

## **Obtenção e caracterização de um protótipo vacinal inativado contra leptospirose utilizando *Escherichia coli* como vetor de expressão para um antígeno quimérico**

**LAURA DE VARGAS MAIOCCHI<sup>1</sup>; DOMITILA BRZOSKOWSKI CHAGAS<sup>2</sup>; MARA ANDRADE COLARES MAIA<sup>3</sup>; PEDRO HENRIQUE FILGUEIRAS COELHO SOUZA<sup>4</sup>; VITÓRIA ADRIELLY CATSCHOR DOS SANTOS<sup>5</sup>; ODIR ANTÔNIO DELLAGOSTIN<sup>6</sup>.**

<sup>1</sup>Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – lauradevargasmaiocchi@gmail.com

<sup>2</sup>Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – chagas.domitila@gmail.com

<sup>3</sup>Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – maracamaia@hotmail.com

<sup>4</sup>Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – pedroh577@hotmail.com

<sup>5</sup>Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – vitoriacatschor@gmail.com

<sup>6</sup>Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – odirad@ufpel.edu.br

### **1. INTRODUÇÃO**

A leptospirose é uma doença infecciosa ocasionada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade em humanos (COSTA et al., 2015), bem como perdas econômicas na produção animal. A prevenção da leptospirose depende, em grande parte, de medidas de saneamento básico, o que apresenta dificuldade de implementação em países em desenvolvimento, como o Brasil (DELLAGOSTIN et al., 2011).

Frente a esta situação, é necessário o desenvolvimento de uma vacina com ampla proteção contra a leptospirose, a fim de superar as limitações das formulações inativadas (bacterinas) comercialmente disponíveis para uso animal. Nesse sentido, a utilização de proteínas conservadas e localizadas na superfície da bactéria, buscando facilitar o reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro, representa uma abordagem promissora (GRASSMAN et al., 2017). Dentre essas proteínas, destacam-se os alvos LipL32, LemA e LigANI (CULLEN et al. 2002; DELLAGOSTIN et al., 2017).

Em um recente estudo, realizado por Oliveira et al. (2019), foi avaliada a imunoproteção conferida por uma quimera recombinante codificada pelos genes *lipL32*, *lemA* e *ligAni*, como vacina vetorizada por *Mycobacterium bovis* BCG em hamsters. Ao final do experimento, obteve-se proteção significativa de 100% dos animais, e as análises de cultura e PCR em tempo real permitiram constatar ausência de leptospires nos rins dos animais sobrevidentes, indicando uma imunidade esterilizante (OLIVEIRA et al., 2019).

No entanto, o custo para produção de vacinas vivas atenuadas baseadas em BCG recombinante são superiores quando comparado a outros sistemas de expressão. A bactéria *Escherichia coli* é atualmente a plataforma de expressão de抗ígenos heterólogos mais amplamente utilizada (ROSANO; CECCARELLI, 2014). Nesse sentido, a utilização deste sistema de expressão apresenta vantagens, visto os altos níveis de proteínas expressas em corpos de inclusão, a segurança dessa

formulação e o crescimento rápido da bactéria em meios de cultivo simples, o que reduz o custo do produto final (GENTSCHÉV et al., 2001).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi produzir e caracterizar uma bacterina de *E. coli* recombinante expressando uma quimera composta pelas proteínas LipL32, LemA e LigANI, com a finalidade de desenvolver posteriormente uma vacina eficaz contra a leptospirose.

## 2. METODOLOGIA

**2.1 Transformação em *Escherichia coli*:** A cepa de expressão *E. coli* BL21 STAR foi transformada por choque térmico com o plasmídeo recombinante pAE/Q1 previamente construído, o qual contém o gene que codifica para o antígeno quimérico composto pelas proteínas LipL32, LemA e LigANI de *Leptospira interrogans*. As células também foram transformadas apenas com o vetor pAE sem inserto para posterior utilização como controle negativo. As células transformadas foram cultivadas à 37 °C em 100 mL de caldo LB, com agitação a 180 RPM até a fase logarítmica de crescimento ( $DO_{600\text{ nm}}$  entre 0,6 e 0,8). Após a indução da expressão pela adição de 0,5 mM de IPTG (Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalatopiranosideo) por 3 h o cultivo foi centrifugado a  $7.000 \times g$  por 15 min à 4 °C. O pellet foi ressuspendido em 10 mL de tampão fosfato salino (PBS) com ajuste para a concentração de  $10^7$  UFC/mL para então ser aliquotado em 10 microtubos de 1,5 mL contendo 1 mL em cada. Alíquotas do cultivo de *E. coli* foram coletadas antes e depois da indução para avaliação da expressão da proteína por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%.

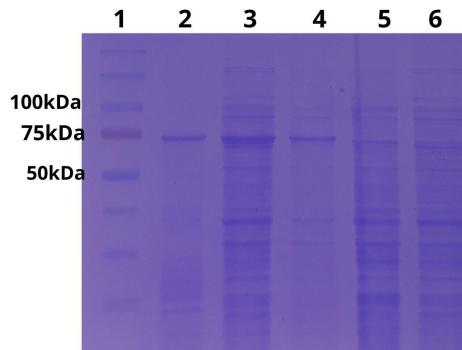
**2.2 Inativação:** As amostras foram incubadas em banho-seco à 80 °C por 30 min (SHARMA VK, 2011). Após inativação, uma alíquota do cultivo de *E. coli* foi utilizada para extração de plasmídeo. Os plasmídeos extraídos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%. Outra alíquota de 50  $\mu$ L foi semeada em 10 mL de caldo LB e incubada à 37°C sob agitação de 180 rpm por 24 h para confirmar a inativação através da ausência de crescimento bacteriano.

**2.3 Detecção da expressão por Western blot:** Amostras do cultivo foram coletadas antes e depois da inativação para a caracterização da integridade e identidade da proteína recombinante. Para isso, as amostras foram submetidas à técnica de SDS-PAGE 12% seguido de eletrotransferência para uma membrana de nitrocelulose. Para o bloqueio de ligações inespecíficas, a membrana foi incubada em solução de bloqueio com leite em pó 5% overnight a 4°C. Posteriormente, a membrana foi lavada com PBS-T e incubada por 1 h sob agitação constante em PBS-T contendo anticorpo monoclonal de camundongo anti-cauda de histidina conjugado à peroxidase, na diluição de 1:10.000 (Sigma). A reação na membrana foi revelada em solução cromógena composta por 6 mg de tetrahidrocloreto de diaminobenzidina, 15  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, 9 mL de Tris-HCl 50 mM pH 7,6 e 1 mL de sulfato de níquel 0,3% (NiSO<sub>4</sub>) até o desenvolvimento de cor.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

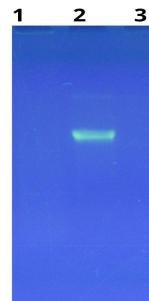
A determinação da presença da proteína recombinante foi bem sucedida, como demonstrado através da técnica de SDS-PAGE (Figura 1). Após a indução, foi possível confirmar a expressão da proteína químérica no tamanho esperado de

aproximadamente 75 kDa, conforme comparação com o antígeno purificado usado como controle positivo, enquanto que no cultivo de *E. coli* transformada apenas com o vetor pAE sem inserto, usado como controle negativo, não houve a detecção da expressão da proteína recombinante, conforme esperado.

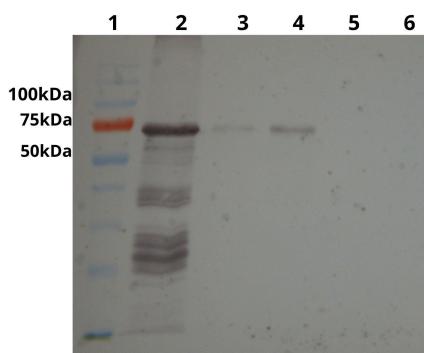


**Figura 1: Detecção da expressão da proteína recombinante através de SDS-PAGE 12%.**  
 1. Marcador de peso molecular; 2. Controle positivo (Q1 purificada); 3. *E. coli* transformada com vetor pAE/Q1 não induzida; 4. *E. coli* transformada com vetor pAE/Q1 induzida; 5. *E. coli* transformada com vetor pAE não induzida; 6. *E. coli* transformada com vetor pAE induzida.

A inativação das células ocorreu de forma efetiva, confirmada pela ausência de crescimento na amostra semeada em caldo LB, bem como pela degradação do DNA plasmidial, conforme observado através da eletroforese em gel de agarose 1% dos plasmídeos extraídos (Figura 2). Através da técnica de Western blot, foi possível confirmar que mesmo após o tratamento com calor, a identidade da quimera recombinante bem como sua integridade são mantidas, o que é necessário para sua utilização como antígeno vacinal (Figura 3).



**Figura 2: Confirmação da inativação do DNA plasmidial através de eletroforese em gel de agarose 1%:** 1. *E. coli* transformada com vetor pAE/Q1 inativada; 2. Controle plasmídeo pAE; 3. *E. coli* transformada com vetor pAE inativado.





**Figura 3. Confirmação da integridade do antígeno recombinante após inativação celular através de Western blot.** 1. Marcador de peso molecular; 2. Controle positivo (Q1 purificada); 3. *E. coli* transformada com vetor pAE/Q1 pré inativação; 4. *E. coli* transformada com vetor pAE/Q1 pós inativação; 5. *E. coli* transformada com vetor pAE pré inativação; 6. *E. coli* transformada com vetor pAE pós inativação.

#### 4. CONCLUSÕES

O tratamento com calor permite a inativação da cepa de *E. coli* recombinante bem como do DNA plasmidial, ao passo que mantém a integridade da proteína Q1, o que é necessário para sua utilização como antígeno vacinal. Os próximos passos desse trabalho envolvem a avaliação desta formulação como uma vacina recombinante inativada contra leptospirose em modelo animal de hamster.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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
- DELLAGOSTIN, O. A., GRASSMANAN, A. A., RIZZI, C., SCHUCH, R. A., JORGE, S. & OLIVEIRA, T. L. 2017. Reverse vaccinology: an approach for identifying leptospiral vaccine candidates. **Int J Mol Sci**, 18.
- 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.
- GENTSCHEV, I. et al. Recombinant attenuated bacteria for the delivery of subunit vaccines. **Vaccine**, v. 19, p. 2621–2628, 2001.
- GRASSMANN, A. A. et al. Discovery of Novel Leptospirosis Vaccine Candidates Using Reverse and Structural Vaccinology. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 463, 2017.
- OLIVEIRA, T. L., RIZZI, C., DA CUNHA, C. E. P., DORNELES, J., SEIXAS NETO, A. C. P., AMARAL, M. G., HARTWIG, D. D. & DELLAGOSTIN, O. A. 2019. Recombinant BCG strains expressing chimeric proteins derived from *Leptospira* protect hamsters against leptospirosis. **Vaccine**, 37, 776-782.
- ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. APR, p. 1–17, 2014.
- SHARMA VK, DEAN-NYSTROM EA, CASEY TA. Evaluation of hha and hha sepB mutant strains of *Escherichia coli* O157:H7 as bacterins for reducing *E. coli* O157:H7 shedding in cattle. **Vaccine**. 2011 Jul 12;29(31):5078-86. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.04.073. Epub 2011 May 6. PMID: 21550373.