

AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS DE INATIVAÇÃO BACTERIANA NA FORMULAÇÃO DE VACINAS CONTENDO UMA QUIMERA COMPOSTA POR PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DE *Leptospira interrogans* EXPRESSA EM *Escherichia coli*

RAFAEL CARRACENA DE SOUZA TAPAJÓZ¹; FRANCISCO DENIS SOUZA SANTOS²; NATASHA RODRIGUES DE OLIVEIRA³; MARA ANDRADE COLARES MAIA⁴; THAÍS LARRÉ OLIVEIRA⁵; ODIR ANTÔNIO DELLAGOSTIN⁶

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – rafaeltapajoz@gmail.com

²Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – denis.santos195@gmail.com

³Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – oliveira_natasha@hotmail.com

⁴Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – maraacmaia@hotmail.com

⁵Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – thais.larreoliveira@gmail.com

⁶Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – odirad@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose bacteriana causada por espiroquetas do gênero *Leptospira* (GUPTA; MAHMOOD; ADEOLU, 2013). Possui uma grande distribuição geográfica, apresentando uma prevalência particular em países tropicais e subtropicais (CASTRO et al., 2008). Para a prevenção da leptospirose, redução do risco de infecção e consequentemente das perdas sociais e econômicas, é de suma importância o controle e a prevenção da enfermidade (CASTRO et al., 2008) e, na prática veterinária, isto fundamenta-se na vacinação sistemática do rebanho (CASTRO et al., 2008).

As vacinas configuram a estratégia de intervenção para prevenção de doenças infecciosas com a melhor relação custo-benefício até hoje utilizada em saúde pública e a medida preventiva mais indicada contra a leptospirose (McBRIDE et al., 2005). As vacinas disponíveis no mercado contra a leptospirose, bacterinas, são suspensões celulares mono ou polivalentes (VERMA; KHANNA; CHAWLA, 2013) de células inteiras inativadas quimicamente ou por calor, que induzem uma resposta imune predominantemente contra o lipopolissacarídeo (LPS) da membrana celular bacteriana (ADLER, 2014). O desenvolvimento de bacterinas utilizando *Escherichia coli* expressando antígenos recombinantes apresenta menor tempo e menores custos de produção quando comparado a vacinas de subunidade recombinantes (PINHO et al., 2021).

As proteínas LIC12287, LIC11711 e LIC13259 são lipoproteínas e estão localizadas na superfície da membrana da célula bacteriana de *Leptospira interrogans*, sugerindo seu potencial para contribuir para os processos de invasão e evasão imune dentro dos hospedeiros, manifestando assim um possível papel na virulência (CAVENAGUE et al., 2019; FIGUEREDO et al., 2017; KOCHI et al., 2019).

Portanto, é necessário buscar estratégias para o desenvolvimento de formulações vacinais contra a leptospirose e que induzam uma proteção mais eficiente e a longo prazo (CONRAD et al., 2017; DELLAGOSTIN et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2020). Desta forma, o objetivo deste estudo foi o de avaliar duas metodologias de inativação de células bacterianas para a formulação de vacinas contendo uma qui-

mera composta pelas proteínas LIC12287, LIC11711 e LIC13259 (QLIC) expressa em *E. coli*, assim como caracterizar a quimera recombinante por *Western blot*.

2. METODOLOGIA

Células de *E. coli* BL21 (DE3) STAR transformadas por choque térmico com cloreto de cálcio (CaCl_2) com os vetores pET28a/quimera e pET28a (controle negativo) foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) caldo suplementado com canamicina (50 $\mu\text{g/ml}$) e glicose 1 M e foram induzidas com 0.5 mM de Isopropyl β -Dthiogalactopyranoside (IPTG).

As culturas foram centrifugadas (*pellet* sobre *pellet*) e suspensas em solução salina estéril (pH 7,4) (PBS) e uma alíquota de 100 μL de cada suspensão celular foi utilizada para realizar diluições seriadas que foram semeadas em LB ágar contendo canamicina e incubadas. O número de colônias obtidas em cada placa foi utilizado para determinar a quantidade de células viáveis/Unidades Formadoras de Colônia (UFCs).

O protocolo de inativação por calor seguiu o que fora descrito anteriormente por SHARMA; DEAN-NYSTROM; CASEY (2011) com modificações. Todo o conteúdo que foi anteriormente suspenso em PBS foi transferido para tubos tipo *Eppendorf*, com 1 mL de suspensão em cada. Os tubos foram incubados em banho-seco aquecido a 80° C por 30 min para a inativação das células bacterianas. Para a inativação química foi adicionado formaldeído (H_2CO), o protocolo foi realizado conforme previamente descrito por DONASSOLO et al. (2020) com modificações. Foram adicionadas concentrações entre 0,3%-0,05% de H_2CO às suspensões celulares que foram anteriormente suspensas em PBS. As mesmas foram incubadas por 72 h a 37° C, com agitação a 180 rpm e a cada 24 h foram coletadas alíquotas em cada suspensão para realização dos testes de segurança das bacterinas. Uma alíquota de 100 μL de cada suspensão foi semeada em LB ágar e LB caldo com e sem canamicina, e foram incubadas a 37° C por 168 h. As culturas foram usadas para determinar o crescimento ou nenhum crescimento – inativação ou não inativação. Foi realizada a quantificação da concentração da quimera recombinante expressa na bacterina, que foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) corado com Azul de Coomassie, *Western blot*, densitometria e pelo Kit Pierce™ BCA Protein Assay.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir de diluições seriadas, o número de colônias obtidas foi utilizado para determinar a quantidade de UFCs por mL, sendo este ajustado para 1×10^9 UFC/mL. Após a inativação por calor e incubação por 168 h, junto de seus respectivos controles negativos, nenhum dos testes de segurança das bacterinas apresentaram crescimento, sendo confirmada assim a inativação das células bacterianas.

Foi observado que a maior concentração de H_2CO (0,3%) foi suficiente para inativar as células bacterianas mesmo no período de 24 h, assim como as concentrações de 0,1% e 0,07% durante este período (Tabela 1). Porém, foi visto através de SDS-PAGE 12% (Figura 1) que as bandas de proteína após as inativações nos tratamentos com maior concentração de H_2CO eram muito pequenas ou mesmo inexistentes, sugerindo que estas concentrações de H_2CO podem degradar a proteína. Enquanto que em uma menor concentração de H_2CO com 0,05%, ou em um período de inativação de 48 ou 72 h, foi mais comum não ocorrer a inativação (Tabela 1).

Tabela 1 – Testes de segurança das bacterinas

	% H ₂ CO	24 h	48 h	72 h
pET28a/quimera	0,3%	□	*	*
	0,1%	□	*	*
	0,07%	□	■	■
	0,05%	■	■	■
pET28a	0,3%	□	*	*
	0,1%	□	*	*
	0,07%	□	■	■
	0,05%	■	■	□

Legenda:

- O cultivo cresceu durante 24-168 h incubado a 37° C sob agitação de 180 rpm;
- O cultivo não cresceu durante 24-168 h incubado a 37° C sob agitação de 180 rpm;
- * Não foi realizada a inativação com esta concentração de H₂CO neste período.

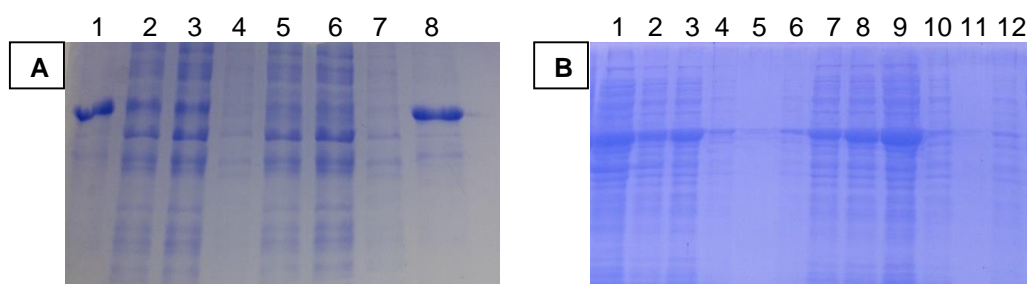


Figura 1. Análise em SDS-PAGE 12% para caracterizar os processos de expressão, inativação com 0,3% (A) e 0,1% (B) de H₂CO por 24 h e de produção da bacterina pET28a/quimera e da bacterina pET28a. Percebe-se nos poços pós-inativação (4A, 4B, 5B e 6B) a degradação da quimera. (A) Inativação com 0,3% de H₂CO por 24 h. 1, Controle positivo QLIC; 2, QLIC pré-indução; 3, QLIC pós-indução; 4, Bacterina pET28a/quimera pós-inativação; 5, pET28a transformado pré-indução; 6, pET28a transformado pós-indução; 7, Bacterina pET28a pós-inativação; 8, Controle positivo QLIC. (B) Inativação com 0,1% de H₂CO por 24 h. 1, QLIC pré-inóculo; 2, QLIC pré-indução; 3, QLIC pós-indução; 4, Bacterina pET28a/quimera pós-inativação/pré-centrifugação; 5, Bacterina pET28a/quimera pós-inativação/pré-lavagens; 6, Bacterina pET28a/quimera pós-inativação alíquota final; 7, pET28a transformado pré-inóculo; 8, pET28a transformado pré-indução; 9, pET28a transformado pós-indução; 10, Bacterina pET28a pós-inativação/pré-centrifugação; 11, Bacterina pET28a pós-inativação/pré-lavagens; 12, Bacterina pET28a pós-inativação alíquota final.

O resultado dos processos de produção da bacterina recombinante através da inativação por calor pode ser visto abaixo em SDS-PAGE 12% (Figura 2A) e Western blot (Figura 2B). A quantificação da concentração da quimera recombinante expressa na bacterina resultou em 1,955 mg/mL.

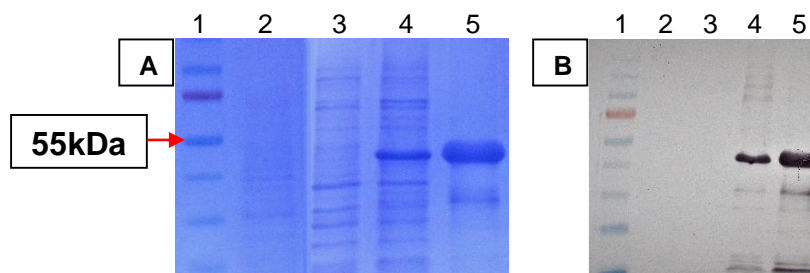


Figura 2. Caracterização dos processos de produção da bacterina recombinante pET28a/quimera e da bacterina pET28a. (A) Análise em SDS-PAGE 12%. 1, Marcador de Peso Molecular; 2, Controle negativo (*E. coli* STAR); 3, Bacterina pET28a inativada por calor; 4, Bacterina pET28a/quimera inativada por calor; 5, QLIC purificada. (B) Análise em Western blot. 1, Marcador de Peso Molecular; 2, Controle negativo (*E. coli* STAR); 3, Bacterina pET28a inativada por calor; 4, Bacterina pET28a/quimera inativada por calor; 5, QLIC purificada.

4. CONCLUSÕES

As concentrações mais altas de H₂CO utilizadas para a inativação bacteriana sugeriram degradação da quimera recombinante, enquanto na concentração mais baixa as células bacterianas acabaram não sendo inativadas. Com isso, a estratégia de inativação por calor apresentou melhor resultado para a formulação das vacinas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, B. **Leptospira and Leptospirosis**. Germany: Springer, 2014. 2015. ed.
- CASTRO, V. et al. Soroprevalência da Leptospirose em Fêmeas Bovinas em Idade Reprodutiva no Estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 1, p. 3-11, Mar., 2008.
- CAVENAGUE, M. F. et al. Characterization of a Novel Protein of *Leptospira interrogans* Exhibitin Plasminogen, Vitronectin and Complement Binding Properties. **International Journal of Medical Microbiology**, São Paulo, v. 309, n. 2, p. 116-129, Mar., 2019.
- CONRAD, N. L. et al. LigB Subunit Vaccine Confers Sterile Immunity Against Challenge in the Hamster Model of Leptospirosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, Pelotas, v. 11, n. 3, p. e0003898, Mar., 2017.
- DELLAGOSTIN, O. A. et al. Reverse Vaccinology: An Approach for Identifying Leptospiral Vaccine Candidates. **International Journal of Molecular Science**, Pelotas, v. 18, n. 1, p. 1-16, Jan., 2017.
- DONASSOLO, R. A. et al. Formaldehyde Effects on Kanamycin Resistance of Inactivated Recombinant *Escherichia coli* Vaccines. **Biotechnology Letters**, Pelotas, v. 42, p. 2223-2230, Jun., 2020.
- FIGUEREDO, J. M. et al. Characterization of Two New Putative Adhesins of *Leptospira interrogans*. **Microbiology**, São Paulo, v. 163, n. 1, p. 37-51, Jan., 2017.
- GUPTA, R. S.; MAHMOOD, S.; ADEOLU, M. A Phylogenomic and Molecular Signature Based Approach for Characterization of the Phylum Spirochaetes and its Major Clades: Proposal for a Taxonomic Revision of the Phylum. **Frontiers in Microbiology**, Canada, v. 4, n. 217, p. 1-18, Jul., 2013.
- KOCHI, L. T. et al. The Interaction of Two Novel Putative Proteins of *Leptospira interrogans* with E-cadherin, Plasminogen and Complement Components with Potential Role in Bacterial Infection. **Virulence**, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 734-753, Dec., 2019.
- McBRIDE, A. J. A. et al. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Salvador, v. 18, n. 5, p. 376-386, Oct., 2005.
- PINHO, R. B. et al. A Novel Approach for an Immunogen Against *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection: An *Escherichia coli* Bacterin Expressing Phospholipase D. **Microbial Pathogenesis**, Pelotas, v. 151, n. 104746, Feb., 2021.
- SHARMA, V. K.; DEAN-NYSTROM, E. A.; CASEY, T. A. 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**, United States of America, v. 29, n. 31, p. 5078-5086, Jul., 2011.
- TEIXEIRA, A. F. et al. Immunoprotective Activity Induced by Leptospiral Outer Membrane Proteins in Hamster Model of Acute Leptospirosis. **Frontiers in Immunology**, São Paulo, v. 11, n. 568694, p. 1-11, Oct., 2020.
- VERMA, R.; KHANNA, P.; CHAWLA, S. Whole-Cell Inactivated Leptospirosis Vaccine: Future Prospects. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, India, v. 9, n. 4, p. 763-765, Jan., 2013.