

## LEPTOSPIROSE BOVINA: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOPROTEÍNAS RECOMBINANTES PARA O USO EM VACINAS

TANISE PACHECO FORTES<sup>1</sup>; AMILTON CLAIR SEIXAS NETO<sup>2</sup>; CAROLINE DEWES<sup>1</sup>; GILMAR BATISTA MACHADO<sup>1</sup>; JESSICA WALDMAN<sup>3</sup>; ÉVERTON FAGONDE DA SILVA<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Pós-graduando do Programa de Pós-graduação em Veterinária da UFPel – [tanisefortes@gmail.com](mailto:tanisefortes@gmail.com); [caroldewes@hotmail.com](mailto:caroldewes@hotmail.com); [gilmar.machado84@hotmail.com](mailto:gilmar.machado84@hotmail.com)

<sup>2</sup>PNDP do Programa de Pós-graduação em Veterinária da UFPel – [amiltonseixas@gmail.com](mailto:amiltonseixas@gmail.com)

<sup>3</sup>Graduanda do Curso de Biotecnologia da UFPel – [jessica.waldman@hotmail.com](mailto:jessica.waldman@hotmail.com)

<sup>4</sup>Professor da Faculdade de Veterinária da UFPel – [fagondee@gmail.com](mailto:fagondee@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose causada por bactérias do gênero *Leptospira* que afeta humanos e animais (LUCAS et al., 2011). Roedores albergam a bactéria nos túbulos renais antes de eliminá-la através da urina, contaminando o ambiente (MIRAGLIA et al., 2013). A infecção dos hospedeiros suscetíveis acontece pelo contato com animais portadores ou através da exposição à água, ao solo e à urina contaminada (MIRAGLIA et al., 2013; MONTE et al., 2015). Em bovinos, a doença cursa com diminuição na produção de leite, morte fetal e aborto, gerando grandes perdas econômicas (LUCAS et al., 2014). Atualmente, as vacinas disponíveis contra a leptospirose bovina são bacterinas que induzem resposta imune humoral, predominantemente contra o LPS bacteriano, não fornecendo proteção cruzada contra diferentes sorovares e causando uma série de efeitos colaterais (ZENG et al., 2015).

Nos últimos anos, diversos estudos tem focado no desenvolvimento de vacinas recombinantes contra a leptospirose (MATSUNAGA et al., 2003). As proteínas da membrana externa (OMPs) são apontadas como potenciais imunógenos devido à sua localização na superfície da célula e à sua participação na interação com o hospedeiro (LUCAS et al., 2011). Diferentes tipos de OMPs já foram caracterizados: as lipoproteínas, as adesinas e as porinas (ZUERNER et al., 2000). De acordo com LUO et al. (2010), as lipoproteínas tem demonstrado ser antígenos capazes de induzir uma resposta imune protetora. Baseado nestas informações, o objetivo deste trabalho foi produzir e caracterizar quatro antígenos recombinantes com potencial para conferir proteção de amplo espectro contra a leptospirose bovina.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1 Cepas, condições de cultivo e extração de DNA

Para a realização deste estudo a cepa utilizada foi *Leptospira interrogans* Copenhageni Fiocruz L1-130. O cultivo das bactérias foi realizado em meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) enriquecido com suplemento comercial. As culturas foram mantidas em estufa bacteriológica a 29°C, sob condições de anaerobiose. As células bacterianas foram usadas para extração do DNA genômico com o auxílio de kit comercial. Para clonagem e expressão, foram utilizadas cepas de *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen®) e *E. coli* BL21 Star (DE3) (Invitrogen®). As cepas foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB), numa temperatura de 37°C, sob agitação de 200 rpm e suplementado com 100 µg.mL<sup>-1</sup> de ampicilina quando necessário.

## 2.2 Escolha de Lics e desenho dos primers

A seleção das quatro sequências codificadoras foi realizada a partir das informações genômicas disponíveis no banco de dados GenBank (NCBI). A escolha foi baseada em informações sobre proteínas correspondentes, obtidas de análises no banco de dados UniProt Knowledgebase (UniProtKB). As características desejáveis para incluir uma sequência codificadora no trabalho foram: proteínas de membrana externa expostas na superfície e prováveis lipoproteínas, cuja função esteja relacionada a algum processo patogênico e que ainda não tenham sido avaliadas quanto à imunoproteção. Os primers foram desenhados com o auxílio do software VECTOR NTI 11 (Invitrogen®). Cada primer adicionou, a uma extremidade da sequência alvo, um sítio para enzima de restrição, permitindo a clonagem no vetor pAE de expressão heteróloga em *E. coli*. Quando presente, a sequência para o peptídeo sinal não foi incluída na porção do gene amplificada.

Tabela 1 – Sequência dos primers utilizados.

Genes	Sequência dos primers	Tamanho do gene (pb)
<i>Lip01</i>	F CGGGATCCCAAATGTAAAACGAATCTC R GGGAAGCTTTTAAGGAGATGATTGAACCG	350
<i>Lip02</i>	F CGGGATCCAGCGGCGAAACAGT R GGGAAGCTTTTATTTACAAGCGTTTGGAGC	1080
<i>Lip03</i>	F CGGGATCCAATGAAGGAGGAAATGAAAAT R GGGAAGCTTTTAGTTACAAGCTCCCGAAGC	1015
<i>Lip04</i>	F CGGGATCCTTGATTTTTTTTGTAAAGCGG R GGGAAGCTTTTATTTTCCAAATAGAAGGAATCT	596

## 2.3 Amplificação dos genes por reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para amplificação das sequências codificadoras dos genes selecionados, foi realizada a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), que utilizou como molde o DNA genômico de *Leptospira interrogans* Copenhageni Fiocruz L1-130 e a enzima Taq DNA Polimerase. O produto da reação foi purificado com o auxílio de kit comercial e visualizado por gel de agarose 1%.

## 2.4 Análises da presença dos genes em *Leptospira* spp.

A presença dos genes entre *Leptospira* spp. foi analisada através de PCR, utilizando como molde o DNA genômico de sorovares de *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 e Cynopteri; e *L. santarosai* sorogrupo Pomona. Os primers e parâmetros utilizados foram iguais aos descritos no tem 2.3. A amplificação do gene 16s rDNA foi realizada para avaliar a integridade do DNA genômico. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 1%.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A leptospirose bovina costuma ser o resultado da infecção dos animais com o sorovar Hardjo (LUCAS et al., 2014). Apesar disso, outros sorovares podem estar associados com a infecção, incluindo Icterohaemorrhagiae, Bratislava, Pomona, Canicola e Grippotyphosa. Dessa maneira, as vacinas comerciais produzidas contra a doença costumam ser suspensões, contendo um ou mais destes sorovares (MONTE et al., 2015). Nesses casos, o LPS de *Leptospira* spp. é capaz de conferir imunidade protetora contra o desafio com leptospiros homólogas, mas não com leptospiros heterólogas (LUO et al., 2010). O desenvolvimento de potenciais vacinas contra a leptospirose, que sejam seguras e capazes de gerar proteção contra diferentes sorovares da bactéria ainda representa um grande desafio (MCBRIDE et al., 2009). As proteínas da membrana externa e as lipoproteínas são apontadas como potenciais alvos vacinais por sua localização na superfície da célula e sua provável interação com o hospedeiro (DELLAGOSTIN et al., 2011). Neste estudo, foram identificados quatro alvos potenciais que codificam prováveis lipoproteínas associadas à membrana celular: *Lip01*, *Lip02*, *Lip03* e *Lip04*, onde a massa molecular das proteínas resultantes foi de 12,3 kDa, 37,5 kDa, 37,6 kDa e 23,9 kDa, respectivamente. O gel de agarose contendo os genes amplificados através de PCR pode ser visualizado na Figura 1.

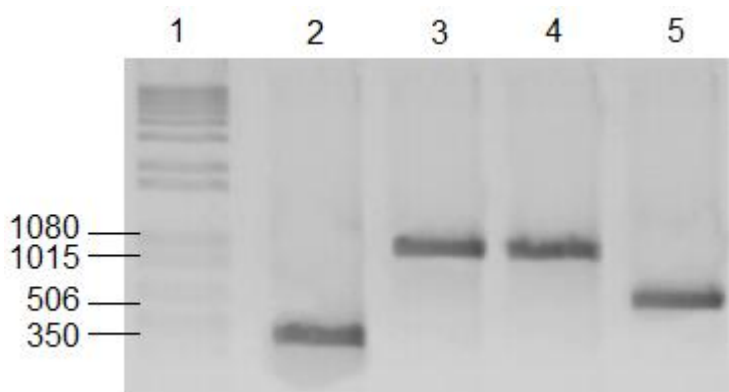


Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos da amplificação por PCR. (1) Marcador de peso molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen®); (2) amplificação *Lip01* (350 pb); (3) amplificação *Lip02* (1080 pb); (4) amplificação *Lip03* (1015 pb); (5) amplificação *Lip04* (506 pb).

Proteínas extraídas de *Leptospira interrogans* parecem capazes de produzir proteção significativa contra diferentes sorovares de leptospiros (LUO et al., 2010). Diversos alvos vacinais potenciais foram identificados e encontram-se na membrana externa da bactéria. Entre esses alvos, as OMPs se destacam por serem altamente conservadas entre as espécies patogênicas e por isso tem sido o foco no desenvolvimento de novas vacinas com o objetivo fornecer proteção heteróloga (LUCAS et al., 2011). Ao longo dos anos, estudos para a identificação de componentes imunogênicos com potencial para o desenvolvimento de vacinas recombinantes vem sendo realizados (MATSUNAGA et al., 2003). As análises realizadas neste trabalho apontaram para genes que parecem codificar lipoproteínas. Espera-se que estas proteínas recombinantes sejam capazes de induzir imunidade em animais desafiados com cepas patogênicas de *Leptospira* spp.

#### 4. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram construídos vetores recombinantes funcionais, capazes de expressar as lipoproteínas Lip01, Lip02, Lip03 e Lip04 em sistema procarioto. Estes antígenos apresentam potencial para serem empregados no desenvolvimento de vacinas recombinantes visando o controle da leptospirose bovina.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DELLAGOSTIN, O. A.; GRASSMANN, A. A.; HARTWIG, D. D.; FELIX, S. R.; SILVA, E. F.; MCBRIDE, A. J. A. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Human Vaccines**, v.7, n.11, p.1215-1224, 2011.
- LUCAS, D. S. D.; CULLEN, P. A.; LO, M.; SRIKRAM, A.; SERMSWAN, R. W.; ADLER, B. Recombinant LipL32 and LigA from *Leptospira* are unable to stimulate protective immunity against leptospirosis in the hamster model. **Vaccine**, v.29, p.3413-3418, 2011.
- LUCAS, D. S. D.; LO, M.; BULACH, D. M.; QUINSEY, N. S.; MURRAY, G. L.; ALLEN, A.; ADLER, B. Recombinant LipL32 stimulates interferon-gamma production in cattle vaccinated with a monovalent *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo subtype Hardjovovis vaccine. **Veterinary Microbiology**, v.169, p.163-170, 2014.
- LUO, D.; XUE, F.; OJCIUS, D. M.; ZHAO, J.; MAO, Y.; LI, L.; LIN, X.; YAN, J. Protein typing of major outer membrane lipoproteins from Chinese pathogenic *Leptospira* spp. and characterization of their immunogenicity. **Vaccine**, v.28, p.243-255, 2010.
- MATSUNAGA, J.; BAROCHI, M. A.; CRODA, J.; YOUNG, T. A.; SANCHEZ, Y.; SIQUEIRA, I.; BOLIN, C. A.; REIS, M. G.; RILEY, L. W.; HAAKE, D. A.; ALBERT, K. I. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Molecular Microbiology**, v.49, p.929-945, 2003.
- MCBRIDE, A. J. A.; CERQUEIRA, G. M.; SUCHARD, M. A.; MOREIRA, A. N.; ZUERNER, R. L.; REIS, M. G.; HAAKE, D. A.; KO, A. I.; DELLAGOSTIN, O. A. Genetic diversity of the *Leptospiral* immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic *Leptospira* spp. **Infection, Genetics and Evolution**, v.9, p.196-205, 2009.
- MIRAGLIA, F.; MATSUO, M.; MORAIS, Z. M.; DELLAGOSTIN, O. A.; SEIXAS, F. K.; FREITAS, J. C.; HARTSKEERL, R.; MORENO, L. Z.; COSTA, B. L.; SOUZA, G. O.; VASCONCELLOS, S. A.; MORENO, A. M. Molecular characterization, serotyping, and antibiotic susceptibility profile of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni isolates from Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.77, p.195-199, 2013.
- MONTE, L. G.; RIDIERI, K. F.; JORGE, S. OLIVEIRA, N. R.; HARTWIG, D. D.; AMARAL, M. G.; HARTLEBEN, C. P.; DELLAGOSTIN, O. A. Immunological and molecular characterization of *Leptospira interrogans* isolated from a bovine foetus. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.40, p.41-45, 2015.
- ZENG, L.; ZHUANG, X.; HUANG, L.; ZHANG, Y.; CHEN, C.; DONG, K.; ZHANG, Y.; CUI, Z.; DING, X.; CHANG, Y.; GUO, X.; ZHU, Y. Comparative subproteome analysis of three representative *Leptospira interrogans* vaccine strains reveals cross-reactive antigens and novel virulent determinants. **Journal of Proteomics**, v.112, p.27-37, 2015.
- ZUERNER, R.; HAAKE, D.; ADLER, B.; SEGERS, R. Technological advances in the molecular biology of *leptospira*. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol**, v.2, n.4, p.455-462, 2000.