

Produção de anticorpos policlonais contra a proteína recombinante OmpL68 de *L. interrogans* visando sua caracterização como potencial alvo vacinal

TIFFANY THUROW BUNDE¹; NATASHA RODRIGUES DE OLIVEIRA²; MARA ANDRADE COLARES MAIA²; ANA CAROLINA KURZ PEDRA²; ANDRÉ ALEX GRASSMANN²; ODIR ANTÔNIO DELLAGOSTIN³

¹Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – tiffany_bia@hotmail.com

²Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – oliveira_natasha@hotmail.com

²Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – maracamaia@hotmail.com

²Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – caarolpedra@hotmail.com

²Department of Medicine and Department of Molecular Biology and Biophysics, University of Connecticut Health, EUA – grassmann@uchc.edu

³Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – odir@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose, uma doença causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, é considerada uma importante zoonose negligenciada que afeta humanos e animais em todo o mundo (HAAKE; LEVETT, 2015). A transmissão para humanos ocorre acidentalmente pela exposição direta à urina de animais infectados ou indireta via água ou solo contaminados (ADLER; MOCTEZUMA, 2010). Estima-se que ocorram cerca de um milhão de casos graves de leptospirose por ano mundialmente, ocasionando 60 mil mortes (COSTA et al., 2015). Estes índices tendem a aumentar em regiões de clima tropical, épocas de enchentes e em locais com instalações sanitárias precárias (MCBRIDE et al., 2005).

A vacinação permanece como a medida de controle mais eficaz contra a leptospirose. Bacterinas comerciais são amplamente aplicadas em animais domésticos e de produção, no entanto apresentam algumas limitações como a indução de imunidade de curta duração, proteção apenas contra os sorovares presentes na sua formulação, além de causarem efeitos colaterais indesejáveis, limitando sua aplicação em humanos a alguns poucos países (HAAKE; LEVETT, 2015; KOIZUMI; WATANABE, 2004). A melhor alternativa para sanar as deficiências apresentadas pelas bacterinas é o desenvolvimento de uma vacina recombinante. A utilização desta abordagem permite selecionar proteínas conservadas em espécies patogênicas e expostas na membrana externa, com maior potencial de estimular uma resposta de memória imunológica e reduzir a ocorrência de efeitos colaterais devido ao seu elevado grau de pureza (DELLAGOSTIN et al., 2011; GRASSMANN et al., 2017).

Dessa forma, com o intuito de identificar novos potenciais alvos vacinais, nosso grupo de pesquisa utilizou uma abordagem de vacinologia reversa e estrutural, a qual apontou diversas proteínas preditas como barril- β transmembrana (β b-OMP) presentes na superfície da bactéria (GRASSMANN et al., 2017). Algumas destas proteínas são conservadas em todas as *Leptospira* spp. e possuem funções associadas ao transporte de moléculas importantes para o metabolismo celular e patogênese. Dentre estas, destacou-se a proteína OmpL68, que contém um domínio de transportador de alginato, uma molécula

presente na composição de biofilmes e considerada um importante fator de virulência.

Devida à elevada especificidade das reações antígeno-anticorpo, anticorpos são ferramentas úteis e amplamente empregados para caracterização de candidatos vacinais triados *in silico*. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi produzir anticorpos policlonais (pAbs) contra uma construção recombinante contendo fragmentos expostos da proteína OmpL68 para posterior caracterização da localização subcelular desta proteína e validação como potencial alvo vacinal.

2. METODOLOGIA

2.1 Produção e caracterização da proteína recombinante rOmpL68: o gene sintético codificante para a proteína rOMPL68, contendo apenas os fragmentos expostos na membrana externa da bactéria, foi sintetizado quimicamente e clonado em vetor pAE para expressão em *Escherichia coli*. Este gene foi utilizado para transformar *E. coli* BL21(DE3) Star por choque térmico. A expressão da proteína recombinante foi induzida com 0,5 M de isopropil β -D-1-tiogalatopiranosídeo (IPTG). Após a centrifugação da cultura, as células foram lisadas por sonicação e as proteínas recombinantes foram solubilizadas em tampão contendo 8 M de uréia como agente desnaturante. A rOmpL68 foi purificada por cromatografia de afinidade utilizando coluna de Níquel-Sepharose. As alíquotas da purificação foram avaliadas por SDS-PAGE 12% e aquelas contendo as proteínas puras foram dialisadas contra tampão contendo concentrações sucessivamente decrescentes de uréia. A caracterização da proteína recombinante foi feita através de SDS-PAGE 12%, seguido de *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-6xHis e *pool* de soros humanos positivos para leptospirose.

2.2 Produção de anticorpo policlonal: ratos Wistar fêmeas de 6 semanas de idade foram utilizados para obtenção de anticorpos policlonais contra a proteína rOmpL68. Dois animais foram inoculados com a proteína rOmpL68 e um animal foi utilizado como controle negativo. Foram realizadas três imunizações, cada dose contendo 50 μ g do antígeno emulsificado em adjuvante de Freund (completo na primeira dose e incompleto nas doses subsequentes). O controle negativo recebeu apenas solução salina e o adjuvante de Freund. Os animais foram eutanasiados por aprofundamento de anestesia inalatória, seguido de exsanguinação cardíaca para coleta de sangue total. O soro foi separado por centrifugação e armazenado a -20 °C até o momento do uso.

2.3 Western blot e titulação dos anticorpos policlonais: a avaliação do soro quanto à sensibilidade e especificidade de detecção de rOmpL68 foi feita através de *Western blot*. Para isso, diferentes concentrações da proteína recombinante (1,5-100 ng) foram separadas em SDS-PAGE 12% seguido de eletrotransferência para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com os pAbs dos animais imunizados com a rOmpL68 na diluição de 1:200. Anti-IgG de rato conjugado com peroxidase (1:5000) foi utilizado como anticorpo secundário. A reação foi desenvolvida pela adição de peróxido de hidrogênio e diaminobenzidina. Posteriormente, foi realizada titulação individual dos soros reagentes por ELISA indireto conforme descrito previamente (CONRAD et al., 2017). Para sensibilização foi utilizada 50 ng de rOmpL68 por cavidade. A titulação abrangeu diluições seriadas de base 2, de 1:25.600 até 1:6.553.600, o título foi definido como a maior diluição do anticorpo em que ainda é possível

observar reação colorimétrica de antígeno-anticorpo visível. Soro do animal inoculado com PBS e adjuvante de Freund foi utilizado como controle negativo. Anti-IgG de rato conjugado com peroxidase (1:5000) foi utilizado como anticorpo secundário. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata e a absorbância foi determinada a 492 nm. A análise estatística dos resultados da titulação foi realizada por ANOVA. Valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão da proteína rOmpL68 em *E. coli* (DE3) BL21 Star, bem como a solubilização em ureia e purificação por cromatografia foi eficiente. O *Western blot* com anti-histidina confirmou a identidade da proteína recombinante com o tamanho esperado de 36 kDa. A rOmpL68 foi reconhecida por soros humanos positivos para leptospirose, comprovando a sua antigenicidade (dados não mostrados). A obtenção de anticorpos policlonais produzidos em ratos foi realizada com sucesso. No *Western blot*, o pAb anti-rOmpL68 foi capaz de reagir com a proteína na sua forma recombinante evidenciando a eficiência na produção e reconhecimento de tais anticorpos até a quantidade de 6,25 ng de proteína (Figura 1), dessa forma, podemos afirmar que a proteína rOmpL68 possui capacidade imunogênica.

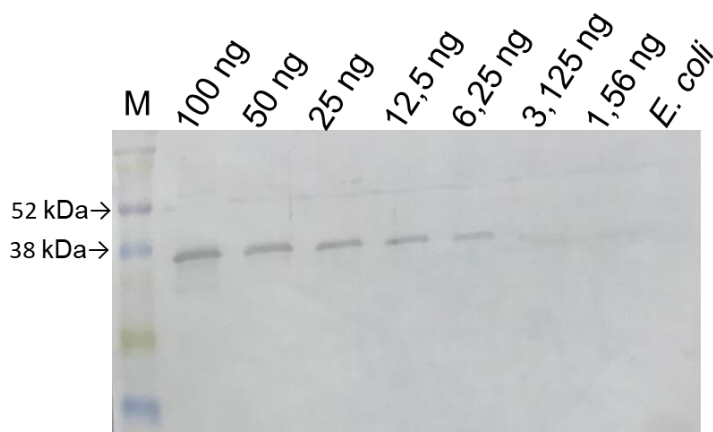


Figura 1: *Western blot* para caracterização dos pAbs contra a proteína rOmpL68. M, Marcador de massa molecular (*Rainbow protein marker full range* – BioRad); Extrato de *E. coli* (DE3) BL21 Star não transformado foi utilizado como controle negativo.

A titulação dos pAbs foi eficiente apresentando um título de 1:819.200 (Figura 2) com diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($P < 0,05$) observada até esta mesma diluição, evidenciando a alta especificidade dos pAbs e imunogenicidade do antígeno rOMPL68.

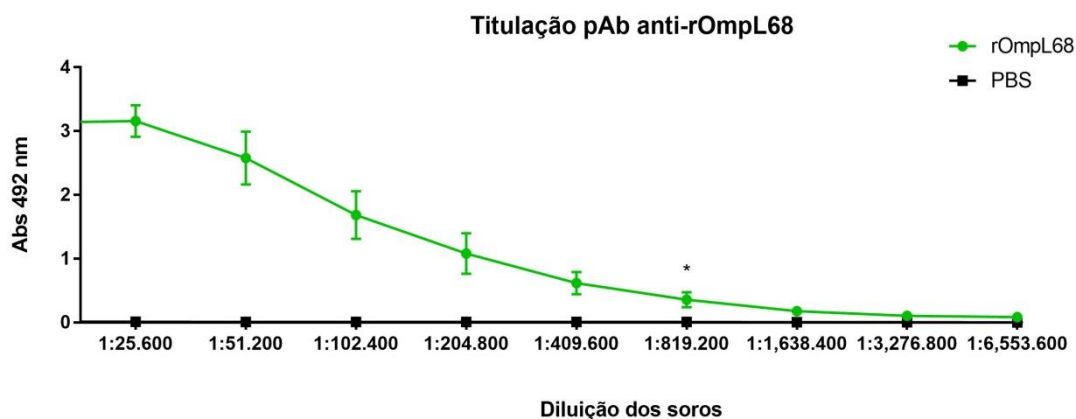


Figura 2: Titulação por ELISA indireto dos pAbs anti-rOmpL68. * Indica diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

4. CONCLUSÕES

A proteína rOmpL68 é imunogênica e induz a produção de pAbs específicos em ratos Wistar. Futuramente, esses anticorpos serão utilizados na caracterização funcional e na localização subcelular desta proteína para validação de sua aplicação como um potencial alvo vacinal contra leptospirose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. DE LA P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary microbiology**, v. 140, p. 287–296, 2010.

CONRAD, N. L. et al. LigB subunit vaccine confers sterile immunity against challenge in the hamster model of leptospirosis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 3, p. 1–20, 2017.

COSTA, F. et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. e0003898, 2015.

DELLAGOSTIN, O. A. et al. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Human vaccines**, v. 7, n. 11, p. 1215–24, 2011.

GRASSMANN, A. A. et al. Discovery of Novel Leptospirosis Vaccine Candidates Using Reverse and Structural Vaccinology. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 463, 2017.

HAAKE, D. A.; LEVETT, P. N. Leptospirosis in humans. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 387, p. 65–97, 2015.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. **Vaccine**, v. 22, n. 11–12, p. 1545–1552, 2004.

MCBRIDE, A. J. A. et al. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 18, n. 5, p. 376–386, 2005.