

antígeno (Conceição et al. 2006). Desta forma, LTB representa uma alternativa eficiente como adjuvante para vacinas recombinantes.

O objetivo deste trabalho foi construir, expressar e caracterizar uma quimera recombinante composta pela fusão da LTB com LipL32, visando o desenvolvimento de vacina contra leptospirose.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A seqüência codificadora do gene *lipL32* foi amplificada por PCR e clonada no vetor de expressão em *E. coli* contendo o gene *ltb* (pAE-*ltb*). O vetor pAE fusiona à proteína de interesse uma cauda de seis histidinas, permitindo a sua purificação por cromatografia de afinidade.

O vetor recombinante foi inserido por eletroporação na cepa de expressão *E. coli* BL21(DE3) Star. Durante o cultivo, a expressão da proteína recombinante foi induzida com 0,3 mM de IPTG. A cultura foi centrifugada e o *pellet* foi lavado quatro vezes com solução tampão de fosfato (PBS) pH 7.4, contendo 0,05 % de Triton X-100. Em seguida, o *pellet* restante da última lavagem foi tratado com tampão contendo 0,2 % do agente desnaturante *N-Lauroylsarcosine*, incubado a 4 °C por 24 h e centrifugado. O sobrenadante contendo a quimera recombinante em alto grau de pureza foi examinado em eletroforese em gel de poliacrilamida 15 % (SDS-PAGE). Após esta purificação realizou-se diálise para a retirada do desnaturante. A quimera rLTB-LipL32 purificada e dialisada foi submetida à nova SDS-PAGE para observação da pureza bem como da massa molecular aparente.

A quimera foi transferida para uma membrana de nitrocelulose, por eletrotransferência na técnica de *Western blot* (WB). Após bloqueio com leite em pó desnatado, as membranas foram incubadas com soro policlonal de coelho anti-LTB, anticorpo monoclonal (MAb) anti-LipL32 e MAb anti-6xhis. Após a incubação das membranas com conjugados anti-coelho ou anti-camundongo, as reações foram reveladas com diaminobenzidina e H₂O₂. Como controles utilizou-se extrato de *E. coli* BL21(DE3) Star, as subunidades da quimera (rLTB e rLipL32) e duas outras quimeras recombinantes rLTB-P42 e rR1-LipL32.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A região codificadora do gene *lipL32* foi eficientemente clonada no vetor pAE-*ltb*, gerando o vetor pAE-*ltb-lipL32*. O nível de expressão da quimera rLTB-LipL32 pela cepa de *E. coli* BL21(DE3) Star foi satisfatório. As sucessivas lavagens do *pellet* de células com PBS-Triton X-100 removeu a grande maioria das proteínas de *E. coli*, enquanto a quimera recombinante permaneceu no *pellet*, indicando que foi expressa na forma insolúvel e em corpos de inclusão. A solubilização destes corpos de inclusão foi realizada com tampão contendo 0,2 % de *N-Lauroylsarcosine*. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi analisado em SDS-PAGE, onde se observou alto grau de pureza da quimera, não havendo necessidade de purificação por cromatografia de afinidade. Este sobrenadante contendo rLTB-LipL32 pura foi então dialisado contra tampão NaCl 200 mM e Tris-HCl 100 mM pH 8,0. A proteína purificada e dialisada apresentou massa molecular aproximada de 41 kDa, condizente com o esperado.

A antigenicidade da quimera foi avaliada mediante WB com anticorpos específicos para as subunidades LTB e LipL32, como pode ser observado na Figura 1.

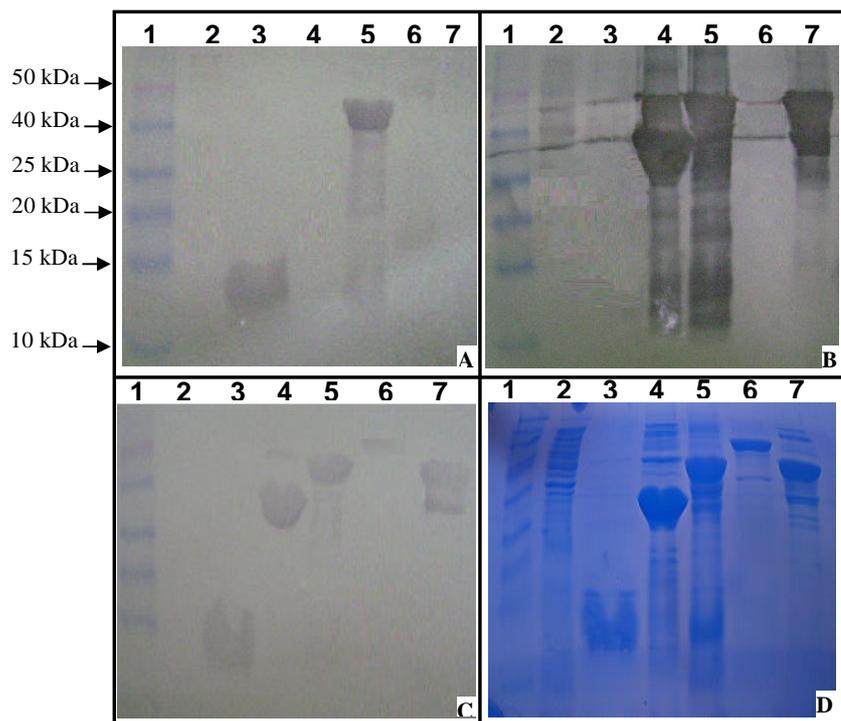


Figura 1. *Western Blot* da quimera com anticorpos específicos para cada subunidade. A, anti-LTB; B, anti-LipL32; C, anti-6xhis; D, SDS-PAGE. Em todos: 1- Marcador de massa molecular BenchMark™ Pre-stained (Invitrogen); 2- extrato de *E. coli*; 3- rLTB; 4- rLipL32; 5- rLTB-LipL32; 6- rLTB-P42; 7- rR1-LipL32.

O WB realizado com anticorpo policlonal anti-LTB teve reação positiva específica com todas as proteínas que possuem LTB em sua molécula (rLTB, rLTB-LipL32 e rLTB-P42). Da mesma forma, aquele realizado com MAb anti-LipL32 reagiu positivamente com as proteínas que possuem LipL32 (rLipL32, rLTB-LipL32 e rR1-LipL32). O tamanho de todas as proteínas observadas seguiu o esperado. O WB realizado com MAb anti-6xhis reconheceu todas as proteínas, uma vez que as mesmas foram produzidas com fusão da cauda com 6 histidinas. Nenhum anticorpo reconheceu o extrato de *E. coli* BL21(DE3) Star. Estes resultados sugerem que a fusão não alterou significativamente a conformação das proteínas, permitindo que anticorpos gerados contra cada uma das proteínas individualmente reconhecessem também a quimera.

4. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que as estratégias adotadas para a obtenção da quimera recombinante rLTB-LipL32 foram eficazes. A caracterização antigênica evidenciou a identidade das subunidades LTB e LipL32, mostrando que a fusão conservou epítopos imunogênicos. O potencial da quimera rLTB-LipL32 como vacina contra a leptospirose está sendo avaliado em hamsters, através de imunização e desafio com cepas patogênicas de *Leptospira interrogans*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bharadwaj,R. 2004. Leptospirosis--a reemerging disease? Indian J. Med. Res. **120**: 136-138.
- Bharti,A.R., Nally,J.E., Ricaldi,J.N., Matthias,M.A., Diaz,M.M., Lovett,M.A., Levett,P.N., Gilman,R.H., Willig,M.R., Gotuzzo,E., and Vinetz,J.M. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet Infect. Dis. **3**: 757-771.
- Conceição,F.R, Moreira,A.N., Dellagostin,O.A. 2006. A recombinant chimera composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. Vaccine; 24:5734-43.
- Cullen,P.A., Cordwell,S.J., Bulach,D.M., Haake,D.A., and Adler,B. 2002. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. Infect. Immun. **70**: 2311-2318.
- Cullen,P.A., Xu,X., Matsunaga,J., Sanchez,Y., Ko,A.I., Haake,D.A., and Adler,B. 2005. Surfaceome of *Leptospira* spp. Infect. Immun. **73**: 4853-4863.
- De Haan,L., Verweij,W.R., Feil,I.K., Holtrop,M., Hol,W.G.J., Agsteribbe,E., et al. 1998. Role of GM1 binding in the mucosal immunogenicity and adjuvant activity of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit. Immunology; 94:424-30.
- Gamberini, M., Gomez,R.M., Atzingen, M.V., Martins, E.A., Vasconcellos, S.A., Romero,E.C., Leite,L.C., Ho,P.L., and Nascimento,A.L. 2005. Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. FEMS Microbiol. Lett. **244**: 305-313.
- Levett,P.N. 2001. Leptospirosis. Clin. Microbiol. Rev. **14**: 296-326.
- McBride,A.J., Athanazio,D.A., Reis,M.G., and Ko,A.I. 2005. Leptospirosis. Curr. Opin. Infect. Dis. **18**: 376-386.
- Nashar,T.O., Hirst,T.R., Williams,N.A. 1997. Modulation of B-cell activation by the B subunit of *Escherichia coli* enterotoxin: receptor interaction up regulates MHC class II, B7, CD40, CD25 and ICAM-1. Immunology; 91:572-8.
- Seixas,F.K., Fernandes,C.H., Hartwig,D.D., Conceição,F.R., Aleixo,J.A.G., Dellagostin,O.A., Evaluation of different ways of presenting LipL32 to the immune system with the aim of developing a recombinant vaccine against leptospirosis. 2007. Can. J. Microbiol.; 53: 472-479.
- Weltzin,R., Guy,B., Thomas,W.D., Giannasca,P.J., Monath,T.P. 2000. Parenteral adjuvant activities of *Escherichia coli* heat-labile toxin and its B subunit for immunization of mice against *Helicobacter pylori* infection. Infect Immun; 68:2775-82.
- Williams,N.A. 2000. Immune modulation by the cholera-like enterotoxin B-subunits: from adjuvant to immunotherapeutic. Int J Med Microbiol; 290(4-5):447-53.