

OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES PARA O DESENVOLVIMENTO DE VACINA CONTRA A LEPTOSPIROSE BOVINA

TANISE PACHECO FORTES¹; AMILTON CLAIR SEIXAS NETO²; GILMAR
BATISTA MACHADO¹; CAROLINE DEWES¹; PAULA SOARES PACHECO³;
ÉVERTON FAGONDE DA SILVA⁴

¹Pós-graduando do Programa de Pós-graduação em Veterinária da UFPel –
tanisefortes@gmail.com; gilmar.machado84@hotmail.com; caroldewesvet@hotmail.com
²PNPD do Programa de Pós-graduação em Veterinária da UFPel – amiltonseixas@gmail.com
³Graduanda do Curso de Medicina Veterinária da UFPel – paulaa_pacheco@hotmail.com
⁴Professor da Faculdade de Veterinária da UFPel – fagondee@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de ocorrência mundial causada por espécies patogênicas do gênero *Leptospira* (FERNANDES et al., 2016). Nos bovinos, a doença causa falha reprodutiva, gerando perdas econômicas decorrentes da infertilidade e do aborto (BALAKRISHNAN; ROY, 2014). Os animais infectados atuam como fontes de infecção, espalhando o micro-organismo no ambiente através da urina (MONTE et al., 2015). Uma medida de controle utilizada é a vacinação dos bovinos (BALAKRISHNAN; ROY, 2014).

Atualmente, as vacinas disponíveis contra a leptospirose são bacterinas capazes de induzir resposta imune humoral contra o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, mas incapazes de fornecer proteção contra diferentes sorovares de leptospira (ZENG et al., 2015). Diante dessa limitação, diversos estudos tem focado no desenvolvimento de vacinas recombinantes capazes de conferir imunidade de longo prazo contra sorovares heterólogos da bactéria (SILVA et al., 2007). As proteínas da membrana externa (OMPs) constituem bons candidatos para o desenvolvimento de vacinas devido à sua localização na superfície da célula, interação com o hospedeiro e conservação entre as diferentes espécies patogênicas de *Leptospira* (LUCAS et al., 2011).

Neste contexto, o trabalho teve como objetivo realizar a clonagem de genes de duas proteínas de superfície de *Leptospira interrogans*. Estas proteínas serão utilizadas no desenvolvimento de vacinas recombinantes para o controle da 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, cultivada em meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) enriquecido com suplemento comercial. As culturas foram mantidas a 29°C, sob condições de anaerobiose em estufa bacteriológica. A extração do DNA genômico das células bacterianas foi realizada utilizando kit comercial *illustra™ bacteria genomicPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare®). Para a clonagem, foi utilizada a cepa *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen®), cultivada a 37°C em meio Luria-Bertani (LB) suplementado com ampicilina (100 µg.mL⁻¹) quando necessário e mantida sob agitação de 200 rpm por 18 horas.

2.2. Escolha das sequências codificadoras e desenho dos primers

A seleção das sequências codificadoras foi realizada com base nas informações disponíveis no GenBank (NCBI) e a escolha foi baseada em

informações sobre proteínas correspondentes, obtidas de análises realizadas no banco de dados UniProt Knowledgebase (UniProtKB). As sequências incluídas no trabalho parecem estar relacionadas a processos patogênicos e ainda não foram avaliadas quanto à imunoproteção. O software Vector NTI 11 (Invitrogen®) foi utilizado para desenhar os *primers* e sítios para enzimas de restrição foram adicionados nas extremidades das sequências, permitindo a clonagem no vetor pAE de expressão heteróloga em *E. coli*.

2.3. Amplificação e clonagem dos genes no vetor pAE

Para amplificação das sequências codificadoras selecionadas, foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) e os resultados foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. Em seguida, enzimas de restrição foram usadas para digerir o vetor de expressão em *E. coli* e o inserto resultante do produto da PCR. A ligação do inserto ao vetor pAE foi realizada utilizando a enzima T4 DNA ligase à 4°C, *overnight*. A eficiência dessas reações foi visualizada através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. A presença dos genes também foi avaliada em diferentes sorovares de leptospiros patogênicos através de PCR, utilizando os mesmos *primers* da clonagem, utilizando como molde o DNA genômico de *Leptospira interrogans* sorogrupo Canicola e *Leptospira borgpetersenii* sorogrupo Ballum.

2.4. Transformação de *E. coli* e extração dos vetores recombinantes

Os produtos das reações de ligação foram usados para transformar células de *E. coli* TOP10 por choque térmico. Em seguida, as células foram cultivadas em ágar LB suplementado com ampicilina e mantidas a 37°C em estufa bacteriológica por 18 horas. Os clones recombinantes para o plasmídeo foram cultivados e expandidos em meio LB líquido suplementado com ampicilina. A partir deste cultivo foi realizada a extração do DNA plasmídeo com auxílio de kit comercial. Os plasmídeos extraídos foram submetidos à confirmação da presença do inserto através de PCR com os mesmos *primers* utilizados na primeira amplificação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As vacinas contra a leptospirose disponíveis comercialmente são suspensões da célula bacteriana e contém diferentes sorovares de *Leptospira* (MONTE et al., 2015). Nessas formulações, o LPS bacteriano é o responsável por conferir imunidade protetora contra cepas homólogas (LUCAS et al., 2011). A vacina recombinante ideal, por outro lado, deve conter um fragmento único, capaz de conferir imunidade cruzada contra sorovares heterólogos (SILVA et al., 2007).

No caso das leptospiros, as lipoproteínas possuem papéis estruturais importantes, podendo ser enzimas, transportadores, adesinas, toxinas e proteínas essenciais para a virulência bacteriana (LIMA et al., 2013). Recentemente, a anotação dos genomas bacterianos apontou uma série de genes hipotéticos conservados com função desconhecida e que estão presentes em espécies patogênicas de *Leptospira* (FERNANDES et al., 2016). Dois desses genes, Lip05 e Lip06, foram identificados e selecionados para a expressão de proteínas recombinantes em sistema de expressão heteróloga em *E. coli*. Lip05 codifica uma flagelina bacteriana, enquanto Lip06 é um regulador de transcrição. A amplificação desses genes resultou em produtos com 855 pares de base (pb) para Lip05 e 338 pb para Lip06 (Figura 1).

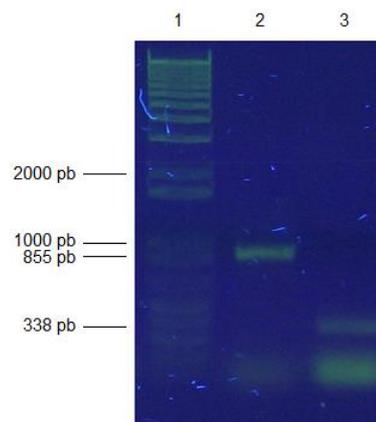


Figura 1. Amplificação de Lip05 e Lip06 por PCR. (1) Marcador de peso molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen®); (2) amplificação de Lip05 (855 pb) para clonagem no vetor pAE; (3) amplificação de Lip06 (338 pb) para clonagem no vetor pAE.

Um dos principais fatores relacionados à patogenicidade de leptospira é a motilidade (FERNANDES et al., 2016). O flagelo incorporado, além de permitir que a bactéria execute o movimento característico de saca rolha que favorece sua disseminação no hospedeiro, pode ser detectado pelo sistema imune (LIMA et al., 2013).

Os genes selecionados foram eficientemente amplificados a partir do DNA genômico de diferentes sorovares de leptospira (Figura 2), evidenciando sua conservação. De acordo com ZENG et al. (2015), proteínas conservadas entre os diferentes sorovares são boas candidatas para o desenvolvimento de uma vacina capaz de fornecer proteção cruzada.

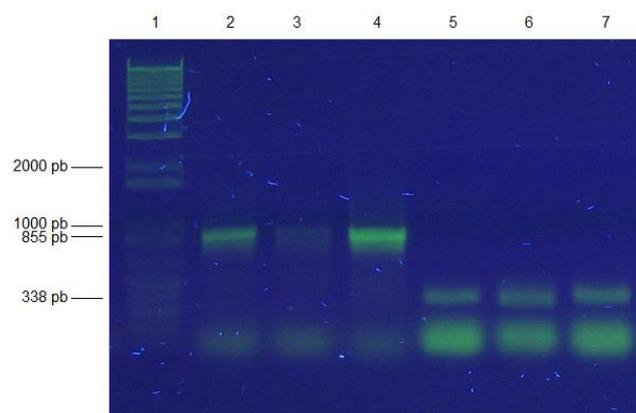


Figura 2. Análise da presença de Lip05 e Lip06 em *Leptospira* spp. (1) Marcador de peso molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen®); amplificação de Lip05 em (2) *Leptospira interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae, (3) *Leptospira borgpetersenii* sorogrupo Ballum e (4) *Leptospira interrogans* sorogrupo Canicola; amplificação de Lip06 em (5) *Leptospira interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae, (6) *Leptospira borgpetersenii* sorogrupo Ballum e (7) *Leptospira interrogans* sorogrupo Canicola.

O processo de clonagem resultou nos vetores pAE/lip05 e pAE/lip06, caracterizados através da digestão com enzimas de restrição, usados para transformar cepas bacterianas de expressão.

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho, vetores recombinantes funcionais capazes de expressar as proteínas em sistema procarioto foram construídos. Estes produtos possuem potencial para serem empregados no desenvolvimento de vacina recombinante para o controle da leptospirose bovina. Experimentos futuros envolvem a avaliação do caráter imunoprotetor dessas proteínas em modelo animal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALAKRISHNAN, G.; ROY, P. Comparison of efficacy of two experimental bovine leptospira vaccines under laboratory and field. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.159, p.11-15, 2014.

FERNANDES, L. G.; SIQUEIRA, G. H.; TEIXEIRA, A. R. F.; SILVA, L. P.; FIGUEIREDO, J. M.; COSATE, M. R.; VIEIRA, M. L.; NASCIMENTO, A. L. T. cO. *Leptospira* spp.: novel insights into host-pathogen interactions. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.176, p.50-57, 2016.

LIMA, S. S.; CHING, A. T. C.; FAVARO, R. D.; SILVA, J. B.; OLIVEIRA, M. L. S.; CARVALHO, E.; ABREU, P. A. E.; VASCONCELLOS, S. A.; HO, P. L. Adhesin activity of *Leptospira interrogans* lipoprotein identified by *in vivo* and *in vitro* shotgun phage display. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.431, p.342-347, 2013.

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.

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.

SILVA, E. F.; MEDEIROS, M. A.; MCBRIDE, A. J. A.; MATSUNAGA, J.; ESTEVES, G. S.; RAMOS, J. G. R.; SANTOS, C. S.; CRODA, J.; HOMMA, A.; DELLAGOSTIN, O. A.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, v.25, p.6277-6286, 2007.

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.