deste trabalho. Além disso, para a confirmação dos relatos de Matsunaga et al. (2005) que constataram que as proteínas Lig são expressas de forma restrita em meio de cultura, principalmente em cultivos em que já foram realizados diversos repiques, os Mabs foram testados através de ELISA indireto com diferentes sorovares da espécie *L. interrogans* alta passagem e os resultados foram negativos (dados não mostrados).

As proteínas nativas das leptospiros inativadas a 100 °C não reagiram com os Mabs anti-LigA e anti-LigB quando usadas como antígeno no ELISA indireto e reagiram fracamente no Western blot. Quando os Mabs foram testados com as proteínas recombinantes no Western blot as reações foram fortemente positivas (Fig. 1 e 2). Esse resultado sugere que o tratamento térmico intenso pode afetar a estrutura da proteína nativa e provocar resultados falsos negativos em testes de detecção de antígeno.

Na imunofluorescência indireta, nove Mabs testados reagiram com as proteínas nativas apenas quando as leptospiros foram submetidas ao tratamento com metanol. Isso pode ter ocorrido devido à maior exposição dos epitopos após o tratamento. As reações mais intensas foram dos Mabs LigANI1 e LigBNI5 (Fig. 3 e 4).

Os cortes histológicos do tecido renal de hamsters experimentalmente infectados com *L. interrogans* L1 130 e corados com hematoxilina-eosina demonstraram hemorragia, lesões como degeneração das células epiteliais e necrose dos túbulos renais (Fig. 5C,D), semelhantes às encontradas por Nally et. al. (2005) nos rins de camundongos infectados experimentalmente com uma cepa de *L. interrogans* Copenhageni isolada de humanos. Porém, nos experimentos realizados por Nally et al. (2005) a dose de leptospiros foi maior (10^7 células) e os animais foram sacrificados antes dos 21 dias.

Os Mabs anti-LigA e anti-LigB utilizados como anticorpos primários em IHQ, reagiram intensamente nos cortes de tecidos renais de hamsters infectados (Tab. 10). Comparando com os resultados do controle positivo, o Mab 1D9 contra a proteína LipL32 (Fig. 6I,J), principal proteína de membrana expressa durante a infecção (HAAKE et al., 2000), os Mabs anti-LigA e anti-LigB reagiram com maior intensidade nos tecidos renais dos hamsters, tanto na região medular renal (Fig. 6F,H) quanto na região cortical renal (Fig. 6E,G). Essa forte reação pode estar relacionada ao fato de os antígenos Lig serem possíveis fatores de virulência de leptospiros responsáveis pela adesão e penetração nos tecidos (MATSUNAGA et al., 2003; BAROCCHI et al., 2002), e dessa forma podem ser expressos abundantemente no hospedeiro infectado. Por outro lado, as reações de menor intensidade do Mab 1D9 (Fig. 6I,J), podem ter resultado de alterações sofridas pelo anticorpo ou antígeno durante sua preparação para utilização em IHQ ou em alguma das etapas da técnica.

Em um estudo imuno-histoquímico da expressão e distribuição de componentes da membrana externa de leptospiros como LPS, OmpL1, LipL36 e LipL41, durante uma infecção experimental de hamsters com *L. kirschneri* de baixa passagem, foi demonstrado que alguns desses antígenos estão relacionados à persistência das leptospiros nos rins (BARNETT et al., 1999). Neste mesmo experimento, foi possível a visualização da distribuição das proteínas OmpL1 e LipL41 no lúmen dos túbulos renais dos hamsters infectados com uma dose maior do que 50 leptospiros e 28 dias pós-infecção. Haake et al. (2000) demonstraram a reatividade de um soro policlonal anti-LipL32 no lúmen dos túbulos renais de hamsters experimentalmente infectados com *L. Kirshneri*. Esses dados da localização preferencial das leptospiros no tecido renal condizem com os resultados encontrados no presente trabalho (Fig. 6E-J).

Na IHQ realizada nas seções de fígado e pulmões dos hamsters experimentalmente infectados, não foi possível confirmar claramente a reação dos Mabs anti-LigA e anti-LigB (dados não mostrados) devido as reações inespecíficas, como aquelas com a peroxidase endógena do tecido hepático.

As variações de reatividade do painel de anticorpos anti-LigA e anti-LigB com a proteína nativa de *Leptospira* nos diferentes testes de caracterização, pode ser consequência dos diversos tratamentos físicos e químicos a que os Mabs e o antígeno foram submetidos.

No entanto, os dados apresentados nesse trabalho sugerem que os Mabs anti-LigA e anti-LigB obtidos podem ser usados para estudos de imunoproteção, com vistas a validação do uso destas proteínas em vacinas, e no desenvolvimento de testes diagnósticos mais eficientes para a leptospirose.

6 CONCLUSÕES

- Os seis Mabs anti-LigB e quatro anti-LigA reagem com epítomos localizados em regiões próximas na molécula do antígeno;
- Os Mabs possuem alta constante de afinidade;
- Os Mabs reagem com *Leptospira interrogans* L1 130 intactas e inativadas a 56 °C através de ELISA indireto;
- Os Mabs reagem com *Leptospira interrogans* L1 130 fixadas com metanol através de imunofluorescência indireta;
- Os Mabs reagem com a proteína nativa em tecido renal de hamsters experimentalmente infectados com leptospiros;
- A maioria dos Mabs tem potencial para uso em testes de imunodiagnóstico e imunoproteção.

7 REFERÊNCIAS

- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes_al hombre y a los animales, 2º ed. Washington: **Organizacion Panamericana de la Salud**, p. 112-120, 1986.
- ADLER, B.; FAINE, S. A pomona sorogroup especific agglutinating antigen in *Leptospira* identified by antibodies monoclonal. **Pathology**, v. 15, p. 247-250, 1983.
- BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICARDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: a Zoonotic Disease of Global Importance. **Lancet Infectious Diseases**, v. 3, p. 757-771, 2003.
- BAROCCHI, M.A.; KO, A.I.; REIS, M.G., MCDONALD, K.L.; AND RILEY, L.W. Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 6926-6932, 2002.
- BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; BOLIN, C. A.; SUMMERS, T. A.; WAGAR, E. A.; CHEVILLE, N. F.; HARTSKEERL, R. A. AND HAAKE, D. A. Expression and Distribution of Leptospiral Outer Membrane Components during Renal Infection of Hamsters. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 853–861, 1999.
- BERRY, J. D. Rational monoclonal antibody development to emerging pathogens, biothreat agents and agents of foreign animal disease: The antigen scale. **The Veterinary Journal**, v. 170, p. 193-211, 2005.
- BINDER, W. D. Leptospirosis in an urban setting: case report and review of an emerging infectious disease. **The Journal of Emergency Medicine**, v. 16, p. 851-856, 1998.
- BHARADWAJ, R. Leptospirosis - a Reemerging Disease? **Indian Journal of Medical Research**, v. 120, p. 136-138, 2004.
- BOENISCH, T. (Ed.) **Immunochemical Staining Methods**, 3ª ed., Califórnia: Dako, 2001.
- BOMFIM M. R.; KO A.; KOURY M. C. Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 109, p. 89-94, 2005.
- BOBROVNIK, S. A.; Determination of antibody affinity by ELISA. Theory. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 57, p. 213-236, 2003.
- CAMPBELL, A.M.; **Monoclonal and immunosensor technology**. Amsterdam: Elsevier, 1991.

CDC (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION). Case Definitions for Infectious Conditions Under Public Health Surveillance. MMWR 1997. Disponível em: http://www.cdc.gov/epo/dphsi/casedef/leptospirosis_current.htm

CDC (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION). Disease information Leptospirosis. 2003. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaselept.htm>

CERQUEIRA, G. M. Caracterização de *Leptospira* spp. quanto à presença e conservação dos genes da família *lig*: importantes alvos para utilização em vacina e testes de diagnóstico, Brasil. 2006. 52f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

CHAICUMPA J. W.; SAENGJARUK P.; TAPCHAISRI P.; CHONGSA-NGUAN M.; KALAMBAHETI T.; RAMASOOTTA P.; SAKOLVAREE Y.; VIRAKUL P. Evaluation of a monoclonal antibody-based dot-blot ELISA for detection of *Leptospira* spp in bovine urine samples. *American Journal Veterinary Research*, n. 66, v. 5, p. 762-766, 2005.

CINCO, M. Evaluation of antibodies monoclonal F9-4 as immunological probe for leptospira interrogans. **Journal Clinical Microbiology**, v. 28, p. 2154-2155, 1990.

CORREA, M. O. A. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 7º ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogar, 1987. 592 p.

COUTINHO, M. L. Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra LipL32, uma proteína de membrana de leptospiros patogênicas, Brasil. 2005. 34f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

CROWTHER, J. R. The ELISA Guidebook, vol. 149. New Jersey: **Human Press**, p. 413, 2001.

CULLEN, P.; HAAKE, D.; ADLER, B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. **FEMS Microbiology Reviews**, n. 28, v. 3, p.291-318, 2004.

DORIGATTI F.; BRUNIALTI M. K.; ROMERO E. C.; KALLAS E. G.; SALOMAO R. *Leptospira interrogans* activation of peripheral blood monocyte glycolipoprotein demonstrated in whole blood by the release of IL-6. *Brazilian Journal Medical Biology Research*, n. 38, v. 6, p. 909-914, 2005.

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**. v. 40, p. 1464-1469, 2002.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. ***Leptospira and Leptospirosis***. MedSci, Melbourne, 2ª ed. p. 272, 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**, n. 39, v. 9, p. 3303 – 3310, 2001.

GAMBERINI, M.; GOMEZ, R. M.; ATZINGEN, M. V.; MARTINS, E. A.; VASCONCELLOS, S. A.; ROMERO, E. C.; LEITE, L. C.; HO, P. L.; NASCIMENTO, A. L. Whole-Genome Analysis of *Leptospira Interrogans* to Identify Potential Vaccine Candidates Against Leptospirosis. **FEMS Microbiological Letters**, v. 244, p. 305-313, 2005.

GUSSENHOVEN, G. C.; VAN DER HOORN, M. A.; GORIS, M. G.; TERPSTRA, W. J.; HARTSKEERL, R. A.; MOL, B. W.; VAN INGEN, C. W.; SMITS, H. L. LEPTO dipstick, a dipstick assay for detection of *Leptospira*-specific immunoglobulin M antibodies in human sera. **Journal Clinical Microbiology**, v. 35, p. 92–97, 1997.

HAAKE, D. A. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. **Microbiology**, v. 146, p. 1491-1504, 2000.

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**, v. 68, p. 2276-2285, 2000.

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. Characterization of the Leptospiral Outer Membrane and Description of Three Novel Leptospiral Membrane Proteins. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 4936-4945, 2002.

HAAKE, D. A.; MAZEL, M. K.; MCCOY, A. M.; MILWARD, F.; CHAO, G.; MATSUNAGA, J.; WAGAR, E. A. Leptospiral Outer Membrane Proteins OmpL1 and LipL41 Exhibit Synergistic Immunoprotection. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 6572-6582, 1999.

HAMBURGER, Z. A., BROWN, M. S., ISBERG, R. R., BJORKMAN, P. J. Crystal structure of invasin: a bacterial integrin-binding protein. **Science**, v. 286, p. 291-295, 1999.

IKOEV, V. N.; GORBUNOV, M. A.; VACHAEV, B. F.; IAGOVKIN, E. A.; KONDRATENKO, V. F.; ANAN'INA, I.; ANSIMOVA, T. I.; KOSTINA, N. I.; IUR'EVA, I. L.; NIKITIN, M. G. The evaluation of the reactogenicity and immunogenic activity of a new concentrated inactivated leptospirosis vaccine. **Zhurnal mikrobiologii epidemiologii i immunobiologii**. P. 39-43, 1999.

KLIMPEL, G. R.; MATTHIAS, M. A. AND VINETZ, J. M. *Leptospira interrogans* Activation of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Preferential Expansion of TCR $\gamma\delta^+$ T Cells vs TCR $\alpha\beta^+$ T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 171, p. 1447-1455, 2003.

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**, v. 354, p. 820-825. 1999.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. **Vaccine**, v. 22, p. 1545-1552, 2004

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

LEONARD, F. C.; QUINN, P. J.; ELLIS, W. A Possible effect of pH on the survival of leptospires in cattle urine **Veterinary Record**. n.131, v.18, p.53-54, 1992.

LEVETT, P. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, n. 14, v. 2, p. 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**, n. 66, v. 6, p. 745-748, 2002.

LINGAPPA J.; KUFFNER T.; TAPPERO J.; WHITWORTH W.; MIZE A.; KAISER R.; MCNICHOLL J. HLA-DQ6 and ingestion of contaminated water: possible gene-environment interaction in an outbreak of Leptospirosis. **Genes Immunology**. n.5, v. 3, p. 197-202, 2004.

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**, v. 34, p. 1-4, 2003

LUTTMANN, W.; BRATKE, KAI; KÜPPER, M.; MYRTEK, D. Immunology, USA: **Academic Press**, p. 413, 2006.

LUO, Y.; FREY, E. A.; PFUETZNER, R. A.; CREAGH, A. L.; KNOECHEL, D. G.; HAYNES, C. A. Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. **Nature**, v. 405, p. 1073-1077, 2000.

MARTINEZ, S. R.; PEREZ, S. A.; BARO, S. M.; ALVAREZ, A. M.; MENENDEZ, H. J.; DIAZ, G. M.; CRUZ, D. L. P.; DE LOS, R. G.; MONTOYA, B. B.; SIERRA, G. G.; ARMESTO, D. R.; SALTAREN, C. A.; SABOURNIN, R. O. Evaluation of the effectiveness of a new vaccine against human leptospirosis in groups at risk. **Revista Panamericana Salud Publica**, v. 8, p. 385-392, 2000.

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**, n. 49, v. 4, p. 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**, n. 73, v.1, p. 70-78, 2005.

MARIYA, R.; CHAUDHARY, P.; KUMAR, A. A.; THANGAPANDIAN, E.; AMUTHA, R.; SRIVASTAVA, S. K. Evaluation of a recombinant LipL41 antigen of *Leptospira interrogans* serovar Canicola in ELISA for serodiagnosis of bovine Leptospirosis. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*, n. 29, v. 5-6, p. 269-77, 2006.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Leptospirose**, 2º ed. Brasília: FNS, p.98, 1995.

NALLY, J. E.; FISHBEIN, M. C.; BLANCO, D. R.; LOVETT, M. A. Lethal Infection of C3H/HeJ and C3H/SCID Mice with an Isolate of *Leptospira interrogans* Serovar Copenhageni. **Infection and Immunity**, n. 10, v. 73, p. 7014–7017, 2005.

NASCIMENTO, A. L. T. O.; KO, A. I.; DELLAGOSTIN, O. A. *et al* Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 2164-2172, 2004.

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**, n. 67, v. 3, p. 249-254, 2005.

PALANIAPPAN, R. U.; CHANG, Y. F.; CHANG, C. F.; PAN, M. J.; YANG, C. W.; HARPENDING, P.; MCDONOUGH, S. P.; DUBOVI, E.; DIVERS, T.; QU, J.; ROE, B. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. **Molecular and Cellular Probes**, n.19, v. 2, p. 111-117, 2005.

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**, n. 70, v. 11, p. 5924-5930, 2002.

PALANIAPPAN, R. U.; CHANG, Y. F.; HASSAN, F.; MCDONOUGH, S. P.; PUGH, M.; BARR, S. C.; SIMPSON, K. W.; MOHAMMED, H. O.; SHIN, S.; MCDONOUGH, P.; ZUERNER, R. L.; QU, J.; ROE, B. Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by *Leptospira interrogans* and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA. **Journal of Medical Microbiology**, n. 53, v. 10, p. 975-984, 2004.

PALANIAPPAN, R. U.; MCDONOUGH, S. P.; DIVERS, T. J.; CHEN, C. S.; PAN, M. J.; MATSUMOTO, M.; CHANG, Y. F. Immunoprotection of Recombinant Leptospiral Immunoglobulin-Like Protein A against *Leptospira interrogans* Serovar Pomona Infection. **Infection and immunity**, n. 74, v. 3, p. 1745-1750, 2006.

PASQUALINI, R.; ARAP, W. Hybridoma-free generation of monoclonal antibodies. **PNAS**, n. 1, v. 101, p. 259, 2004.

PETCHCLAI, B.; HIRANRAS, S.; POTHAN, U. Gold immunoblot analysis of IgM-specific antibody in the diagnosis of human leptospirosis. **American Journal Tropical Medical Hygiene**, v. 45, p. 672-675, 1991.

PETERSON, N. C. Advances in Monoclonal Antibody Technology: Genetic Engineering of Mice, Cells, and Immunoglobulins. **ILAR Journal**, 2005 ;n. 46, v. 3, p. 314-319

RIBEIRO, M. A.; SOUZA, C. C.; ALMEIDA, S. H. Dot-ELISA for human leptospirosis employing immunodominant antigen. **Journal Tropical Medical Hygiene**, v. 98, p. 452-456, 1995.

SAENGJARUK, P.; CHAICUMPA, W.; WATT, G.; BUNYARAKSYOTIN, G.; WUTHIEKANUN, V.; TAPCHASRI, 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**, n. 40, v. 2, p. 480-489, 2002.

SEIJO, A.; COTO, H.; SAN JUAN, J.; VIDELA, J.; DEODATO, B.; CERNIGOI, B.; MESSINA, O. G.; COLLIA, O.; BASSADONI, D.; SHTIRBU, R.; OLENCHUK, A.; MAZZONELLI, G. D.; PARMA, A. Lethal leptospiral pulmonary hemorrhage: an emerging disease in Buenos Aires, Argentina. **Emergency Infection Diseases**, v. 8, p. 1004-1005, 2002.

SILVA, J. J.; DALSTON, M. O.; CARVALHO, J. E.; SETUBAL, S.; OLIVEIRA, J. M.; PEREIRA, M. M. Clinicopathological and immunohistochemical features of the severe 14 pulmonary form of leptospirosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 395-399, 2002.

SILVA, M. V.; NAKAMURA, P. M.; CAMARGO, E. D.; BATISTA, L.; VAZ, A. J.; ROMERO, E. C.; BRANDÃO, A. P. Immunodiagnosis of human leptospirosis by dot-ELISA for the detection of IgM, IgG, and IgA antibodies. **American Journal Tropical Medical Hygiene**, v.56, p. 650-655, 1997.

SINAN (SISTEMA DE INFORMAÇÕES DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO). Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb>

SURUJBALLI O.; HOWLETT, C; HENNING, D. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo type hardjobovis and *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjoprajitno. *Canadian Journal Veterinary Research*, n. 63, v. 1, p. 62-68, 1999.

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**, v. 71, p. 149-159, 2000.

TERSPSTRA, W. J.; KORVER H.; LEEUWEN, J. V.; KLATSER, P. R.; KOLK H. J. The classification of serjoe group serovars of *Leptospira interrogans* with monoclonal antibodies. **Zentral Bacteriologii Mikrobiologii**, v. 256, p. 498-506, 1985.

VINETZ, J. M.; GLASS, G. E.; FLEXNER, C. E.; MUELLER, P.; KASLOW, D. C. Sporadic urban leptospirosis. **Annual International Medicine**, v. 125, p.794-98, 1996.

VERMA, A.; HELLWAGE, J.; ARTIUSHIN, S.; ZIPFEL, P. F.; KRAICZY, P.; TIMONEY, j. F.; STEVENSON, B. LfhA, a novel Factor H-Binding Protein of *Leptospira interrogans*. **Infection and Immunity**, v.74, p. 2659-2666, 2006.

VIRIYAKOSOL, S.; MATTHIAS, M. A.; SWANCUTT, M. A.; KIRKLAND, T. N.; VINETZ, J. M. Toll-Like Receptor 4 Protects against Lethal *Leptospira interrogans* Serovar Icterohaemorrhagie Infection and Contributes to In Vivo Control of Leptospiral Burden. **Infection and Immunity**. v.74, p. 887-895, 2006.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Human Leptospirosis**: Guidance for diagnosis, surveillance and control. p. 109, 2003.

WINTER, G., GRIFFITHS, A. D., HAWKINS, R. E. & HOOGENBOOM, H. R. **Annu. Rev. Immunol.** 12, 433–455 (1994)

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**, v. 69, p. 173 -187, 1999.

ZHUO, J. T.; WANG, S. S.; LAN, W. L. A discussion on setting up target age group for immunization against leptospirosis. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi**, v. 24, p. 33-42, 1995.