

PROCESSO DE EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE OMPL81 DE *Leptospira Interrogans* PARA O DESENVOLVIMENTO DE VACINAS CONTRA LEPTOSPIROSE

ANAEL DA LUZ MOREIRA¹; GABRIEL SAN MARTINS KUNDE²; BEATRIZ SANTOS³; MARA ANDRADE COLARES MAIA⁴; NATASHA RODRIGUES DE OLIVEIRA⁵; THAIS LARRÉ OLIVEIRA BOHN⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – anaeldaluz@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – sanmartinskundegabriel@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – bcdms2009@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – maracamaia@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – oliveira_natasha@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – thais.larreoliveira@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de vacinas foi um dos grandes marcos da história, promovendo controle e erradicação de diversas doenças infecciosas (DINIZ & FERREIRA, 2010). A leptospirose, infecção causada por bactérias do gênero *Leptospira*, é transmitida por meio do contato com a urina de animais, principalmente roedores, e trata-se de uma das zoonoses de maior distribuição mundial, causando, quando sintomática, febre, enjoo e dores no corpo e, em manifestação severa, danos sistêmicos aos rins, fígado e pulmão (RAMOS et al, 2021). No Brasil, há um número crescente de casos da doença, tendo sido registrados um total de 3.338 no ano de 2023, e 1.358 até maio de 2024, concentrados nas regiões Sul e Sudeste do país (BRASIL, 2024). A leptospirose é uma patologia passível de ser controlada por meio da vacinação de animais que possam servir de reservatório para a doença, como bovinos, porém as vacinas disponíveis apresentam diversas limitações. Atualmente não existe um imunizante eficiente para humanos, o que torna a busca por um meio de controle desta patologia de suma importância, levando em conta os impactos econômicos e sociais que ela acaba por ter (OLIVEIRA, 2014). A tecnologia do DNA recombinante é considerada uma ferramenta promissora para a produção de antígenos para o desenvolvimento de vacinas. Isto se dá pela segurança e pureza oferecidas, uma vez que não se obtém o antígeno vacinal diretamente do organismo patogênico que será o alvo a ser controlado pela vacinação (DELLAGOSTIN et al., 2017).

As proteínas do tipo TBDR (*TonB Dependent Receptor*) são encontradas na membrana de bactérias gram-negativas, como a própria *Leptospira*, e atuam na captação de íons ferrosos por meio de transporte ativo. Sua localização na célula, o alto grau de similaridade compartilhado entre elas, assim como seu elevado grau de conservação dentro de espécies patogênicas de *Leptospira* spp., torna as proteínas do tipo TBDR potenciais candidatas para a produção de vacinas contra a leptospirose (MAIA et al, 2022). O processo de síntese de uma proteína recombinante para a fabricação de uma vacina de subunidade é dividido em diversas etapas, sendo destas, a padronização da expressão e a purificação pontos essenciais para obtenção de um produto com alto rendimento e pureza (WINGFIELD, 2015). Assim, com base nos tópicos apresentados, o presente trabalho tem por objetivo abordar o processo de expressão e purificação da proteína recombinante OMPL81, adotando a mesma como possível alvo vacinal contra a leptospirose.

2. METODOLOGIA

2.1 Expressão heteróloga da proteína rOMLP81:

O gene codificante para a proteína OMLP81 foi previamente clonado no vetor pAE por nosso grupo de pesquisa, sendo utilizada a bactéria *Escherichia coli* BL21(DE3) Star para expressar o antígeno alvo. O plasmídeo pAE/*ompl81* foi inserido via choque térmico na bactéria e a mesma, após a transformação, foi cultivada em um *erlenmeyer* contendo 25 mL de meio Luria Bertani (LB) acrescido de glicose 1 mM e ampicilina a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, o qual foi incubado nestas condições por 16-18 horas na temperatura de 37 °C sob agitação de 180 RPM (rotações por minuto). Após este período, o pré-inóculo foi inoculado em um *erlenmeyer* de 2 litros, contendo 500 mL de meio LB e submetido às condições descritas anteriormente, até que as células atingissem a fase *log* de crescimento, aferida pela densidade óptica (DO) a 600 nm, quando a indução da expressão da proteína foi feita utilizando IPTG 0,5 mM. A cultura induzida foi mantida sob agitação a 37 °C durante 3 horas. Alíquotas foram coletadas nos períodos pré e pós indução para posterior análise por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Os resultados da eletroforese foram confirmados posteriormente por meio da técnica de *Western blot* usando anticorpo monoclonal anti-histidina.

2.2 Purificação da proteína rOMLP81:

O processo de purificação da proteína foi realizado utilizando cromatografia líquida de afinidade em uma coluna de níquel (Cytiva), conforme descrito por Brenzolin et al. (2009). Após, foram realizadas as eluições em diferentes porcentagens de imidazol, as alíquotas contendo as eluições da proteína foram analisadas através de SDS-PAGE 12%. As frações que continham maior grau de pureza da proteína foram submetidas ao processo de diálise em tampão fosfato-salina (PBS) contendo concentrações decrescentes de ureia, posteriormente foram alíquotadas e conservadas à -20 °C. A proteína foi quantificada utilizando o kit BCATM Protein Assay (Pierce).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão da proteína rOMLP81 ocorreu de maneira satisfatória na cepa de expressão *E. coli* Star, sendo confirmada pelo *Western blot*, através do qual foi possível identificar uma banda de 61,9 kDa, que corresponde ao tamanho esperado da proteína na porção insolúvel do extrato (Figura 1). Nota-se que a proteína, no entanto, começou a ser expressa antes do processo de indução. Alguns métodos podem auxiliar na diminuição deste problema, como o uso de temperaturas menores durante a fase de cultivo, conforme mostrado por Francis & Page, 2010.

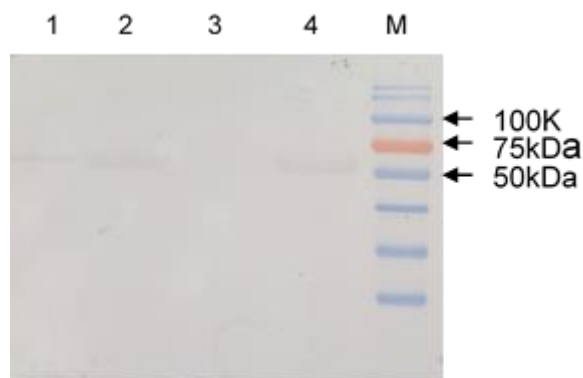


Figura 1. Caracterização da expressão da proteína rOMPL81 por Western blot. 1, amostra não induzida; 2, amostra induzida; 3, fração solúvel; 4, fração insolúvel; M, marcador de peso molecular.

O processo de solubilização em ureia para recuperação da proteína dos corpos de inclusão, assim como a purificação, ocorreu de maneira igualmente eficiente. A proteína recombinante foi recuperada com boa pureza (Figura 2) e rendimento de 21,756 mg/L.

|1| |2| |3| |4| |5| |6| |7| |8|



Figura 2. Gradiente de eluição da proteína rOMPL81 purificada por cromatografia de afinidade. Concentrações de *elution* 10% (1), 15% (2), 20% (3) , 30% (4), 40% (5), 40% (6), 100%(7), 100% (8)

4. CONCLUSÕES

Os processos de expressão e purificação da proteína rOMLP81, utilizando-se do sistema heterólogo de *E. coli* Star se mostraram eficazes, sendo obtida a proteína com boa pureza e rendimento. Futuramente esta proteína poderá ser utilizada em formulações vacinais que visam combater a leptospirose em modelos experimentais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRESOLIN, I. T. L.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. A. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. Química Nova, v. 32, n. 5, p. 1288–1296, 2009.

DELLAGOSTIN, O. et al. Reverse Vaccinology: An Approach for Identifying Leptospiral Vaccine Candidates. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 1, p. 158, 14 jan. 2017.

DINIZ, M. DE O.; FERREIRA, L. C. DE S. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. *Estudos Avançados*, v. 24, n. 70, p. 19–30, 2010.

FRANCIS, D. M.; PAGE, R. Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. *Current protocols in protein science*, v. Chapter 5, p. Unit 5.24.1-29, 1 ago. 2010.

GARCÍA-FRUITÓS, E. *Insoluble Proteins*. [s.l.] Humana, 2016.

MAIA, M. A. C. et al. Challenges for the development of a universal vaccine against leptospirosis revealed by the evaluation of 22 vaccine candidates. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 12, p. 940966, 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024, <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leptospirose/situacao-epidemiologica>, Acessado em 19 de setembro de 2024.

MUS-VETEAU, I. *Heterologous expression of membrane proteins: methods and protocols*. New York, NY: Humana Press, 2022.

OLIVEIRA, T. L. Vacinas contra leptospirose: potencial imunoprotetor do antígeno OmpL37. PDF— Universidade Federal de Pelotas: [s.n.].

WINGFIELD, P. T. Overview of the Purification of Recombinant Proteins. *Current Protocols in Protein Science*, v. 80, n. 6, p. 6.1.1–6.1.35, 1 abr. 2015.