

OBTENÇÃO DE DUAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES PARA O DESENVOLVIMENTO DE VACINA CONTRA LEPTOSPIROSE

VALIATI, Fernanda E^{1*}; XIMENDES, Carolina¹; GRASSMANN, André A¹; DELLAGOSTIN, Odir A¹; SILVA, Everton F².

¹ Unidade de Biotecnologia - Centro de Desenvolvimento Tecnológico

² Departamento de Veterinária Preventiva – Faculdade de Veterinária
Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil.

[*f.e.valiati@gmail.com](mailto:f.e.valiati@gmail.com)

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença emergente negligenciada especialmente nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. É uma zoonose cosmopolita causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* ssp. e encontrada mais comumente em áreas tropicais e sub-tropicais, onde as condições ambientais e sócio-econômicas favorecem a sua transmissão (Adler e de la Pena Moctezuma, 2010). Tem sido identificada nos últimos anos como um problema global de saúde pública, pois aumenta as taxas de mortalidade e de morbidade (Ganoza et al. 2010).

A transmissão da leptospirose em humanos e animais domésticos ocorre incidentalmente pela exposição à água ou solo contaminados pela urina de animais infectados ou por contato direto com esses animais. Quando disseminada dentro do hospedeiro a *Leptospira* patogênica pode causar desde sintomas como febre até manifestações mais severas, podendo levar à morte (Ellis, 1994; Faine et al., 1999).

Devido às perdas econômicas causadas pela doença e os prejuízos em termos de saúde pública se faz necessário o uso de vacinas em humanos e animais. Deste modo, o desenvolvimento de novas estratégias para a prevenção da leptospirose é indispensável. Atualmente, as vacinas disponíveis são constituídas de células inteiras inativadas, chamadas bacterinas, ou preparados da membrana de *Leptospiras* patogênicas, as quais induzem imunidade sorovar específica e pouco duradoura, além de reações adversas. Dessa forma não proporcionam proteção cruzada contra os diferentes sorovares que podem causar a leptospirose (Faine et al. 1999). Diante dessa limitação, o desenvolvimento de uma vacina multi-sorovar, que gere proteção cruzada contra os diferentes sorovares de *Leptospira*, ainda representa um grande desafio (McBride et al., 2005). Entretanto, proteínas de membrana externa são apontadas como potenciais alvos vacinais, devido a sua localização na superfície da célula e a sua participação na interação com o hospedeiro (DELLAGOSTIN, et al., 2011).

O objetivo desse estudo foi realizar a clonagem dos genes, expressão e purificação de duas novas proteínas de superfície de *Leptospira* patogênica, LIC20087 e LIC11207. Estas proteínas serão utilizadas no desenvolvimento de vacinas recombinantes para o controle da leptospirose.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Análise *in silico* do genoma de *L. interrogans* sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* sorovar *Copenhageni* cepa *Fiocruz L1-130* foi realizada para identificar genes alvos potenciais para desenvolvimento de vacinas de subunidade. *Primers* foram desenhados utilizando o software Vector NTI 11 (Invitrogen). As

sequências codificadoras selecionadas foram amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir do genoma de *L. borgpetersenii* virulenta do sorogrupo Ballum cepa 4E (Diniz 2011) e ligados no vetor pAE de expressão em *Escherichia coli*. O produto da ligação foi utilizado para transformar *E. coli* TOP10 através de eletroporação. Os clones recombinantes foram selecionados através de uma triagem por extração rápida de DNA plasmideal com fenol-clorofórmio e confirmados por digestão com enzimas de restrição.

Os vetores recombinantes purificados foram utilizados para transformar a cepa de expressão *E. coli* (DE3) Star. Após a transformação, as células foram cultivadas em meio LB com 100 µg/mL de ampicilina a 37 °C. Logo que crescida até a fase exponencial a expressão foi induzida por IPTG. A solubilização das proteínas foi realizada com tampão de purificação contendo 8M de ureia e as proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade ao Ni⁺ no sistema automatizado AKTAprime. As proteínas purificadas foram visualizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e por *western blot* (WB) com anticorpo anti-6xHis.

Finalmente, a presença destes genes em diferentes sorovares de leptospiros patogênicos foi avaliada por PCR com os mesmos *primers* utilizados para a clonagem. Foram utilizados como DNA molde para PCR o DNA genômico das seguintes espécies e sorovares: *L. interrogans* sorovares *Pomona*, *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae*, *Autumnalis*, *Bataviae*, *Bratislava*, *Djasiman*, *Hebdomadis* e *Muenchen*; *L. borgpetersenii* sorovares *Ballum*, *Castellonis*, *Mini*, *Poi*, *Sejroe* e *Javanica*; *L. kirshneri* sorovares *Grippotyphosa* and *Cynopteri* e *L. santarosai* sorogrupo *Pomona*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dois genes foram identificados e selecionados para expressão de proteínas recombinantes em sistema de expressão heteróloga em *E. coli* os *lic11207* e *lic20087*. O primeiro codifica para uma lipoproteína e o segundo codifica para uma proteína de membrana externa. O processo de clonagem resultou nos vetores recombinantes *pAE/lic2008* e *pAE/lic11207* (Fig. 1A). A caracterização dos vetores pela digestão pela enzima de restrição XbaI resultou em um padrão de fragmentação condizente ao esperado: 2814pb e 1005pb para *pAE/lic11207* e 3219pb e 432pb para *pAE/lic2008* (Fig. 1B).

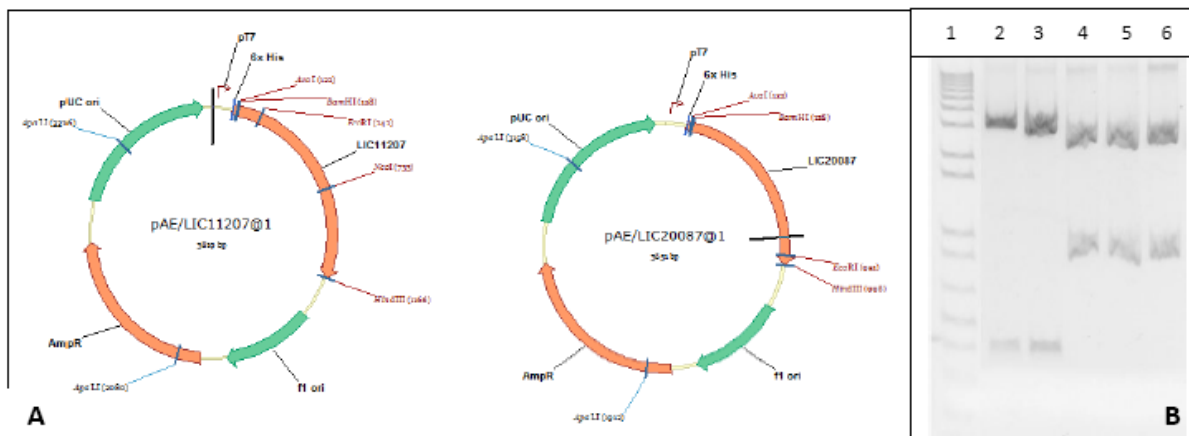


Figura 1. Obtenção dos vetores recombinantes *pAE/lic2087* e *pAE/lic11207*. A) Mapa esquemático dos vetores recombinantes obtidos no software Vector NTI 11. B) Caracterização dos vetores recombinantes pela digestão com a enzima de restrição *XbaI*. Legenda: 1, marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); 2 e 3, clones de *pAE/lic11207*; 4 e 6, clones de *pAE/lic2087*.

As proteínas foram eficientemente expressas em *E. coli* Star e purificadas. O WB realizado com anticorpo anti-6xHis identificou as proteínas recombinantes purificadas no tamanho esperado, 33.75 kDa para rLIC2087 e 37.35 kDa para rLIC11207 (Fig. 2). A purificação resultou em alíquotas de proteínas em alto grau de pureza, com um rendimento de aproximadamente 10 mg.mL⁻¹ de cultura para cada proteína.

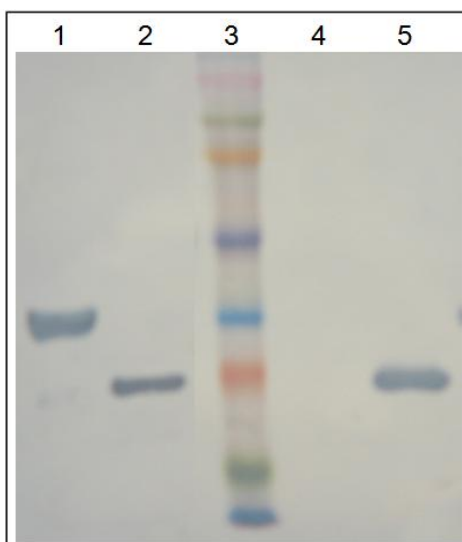


Figura 2. Western blot mostrando as proteínas recombinantes rLIC2087 e rLIC11207. Legenda: 1, rLIC11207; 2- rLIC2087; 3, marcador de peso molecular pré-corado Full Range Rainbow Marker (GE Healthcare); 4, extrato total de *E. coli* Star (controle negativo); 5, rLipL32 (controle positivo).

Ambos os genes foram amplificados a partir de todos os genomas de leptospiros patogênicos testados (dados não mostrados). Este resultado fornece evidências de que LIC11207 e LIC2087 são proteínas conservadas em um grande número de sorovares patogênicos e uma vacina constituída por estas proteínas têm

potencial para o desenvolvimento de uma vacina de amplo espectro contra a leptospirose.

4 CONCLUSÃO

As proteínas rLIC20087 e rLIC11207 são antígenos potenciais para a produção de uma vacina com proteção cruzada contra leptospirose. A expressão em sistema *E. coli* de expressão heteróloga e a purificação por cromatografia de afinidade foram eficientes para a obtenção destas proteínas. Futuros experimentos envolvem a avaliação do caráter imunoprotetor dessas proteínas no modelo animal hamster, através de desafios homólogo e heterólogo.

5 REFERÊNCIAS

ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. de la Peña. *Leptospira and leptospirosis*. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 287-296, 2010.

ELLIS, W.A. Leptospirosis as cause of reproductive failure. **Veterinary Clinics of North America: Food and animal practice**, v.10, n.3, p.463-478, 1994.

FAINE, S. B.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira and Leptospirosis*. **MediSci: Melbourne**, 272p, 1999.

GANOZA, C.; MATTHIAS, M.A.; SAITO, M.; CESPEDES, M.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J.M. Asymptomatic Renal Colonization of Humans in the Peruvian Amazon by *Leptospira*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, Peru, v. 4, 2010.

McBRIDE, A.J.A.; ATHANAZIO, D.A.; REIS, M.G.; KO, A.I. Leptospirosis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 18, p. 376-386, 2005.

DELLAGOSTIN, O.A.; GRASSMANN, A.A.; HARTWIG, D.D.; FELIZ, S.R.; DA SILVA, E.F.; McBRIDE, A.J. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Hum Vaccin**, v.7, n.11, p.1215-1224, 2011.