

## CONSTRUÇÃO *IN SILICO* DE UMA QUIMERA RECOMBINANTE COMPOSTA POR PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DE *Leptospira interrogans* PARA A FORMULAÇÃO DE VACINAS CONTRA LEPTOSPIROSE

RAFAEL CARRACENA DE SOUZA TAPAJÓZ<sup>1</sup>; FRANCISCO DENIS SOUZA SANTOS<sup>2</sup>; NATASHA RODRIGUES DE OLIVEIRA<sup>3</sup>; MARA ANDRADE COLARES MAIA<sup>4</sup>; THAÍS LARRÉ OLIVEIRA<sup>5</sup>; ODIR ANTÔNIO DELLAGOSTIN<sup>6</sup>

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

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

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – oliveira\_natasha@hotmail.com

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

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

<sup>6</sup>Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – odirad@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença bacteriana zoonótica ocasionada por espiroquetas do gênero *Leptospira* (GUPTA; MAHMOOD; ADEOLU, 2013). Dispõe de uma vasta distribuição geográfica, manifestando uma prevalência característica em países tropicais e subtropicais (CASTRO et al., 2008). Para a prevenção da doença, diminuição do perigo de infecção e por consequência das perdas econômicas e sociais, o controle e a prevenção da zoonose são essenciais (CASTRO et al., 2008) e, no âmbito veterinário, isto baseia-se na vacinação sistemática do rebanho (CASTRO et al., 2008).

As vacinas representam a técnica de prevenção para doenças infecciosas com a relação custo-benefício mais vantajosa já utilizada na saúde pública e é a medida mais recomendada contra a leptospirose (McBRIDE et al., 2005). As vacinas à disposição no mercado contra a doença, bacterinas, são suspensões celulares mono ou polivalentes (VERMA; KHANNA; CHAWLA, 2013) de células inteiras inativadas por calor ou quimicamente, que provocam uma resposta imunológica majoritariamente contra o lipopolissacarídeo (LPS) da membrana da célula bacteriana (ADLER, 2014). Já as vacinas de subunidades proteicas baseadas em antígenos recombinantes representam uma estratégia atraente para superar as limitações das vacinas convencionais, conferindo maior segurança e com potencial para indução de proteção cruzada duradoura (DELLAGOSTIN et al., 2011; 2017).

As proteínas LIC12287, LIC11711 e LIC13259 foram selecionadas com base em sua localização celular, a partir de análises *in silico* e através da identificação por estratégia de vacinologia reversa por FIGUEREDO et al. (2017); KOCHI et al. (2019) e CAVENAGUE et al. (2019). Estas, são lipoproteínas de localização no espaço periplasmático extracelular da bactéria, o que sugere um potencial de contribuição nos processos de evasão e invasão imune nos hospedeiros, revelando desta forma uma possível função na virulência (CAVENAGUE et al., 2019; FIGUEREDO et al., 2017; KOCHI et al., 2019).

Assim sendo, é fundamental que se busquem estratégias para a formulação de vacinas contra a leptospirose que induzam uma proteção com maior eficácia e a longo prazo (CONRAD et al., 2017; DELLAGOSTIN et al., 2017; TEIXEIRA et al.,

2020). Portanto, o objetivo deste estudo foi a análise *in silico* e a construção de gene sintético que codifica uma quimera, a partir de segmentos antigênicos de LIC12287, LIC11711 e LIC13259, para a formulação de vacinas contra leptospirose.

## 2. METODOLOGIA

Para a construção da quimera LIC12287/LIC11711/LIC13259 (QLIC) as sequências de aminoácidos das proteínas LIC12287, LIC11711 e LIC13259 foram obtidas através do banco de dados *Genbank* (acessos AE016823.1 e AE016824.1 do genoma de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa L1-130). A identificação da presença de peptídeo sinal foi realizada através do software SignalP-6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP>). A predição da estrutura tridimensional das proteínas foi realizada no servidor I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>). A identificação de epítópos imunogênicos reconhecidos por células B foi realizada pelo software BepiPred-2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?BepiPred-2.0>). Foi realizada a computação de parâmetros físicos e químicos através do software ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>). Na construção da QLIC foi adicionado um *linker* de 8 glicinas e 2 serinas. O gene sintético que codifica a QLIC, foi sintetizado pela empresa GenOne Biotech (Rio de Janeiro), com códons otimizados para *Escherichia coli* e clonado no vetor pET28a, entre os sítios de restrição de *Nhel* e *EcoRI*.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

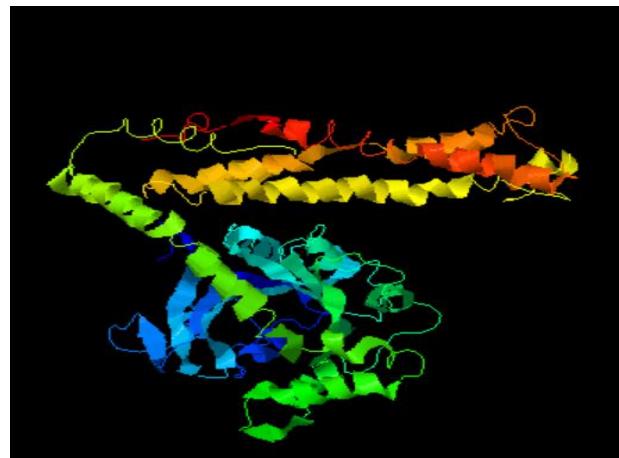
Após a obtenção das sequências de aminoácidos das proteínas LIC12287, LIC11711 e LIC13259 através do banco de dados *Genbank* a QLIC foi construída com a inserção de um *linker* de 8 glicinas e 2 serinas (GGGGSGGGGS) para permitir o dobramento adequado (Figura 1).



*Linker: GGGGSGGGGS.*

**Figura 1.** Representação esquemática da QLIC, clonada no vetor pET28a, entre os sítios de restrição *Nhel* e *EcoRI*. Cada proteína é conectada pelo *linker* de 8 glicinas e 2 serinas para permitir o dobramento adequado, apresentado em amarelo.

A predição da estrutura tridimensional da QLIC foi realizada no servidor I-TASSER e podemos visualizá-la na Figura 2.



**Figura 2.** Predição *in silico* da estrutura conformacional da proteína quimérica QLIC (I-TASSER).

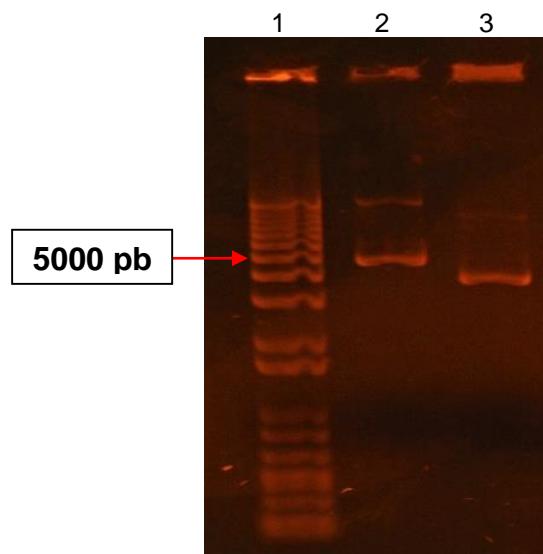
Por fim, foi realizada a computação de parâmetros físicos e químicos de cada sequência de proteína e da sequência da QLIC através do software ProtParam, resultados podem ser visualizados na Tabela 1.

**Tabela 1** – Parâmetros Físicos e Químicos (ProtParam) – LIC12287, LIC11711, LIC13259 e QLIC

Parâmetros físicos e químicos	LIC12287	LIC11711	LIC13259	QLIC
Número de aminoácidos	118	182	114	434
Peso molecular (kDa)	12,37	20.72	13.05	47.38
Ponto isoelétrico teórico (pI)	8.54	6.40	5.42	6.48
Número total de átomos	1750	2933	1835	6668
Meia vida ( <i>E. coli</i> , <i>in vivo</i> )	10 h	3 min	10 h	10 h
Índice de instabilidade (II)	33.66*	29.35*	35.81*	34.84*
Índice alifático	84.32	85.05	80.35	79.70
Grande média de hidropatia (GRAVY)	-0.12	-0.67	-0.556	-0.48

\* Isso classifica a proteína como estável.

A sequência codificadora de interesse foi corretamente clonada, resultando em um fragmento próximo do tamanho esperado de 6695 pb (Figura 3).



**Figura 3.** Análise em eletroforese em gel de agarose 0,8% para caracterizar os vetores pET28a/quimera e pET28a. 1, Marcador de peso molecular 1 Kb *Plus DNA Ladder*; 2, pET28a/quimera; 3, pET28a.

## 4. CONCLUSÕES

Levando em conta a construção, obtenção e clonagem da quimera recombinante composta pelas proteínas de membrana externa de *L. interrogans* LIC12287, LIC11711 e LIC13259 no vetor pET28a como um gene sintético, será avaliado o potencial imunoprotetor e esterilizante de formulações vacinais em hamsters para validar sua aplicação como um potencial alvo vacinal contra leptospirose, buscando estratégias que induzam uma proteção mais eficiente e a longo prazo contra a doença.

## 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.

DELLAGOSTIN, O. A. et al. Recombinant Vaccines Against Leptospirosis. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, Pelotas, v. 7, n. 11, p. 1215-1224, Nov., 2011.

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.

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.