

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE UMA QUIMERA RECOMBINANTE DERIVADA DE COMPONENTES DE BOMBAS DE EFLUXO DE *Leptospira* spp. EM *Mycobacterium bovis* BCG

ANDRIELE BONEMANN MADRUGA¹; MARA ANDRADE COLARES MAIA²; VITÓRIA ADRIELLY CATSCHOR DOS SANTOS²; ODIR ANTÔNIO DELLAGOSTIN²; THAÍS LARRÉ OLIVEIRA³

¹Universidade Federal de Pelotas – andrielebonemann@outlook.com

²Universidade Federal de Pelotas – maracamaia@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – vitoriacatschor@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – odirad@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – thais.larreoliveira@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença de caráter zoonótico, presente em todo mundo, causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. A infecção por esta bactéria pode ocorrer através do contato direto com a urina de animais portadores, ou ainda de forma indireta, no contato com água, solo ou outros meios contaminados (ADLER; MOCTEZUMA, 2010). No Brasil, no período entre 2010 e 2020, foram confirmados 39.270 casos de leptospirose o que significa uma média anual de 3.734 casos. Nesse mesmo período, foram registrados 3.419 óbitos, com média de 321 óbitos por ano (BRASIL, 2021). Em animais de produção, como bovinos e suínos, a leptospirose pode resultar em distúrbios reprodutivos ou em infecções não aparentes capazes de levá-los à subfertilidade, resultando em significativas perdas no setor agropecuário (ELLIS., 2015).

A atual profilaxia da leptospirose animal se dá através da vacinação com bacterinas (leptospiras inativadas), porém essas formulações apresentam algumas limitações, tais como indução de proteção de curta duração e apenas contra o limitado número de sorovares presentes na formulação vacinal (DELLAGOSTIN, et al., 2011). O emprego de *Mycobacterium bovis* BCG como vetor para expressão de antígenos heterólogos representa uma estratégia promissora para o desenvolvimento de vacinas recombinantes por possuir diversas características que o tornam um bom vetor vacinal (SINGH et al., 2016). Entre essas características, destaca-se baixo custo de produção, a estabilidade, segurança, propriedades adjuvantes inerentes, alta imunogenicidade e capacidade de se replicar dentro de macrófagos (OLIVEIRA et al., 2017).

Em um estudo prévio, utilizando abordagens de vacinologia reversa e estrutural, nosso grupo de pesquisa construiu uma quimera recombinante a partir da junção de epítopos de proteínas derivadas de bombas de efluxo de *Leptospira* spp., sendo elas LIC11941, LIC12290, LIC13135, LIC12307 e LIC12693. Esse antígeno foi testado anteriormente como vacina de subunidade, porém esta não foi capaz de conferir imunidade significativa frente ao desafio com cepa virulenta de *L. interrogans* em modelo animal de hamster (MAIA, 2022). Portanto, o objetivo do presente trabalho foi clonar a sequência codificadora da quimera recombinante em um vetor de expressão em *Mycobacterium bovis* BCG bem como caracterizar sua expressão através da técnica de *Western blot* a fim de, futuramente, avaliar seu potencial imunoprotetor como vacina vetorizada contra leptospirose.

2. METODOLOGIA

O plasmídeo contendo a sequência alvo da *quimera AM* foi previamente construído *in silico* pelo nosso grupo, e obtido comercialmente através de síntese química. Tal construção foi usada como DNA molde para amplificação do gene de interesse por reação em cadeia da polimerase (PCR). A PCR foi realizada contendo 50-100 ng de DNA molde e primers específicos para a sequência alvo. A reação ocorreu em termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf) nas seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial à 94 °C por 4 min seguido de 30 ciclos de desnaturação à 94 °C por 30 s, anelamento na temperatura de 55 °C por 30 s, extensão à 72 °C por 30 s e, ao final dos 30 ciclos, extensão final à 72 °C por 5 min.

Para propagação do vetor pUS977, 50 µL de células eletrocompetentes de *Escherichia coli* cepa TOP 10 foram transformadas por eletroporação com 2 µL do DNA plasmidial e em seguida, foram plaqueadas em meio Luria Bertani ágar suplementado com o antibiótico canamicina (50 µg/mL). Após 24 h uma colônia isolada foi semeada em tubo falcon contendo 10 mL de meio LB com canamicina. O cultivo foi incubado em shaker à 37 °C a 180 rpm por 16-18 h e posteriormente, foi realizada a extração do vetor usando o kit de purificação Illustra™ *bacteria genomic prep mini spin kit* (GE Healthcare).

A sequência codificadora da quimera recombinante amplificada por PCR bem como o vetor pUS977 foram submetidos à reação de digestão utilizando as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III (Invitrogen) à 37 °C por 2 h. Os produtos das reações foram avaliados através de eletroforese em gel de agarose e, posteriormente, foi realizada a ligação do inserto ao vetor utilizando a enzima T4 DNA Ligase (New England BioLabs), à temperatura ambiente por 2 h. O produto da ligação foi utilizado para transformação por eletroporação de células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10, conforme descrito anteriormente. Os plasmídeos foram extraídos usando kit comercial e a confirmação da presença do inserto foi feita através da reação de digestão utilizando as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III, seguido de eletroforese em gel de agarose 1%, a fim de caracterizar os clones recombinantes.

Para a transformação de BCG com o vetor construído, células eletrocompetentes de *M. bovis* BCG Pasteur foram transformadas utilizando eletroporador Micropulser™ electroporator (Bio-Rad) configurado para os parâmetros de 2,5 V e 800 Ω. As células transformadas foram plaqueadas em meio 7H10 suplementado com OADC e canamicina (25 µg/ml) e incubado em estufa BOD à 37 °C por cerca de 21 dias. Para analisar a expressão das proteínas recombinantes, as colônias crescidas nas placas foram semeadas em 7H9 suplementado com OADC, Tween 80 e canamicina. Após, 10 mL da cultura celular foram centrifugados à 4 °C por 10 min à 10.000 × *g*, em seguida o pellet formado foi ressuspenso em 1 mL de Tris HCl 100 mM e sonificado em 10 pulsos de 15 s com intervalo de 15 s entre cada pulso, com o auxílio de pérolas de vidro de 0,1 mm de diâmetro. Após a sonificação, o extrato foi centrifugado à 4°C por 10 min à 10.000 × *g*, e o pellet e o sobrenadante foram separados. Os extratos das cepas de BCG recombinante (rBCG) foram submetidos a separação por SDS-PAGE 12% seguido de eletrotransferência para membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) usando o sistema Transfer Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad) durante 20 min à 15 V e 3 mA. Para a técnica de *Western blot*, a membrana foi bloqueada com 5% de leite em pó em 10 mL PBS-T (PBS 1X acrescido de 0,05% de Tween) por 1 hora sob agitação. Após três lavagens com PBS-T foi adicionado o soro policlonal anti-QuimeraAM na concentração de 1:100 diluído em 10 mL de solução de PBS-T com 2,5% de leite em pó e as membranas foram incubadas *overnight* à 4 °C sob agitação. Após novas lavagens com PBS-T foi adicionado o anticorpo secundário anti-

IgG de hamster conjugado à peroxidase na concentração de 1:5000 e a reação foi revelada por quimioluminescência.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a reação de PCR, a sequência codificadora da quimera foi eficientemente amplificada apresentando fragmento no tamanho esperado de 1218 pb (Figura 1A). Após a amplificação, o inserto e o vetor pUS977 foram eficientemente digeridos usando as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III. A ligação gerou o plasmídeo recombinante denominado pUS977/quimera. Após a transformação de *E. coli* cepa TOP10 com o produto da ligação, foi realizada a triagem de clones recombinantes. A extração dos plasmídeos seguida de reação de digestão permitiu confirmar a liberação do inserto no tamanho esperado bem como a linearização do vetor (Figura 1B).

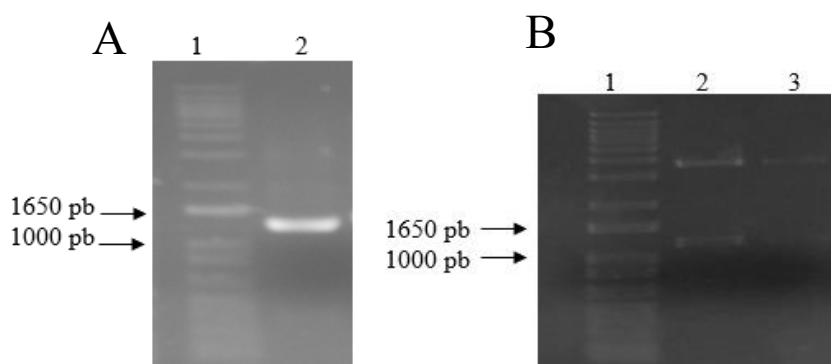


Figura 1: A - Eletroforese em gel de agarose 1% do gene alvo amplificado por PCR. 1. Marcador 1 Kb Plus; 2. Sequência codificadora da *quimera* AM amplificada. B - Confirmação da clonagem do inserto no vetor pUS977. 1, Marcador 1 Kb Plus; 2 e 3, pUS977/quimera após digestão com *Bam*HI e *Hind*III.

A detecção da expressão da quimera pelos clones recombinantes de BCG ocorreu conforme o esperado, permitindo a visualização de bandas na altura de aproximadamente 45 kDa como demonstrado na Figura 2, de forma semelhante à proteína purificada usada como controle positivo. Nenhuma expressão foi detectada na cepa de BCG Pasteur não transformada, usada como controle negativo.

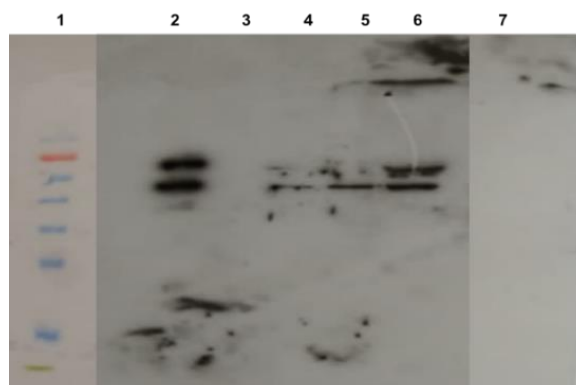


Figura 2: Detecção da expressão da quimera AM em rBCG via *Western blot*. 1, Marcador (Page ruler™ Prestained Protein Ladder- Thermo Scientific); 2, QAM purificada (controle positivo); 3, clone rBCG 1 pellet; 4, clone rBCG 1 sobrenadante; 5, clone rBCG 2 pellet; 6, clone rBCG 2 sobrenadante; e 7, BCG Pasteur (controle negativo).

4. CONCLUSÕES

O presente trabalho propôs a clonagem de uma quimera de genes de *L. interrogans* em *M. bovis* BCG Pasteur. A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que a metodologia aplicada para a amplificação, digestão e clonagem da sequência alvo ao vetor pUS977 foi eficiente para construir plasmídeos recombinantes para expressão em BCG. A detecção e caracterização da expressão do antígeno quimérico em rBCG demonstra a funcionalidade do plasmídeo construído, bem como possibilita sua futura avaliação como protótipo de vacina recombinante. Os próximos passos envolvem a avaliação das cepas de BCG recombinante como vacina vetorizada contra leptospirose em hamsters.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADLER, B. & DE LA PENA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v.140, p.287-96, 2010.
2. BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Leptospirose. Brasília, 2021.
3. DELLAGOSTIN et al. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Human vaccines**, v. 7, p. 1215-1224, 2011.
4. ELLIS, W. A. Animal Leptospirosis. In: Adler, B. *Leptospira* and Leptospirosis, Berlin: **Springer**, 2015. p.100-138.
5. MAIA, Mara Andrade Colares. **Construção e avaliação de quimeras recombinantes como novos antígenos vacinais contra leptospirose**. 2022. 85f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.
6. OLIVEIRA, T. L. et al. Recombinant BCG vaccines: molecular features and their influence in the expression of foreign genes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, p. 6865-6877, 2017.
7. SINGH, V.K. et al. Manipulation of BCG vaccine: a double-edged sword. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.35, p. 535-543, 2016.