

DE602 - Doenças endêmicas negligenciadas

[1234] **AVALIAÇÃO DA ADESÃO IN VITRO DE MUTANTES DE LEPTOSPIRA BIFLEXA EXPRESSANDO FATORES PUTATIVOS DE VIRULÊNCIA, LIG A E LIGB, EM CÉLULAS RENAI.**

FIGUEIRA, C.P.; CRODA, J.H.; WUNDER JR, E.A.; VANNIER SANTOS, M.A.; REIS, M.G.; PICARDEU, M.; KO, A.I.; KJ, J.

Cpqgm-fiocruz, Salvador, Ba, Brasil.

Resumo:

Introdução: A leptospirose é uma zoonose causada por bactérias do gênero *Leptospira*. A forma grave da doença é caracterizada por icterícia, falência renal aguda e hemorragia, podendo levar ao óbito. Pouco é conhecido sobre os mecanismos de virulência de *Leptospira*. A manipulação genômica é fundamental para o estudo de fatores de virulência. Identificamos previamente os fatores putativos de virulência, as proteínas LigA e LigB (*Leptospiral Immunoglobulin-like A e B*), expressas na superfície de leptospiros patogênicas e que foi demonstrado ter um papel como adesinas de fibronectina.

Objetivo: Usando complementação, desenvolver mutantes da saprófita, *Leptospira biflexa* cepa Patoc I, que expressam as proteínas LigA ou LigB, e examinar o papel destas moléculas na adesão dos mutantes com células renais de hospedeiro in vitro.

Material e Métodos: Os genes *ligA* ou *ligB* foram clonados em um plasmídeo replicativo contendo o promotor de *flgB* de *Borrelia burgdorferi* e cassete de resistência a espectinomicina. A transformação do plasmídeo em *L. biflexa* foi realizada através de eletroporação e os clones resistentes a espectinomicina foram selecionados e confirmados através de PCR. Os clones knock in obtidos foram denominados Patoc *ligA+* e Patoc *ligB+*. A expressão de LigA ou LigB foi avaliada através de western blot e imunofluorescência indireta. Ensaios de associação foram realizados utilizando células MDCK cultivadas em meio DMEM com 10% de SBF sobre lamínulas redondas. As leptospiros foram incubados com as células durante 1h numa relação célula:*Leptospira* de 1:50. A marcação das leptospiros aderidas foi realizada através de imunofluorescência indireta, com contra-coloração com DAPI e alcian blue. A contagem de dez campos aleatórios foi realizada em microscópio de fluorescência em objetiva de 100x.

Resultados: O imunoblot confirmou a presença de LigA em Patoc *ligA+* e LigB em Patoc *ligB+*, utilizando anti-*ligB*rep monoclonal. Os ensaios de imunofluorescência demonstraram a expressão de LigA na superfície de mutante Patoc *ligA+*. No ensaio de associação observou-se que Patoc selvagem aderiu 19,7 leptospiros/100 células, Patoc *ligA+* 24,6 e Patoc *ligB+* 25, estes resultados são a média da contagem em triplicata de um experimento. Não foi verificada diferença estatística entre os grupos utilizando teste anova não-paramétrico.

Conclusão: A presença das proteínas LigA ou LigB não aumentou a capacidade da saprófita *L. biflexa* Patoc na adesão em células de hospedeiro. Ao contrário dos achados anteriores que indicam que LigA e LigB têm um papel na associação com células de hospedeiro e com componentes de matriz extracelular, nossos resultados indicam que as proteínas não são diretamente envolvidas no mecanismo de aderência durante a patogênese de leptospirose.