

Produção de soro hiperimune contra proteína recombinante OmpL58 de *Leptospira* spp. visando sua utilização como potencial alvo vacinal

ANA CAROLINA KURZ PEDRA¹; MARA ANDRADE COLARES MAIA²; NATASHA RODRIGUES DE OLIVEIRA²; TIFFANY THUROW BUNDE²; ODIR ANTÔNIO DELLAGOSTIN²; THAÍS LARRÉ OLIVEIRA³

¹Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – caarolpedra@hotmail.com

²Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – maraacmaia@gmail.com

²Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – oliveira_natasha@hotmail.com

²Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – tiffany_bia@hotmail.com

² Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – odir@ufpel.edu.br

³ Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – thais.larreoliveira@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose com ampla distribuição mundial causada por bactérias espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, sendo transmitida aos humanos através do contato direto ou indireto com a urina de animais reservatórios, os quais possuem a bactéria presente em seus túbulos renais (TUNCUNDUVA et al, 2008). No Brasil, a leptospirose é uma doença endêmica, tornando-se epidêmica em períodos chuvosos, principalmente nas capitais e áreas metropolitanas, devido às enchentes associadas, à aglomeração populacional de baixa renda, às condições inadequadas de saneamento e à alta infestação de roedores infectados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

A vacinação é um dos métodos mais eficazes na prevenção e erradicação de doenças infecciosas (DELLAGOSTIN et al., 2011). A utilização de vacinas contra a leptospirose humana ocorre em alguns países como China, Cuba, Japão e França. Entretanto, estas vacinas são bacterinas, e apresentam efeitos adversos locais e sistêmicos, além de conferir proteção apenas contra os sorovares que compõem a vacina, não sendo capaz de fornecer uma proteção de amplo espectro, nem de longa duração (KOIZUMI e WATANABE, 2005). A melhor alternativa para sanar as deficiências apresentadas pelas bacterinas é o desenvolvimento de uma vacina recombinante.

A utilização de ferramentas de vacinologia reversa e estrutural permite identificar potenciais alvos vacinais que são conservados em espécies patogênicas e expostos na membrana externa, com maior potencial de estimular uma resposta de memória imunológica e reduzir a ocorrência de efeitos colaterais devido ao seu elevado grau de pureza. Baseando-se nessa abordagem, nosso grupo identificou proteínas preditas como barril- β transmembrana (β b-OMP) que estão presentes na membrana externa de *Leptospira* spp. (DELLAGOSTIN et al., 2011; GRASSMANN et al., 2017). Dentre estas proteínas, estão a família das BamA, o principal e vital componente do complexo de máquinas de montagem em barril β (BAM) nas bactérias gram-negativas. Destacou-se então, a proteína OmpL58 caracterizada por ser responsável por catalisar o enrolamento e a inserção de proteínas do barril β na membrana externa de bactérias gram-

negativas, e por possuir um grande domínio periplasmático ligado a uma transmembrana de domínio β - barril.

Sabendo-se disso, o objetivo deste trabalho foi a produção de soro hiperimune contra a proteína OmpL58 produzida de forma recombinante para futura caracterização da sua localização subcelular e utilização deste antígeno como potencial alvo vacinal.

2. METODOLOGIA

2.1 Produção e caracterização da proteína recombinante

O gene produzido de forma sintética contendo apenas os fragmentos da proteína OmpL58 expostos na membrana externa da bactéria foi clonado no vetor de expressão pAE, que posteriormente foi utilizado para transformar a cepa de expressão *Escherichia coli* BL21 (DE3) pela técnica de choque térmico. Foi feito o pré-inóculo e posteriormente o inóculo utilizando 500 mL do meio de crescimento adequado para *E. coli*. A cultura foi monitorada até sua fase de crescimento exponencial e a expressão da proteína recombinante foi induzida utilizando isopropil β -D-1-tiogalatopiranosídeo (IPTG). Após 3 h, o cultivo foi centrifugado e as células foram solubilizadas com tampão adequado e lisadas por sonicação. Em seguida, as células foram novamente centrifugadas e o pellet solubilizado utilizando tampão sem ureia. A proteína foi filtrada, purificada por cromatografia de afinidade ao níquel e, posteriormente, as alíquotas mais puras foram dialisadas contra tampão fosfato-salino (PBS). Para a caracterização da proteína recombinante, as alíquotas purificadas foram separadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15% e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose. O reconhecimento da proteína foi realizado utilizando anticorpo monoclonal anti-6 $\times$ His conjugado com a enzima peroxidase. As reações foram reveladas usando diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio.

2.2 Produção do soro hiperimune

Para a produção do soro, foram utilizados dois ratos Wistar fêmeas com 6 semanas de idade em que receberam três doses do antígeno vacinal, com um intervalo de 3 semanas entre a primeira e segunda dose, e após duas semanas foi feita a terceira imunização. A formulação vacinal continha 50 μ g da proteína recombinante emulsificada em adjuvante de Freund (completo na primeira dose e incompleto nas doses subsequentes). A eutanásia dos animais foi feita por aprofundamento de anestesia inalatória e exsanguinação cardíaca para coleta de sangue total.

2.3 Western blot e ELISA

Foram realizadas as técnicas de *Western blot* e ELISA para avaliação da especificidade e sensibilidade do soro produzido. Utilizando SDS- PAGE 15% proteínas com concentrações de 100 ng até 1.562 ng foram separadas. Posteriormente foi feita a transferência de proteínas do SDS-PAGE para uma membrana de nitrocelulose, seguido de uma etapa de bloqueio com leite em pó 5% diluído em PBST para evitar reações inespecíficas. Em seguida, a membrana foi incubada com o soro hiperimune em uma diluição 1:1000. Foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgG de rato conjugado com a enzima peroxidase, na diluição 1:5000 e, posteriormente, as reações foram reveladas conforme descrito no item 2.1. Para o ensaio ELISA foi feita a sensibilização da placa com 100 ng da

proteína recombinante por poço da placa, em duplicata. Foi realizada a diluição dos soros em base 2, de 1:100 até 1:6.553.600. O anticorpo secundário utilizado foi anti-IgG de rato conjugado na diluição 1:5000. Posteriormente foi feita a revelação através da reação colorimétrica e sua absorbância foi determinada a 492 nm. Análise estatística foi realizada por ANOVA.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão heteróloga e a purificação da proteína recombinante foram efetivas, como demonstrado nas técnicas de *SDS-PAGE* (Figura 1A) e *Western blot* (Figura 1B) utilizando anticorpo monoclonal anti-6xHis. A proteína apresentou o tamanho esperado de aproximadamente 16 kDa.

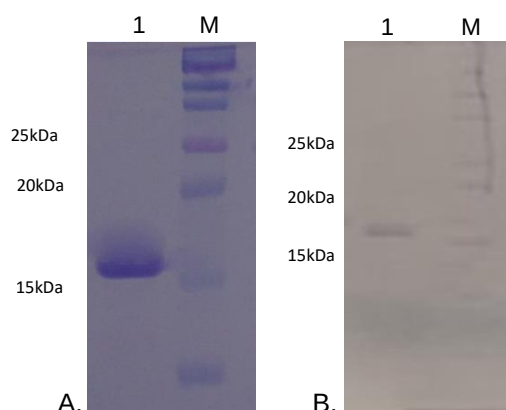


Figura 1. Caracterização da proteína. A: *SDS-PAGE* da expressão da proteína recombinante; B: *Western blot* confirmando a identidade recombinante da proteína. M. Marcador de peso molecular; 1. rOmpL58 com tamanho aproximado de 16 kDa.

A produção do soro hiperimune em ratos Wistar foi eficiente, como demonstrado no *Western blot* realizado (Figura 2), em que foi capaz de reconhecer até 1,562 ng da proteína, assim demonstrando que a proteína pode ser considerada imunogênica.

M 1 2 3 4 5 6 7 8

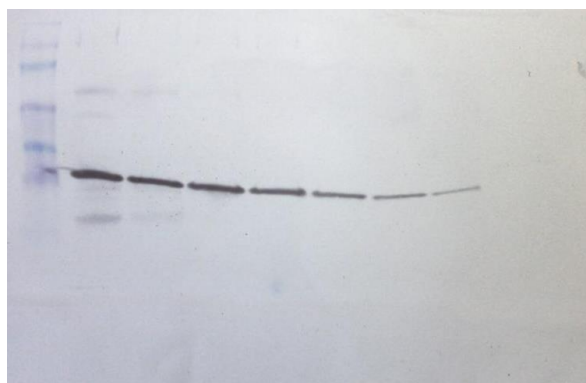


Figura 2: *Western blot* para caracterização do soro contra a proteína rOmpL58; M. Marcador de massa molecular; 1.100 ng rOmpL58; 2. 50 ng; 3. 25 ng; 4. 12,5 ng; 5. 6,25 ng; 6. 3,125 ng; 7. 1,562 ng; 8. Controle negativo.

O ELISA realizado também foi eficiente, demonstrando que teve absorbância visível até a diluição de 1:819.200 (Figura 3), sendo este considerado o título do soro produzido. Assim podemos afirmar a alta sensibilidade do soro hiperimune e a imunogenicidade da proteína rOmpL58.

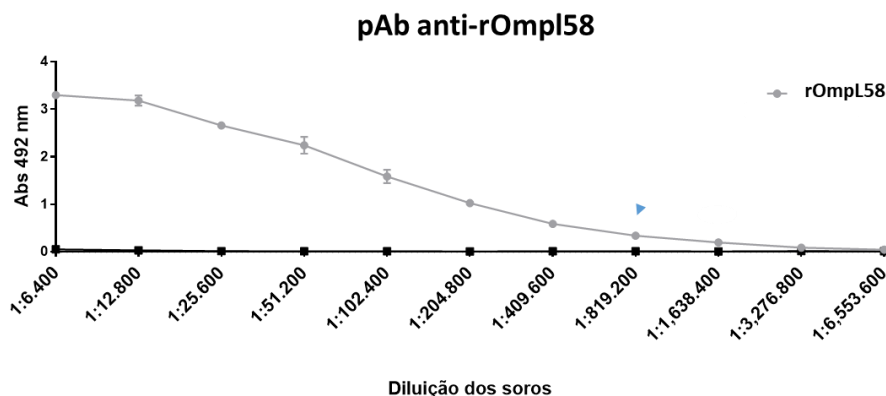


Figura 3. Titulação por ELISA indireto do soro policlonal produzido contra a proteína rOmpL58.

4. CONCLUSÕES

A produção do soro hiperimune permitiu demonstrar que a proteína é imunogênica, ou seja, possui a capacidade de estimular uma resposta imune específica no hospedeiro. O soro demonstrou ter uma alta sensibilidade pela proteína recombinante sendo, assim, um importante insumo para futuramente identificar a localização subcelular dessa proteína. A partir disso pretende-se, também, avaliar o potencial da proteína rOmpL58 como um antígeno contra a leptospirose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DELLAGOSTIN, O.A., GRASSMANN, A.A., HARTWIG, D.D., FÉLIX, S.R., DA SILVA, É.F., MCBRIDE, A.J.A., Recombinant vaccines against leptospirosis. **Human Vaccin.** v. 7, n. 11, p. 1215–24, 2011.

GRASSMANN, A.A., KREMER, F.S., DOS SANTOS, J.C., SOUZA, J.D., PINTO, L. DA S., MCBRIDE, A.J.A., Discovery of Novel Leptospirosis Vaccine Candidates Using Reverse and Structural Vaccinology. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 463, 2017.

HAAKE, D. A.; LEVETT, P. N. Leptospirosis in humans. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 387, p. 65–97, 2015.

COSTA, F. et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. e0003898, 2015.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. **Vaccine**, v. 22, n. 11–12, p. 1545–1552, 2004.