

PROTÓTIPO VACINAL BASEADO EM BACTERINA RECOMBINANTE DE
Escherichia coli EXPRESSANDO PORÇÕES DE RECEPTORES
DEPENDENTES DE TonB DE *Leptospira* spp.

PEDRO HENRIQUE FILGUEIRAS COELHO SOUZA¹; VITÓRIA ADRIELLY
CATSCHOR DOS SANTOS²; MARA ANDRADE COLARES MAIA³; DOMITILA
BRZOSKOWSKI CHAGAS⁴; JADY DUARTE NOGUEIRA⁵; THAÍS LARRÉ
OLIVEIRA⁶

¹ Universidade Federal de Pelotas – pedroh577@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – vitoriacatschor@gmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – maraacmaia@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – chagas.domitila@gmail.com

⁵ Universidade Federal de Pelotas – jadyduartenogueira2@hotmail.com

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

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença grave que, apesar de ser infecciosa e atingir tanto áreas urbanas quanto rurais, é constantemente negligenciada. A principal forma de contágio é através do contato com a urina de roedores infectados. A melhor forma de prevenção contra essa zoonose, é o investimento em infraestrutura e saneamento básico de qualidade, porém em países em desenvolvimento, como o Brasil, esse tipo de medida acaba sendo de difícil implementação (DELLAGOSTIN, 2011; WHO, 2011; KARPAGAM, 2020).

É sabido que as vacinas contra leptospirose previnem a doença. As vacinas de bacterina, atualmente presentes no mercado, consistem em leptospirosas inteiras inativadas (ADLER, 2015). Entretanto, existem limitações referentes a essas formulações, como o fato das mesmas não conferirem proteção cruzada contra os diferentes sorovares da bactéria (KOIZUMI, 2005). Até o presente momento, as soluções para superar essas limitações tem focado no desenvolvimento de vacinas recombinantes baseadas em antígenos conservados em diferentes sorovares da bactéria (DELLAGOSTIN, 2011).

Proteínas imunogênicas de *Leptospira*, preferencialmente expostas na superfície da membrana externa, são ditos bons alvos vacinais (DELLAGOSTIN, 2011; GRASSMANN, 2017). Os receptores dependentes de TonB (TBDR) são uma classe de proteínas de membrana bem conservadas, que desempenham papéis vitais no metabolismo bacteriano. A partir de epítomos selecionados nesses receptores, foi confeccionada uma quimera denominada rTBDR, a qual já foi descrita como um bom alvo vacinal contra *Leptospira* spp. (BETTIN, 2022).

Vacinas recombinantes baseadas em bacterinas de *Escherichia coli* apresentam vantagens como baixo custo de produção, segurança e expressão de proteínas heterólogas em altos níveis (MOREIRA et al, 2020). Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo produzir e caracterizar uma bacterina de *E. coli* recombinante expressando a quimera rTBDR, para posterior avaliação de seu potencial imunoprotetor contra leptospirose.

2. METODOLOGIA

A bactéria *Escherichia coli* cepa BL21 Star foi transformada por choque térmico com o plasmídeo recombinante pAE/rTBDR, previamente construído pelo nosso grupo (BETTIN, 2022) e apenas com o plasmídeo pAE sem inserto, usado como controle negativo. Posteriormente, ambas as cepas foram cultivadas em 10 mL de caldo Luria-Bertani (LB) com acréscimo de ampicilina ($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) por 16-18h à 37°C sob agitação. Após esse período, os cultivos foram inoculados em frascos contendo 100 mL de meio LB com ampicilina e incubados nas mesmas condições citadas anteriormente. Ao atingir a fase logarítmica de crescimento ($\text{DO}_{600\text{nm}}$ 0,6), a expressão da proteína foi induzida com 0,5 mM de IPTG (Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo) por 3h sob as mesmas condições. Alíquotas do cultivo de *E. coli* foram coletadas antes e depois da indução para avaliação da expressão das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%.

Posteriormente, o cultivo foi centrifugado à $5000 \times g$ por 10 min, o sobrenadante descartado e o pellet ressuscitado em 10 mL de tampão fosfato-salino (PBS) com ajuste para a concentração de 10^7 UFC/mL para então ser alíquotado em microtubos de 1,5 mL contendo 1 mL em cada. As alíquotas foram submetidas ao tratamento por calor à 80°C por 30 min, com o objetivo de inativação celular, conforme descrito em Sharma et al. (2011). Para confirmar a inativação e inibição do crescimento celular, foi realizado um inóculo de 50 μL em caldo LB. Uma alíquota da amostra pós inativação foi coletada para a extração de plasmídeo utilizando kit comercial e, posteriormente, o DNA extraído foi avaliado por corrida eletroforética em gel de agarose 0,8%.

Além disso, alíquotas pré e pós-inativação foram utilizadas para avaliação da integridade da proteína rTBDR após o tratamento com calor. Para isso, as alíquotas foram submetidas à SDS-PAGE 12% seguido de eletrotransferência para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada em solução de bloqueio (leite em pó 5% diluído em PBS-T), submetida à lavagens com PBS-T e, após, incubada por 1 h sob agitação constante em PBS-T contendo anticorpo monoclonal de camundongo anti-cauda de histidina conjugado com peroxidase (1:10000). A reação na membrana foi revelada em solução cromógena composta por 6 mg de tetrahidrocloreto de diaminobenzedina (DAB), 15 μL de H_2O_2 30%, 9 mL de Tris-HCl 50 mM pH 7,6 e 1 mL de sulfato de níquel 0,3% (NiSO_4).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão da proteína ocorreu de forma eficiente após indução com IPTG, e foi detectada através de SDS-PAGE no tamanho esperado de aproximadamente 40 kDa (Figura 1). Por outro lado, nenhuma diferença no padrão de expressão foi detectada nas amostras pré e pós-indução da cepa de *E. coli* transformada com o plasmídeo pAE sem inserto, usado como controle negativo.

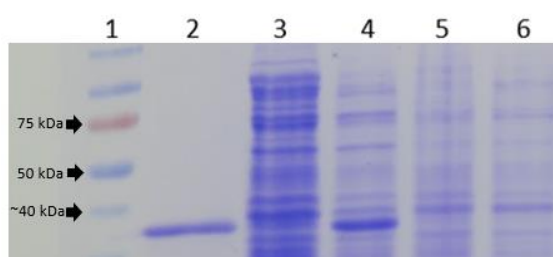


Figura 1. Confirmação da expressão da proteína rTBDR através de SDS-PAGE. 1. Marcador de peso molecular; 2. rTBDR purificada; 3. *E. coli* transformada com vetor pAE/rTBDR não induzida; 4. *E. coli* transformada com vetor pAE/rTBDR induzida; 5. *E. coli* transformada com vetor pAE não induzida; 6. *E. coli* transformada com vetor pAE induzida.

A inativação da bactéria ocorreu de forma efetiva e foi confirmada pela ausência de crescimento nas amostras semeadas em caldo LB. Além disso, a eletroforese em gel de agarose permitiu visualizar que o tratamento com calor também promoveu a degradação do DNA plasmidial, validando a inativação por temperatura (Figura 2).



Figura 2. Avaliação da degradação do DNA plasmidial pós-inativação através de eletroforese em gel de agarose. 1. Plasmídeo extraído da bacterina pAE/rTBDR; 2. Plasmídeo extraído da bacterina pAE; 3. Vetor pAE utilizado como controle.

Através das técnicas de SDS-PAGE e *Western Blot*, foi possível detectar que a proteína em questão se mantém íntegra mesmo após a inativação celular, além de continuar sendo reconhecida por anticorpo específico (Figura 3).

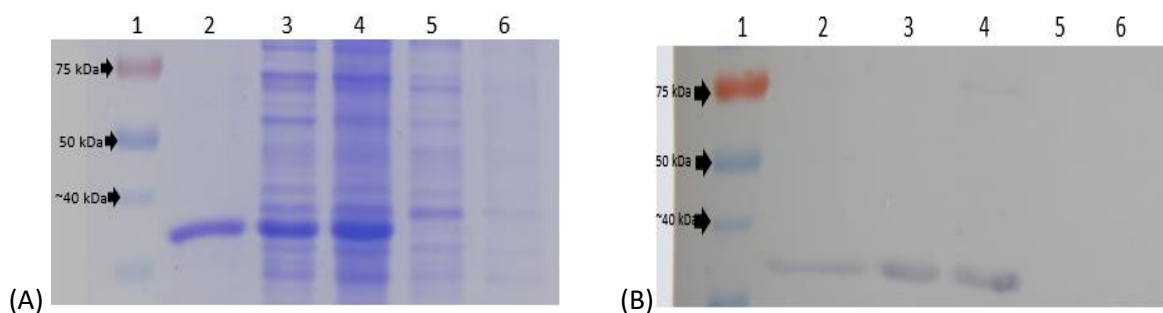


Figura 3. Avaliação da integridade da proteína rTBDR após o processo de inativação. (A) SDS-PAGE e (B) *Western Blot*. 1. Marcador de peso molecular; 2. rTBDR purificada; 3. *E. coli* transformada com pAE/rTBDR pré inativação; 4. *E. coli* transformada com pAE/rTBDR inativada por calor; 5. *E. coli* transformada com pAE pré inativação; 6. *E. coli* transformada com pAE inativada.

4. CONCLUSÕES

A inativação celular ocorre de forma eficiente após tratamento com calor nas condições aqui apresentadas. Esse processo também promove a degradação do material genético plasmidial, conferindo maior segurança à formulação. A integridade da proteína rTBDR é mantida mesmo após a inativação da cepa recombinante de *E. coli*, corroborando com o seu uso na formulação de um protótipo vacinal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER B. Vaccines against leptospirosis. **Curr Top Microbiol Immunol**, v.387, p.251-272, 2015.

BETTIN EB, DORNELES J, HECKTHEUER AS, et al. TonB-dependent receptor epitopes expressed in *M. bovis* BCG induced significant protection in the hamster model of leptospirosis. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.106, n.1, p.173-184, 2022.

DELLAGOSTIN OA, GRASSMANN AA, HARTWIG DD, FÉLIX SR, DA SILVA ÉF, MCBRIDE AJ. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Human vaccines**, v.7, n.11 p.1215-1224, 2011.

DORNELES J, MADRUGA AB, SEIXAS NETO ACP, et al. Protection against leptospirosis conferred by *Mycobacterium bovis* BCG expressing antigens from *Leptospira interrogans*. **Vaccine**, v.38, n.51, p.8136-8144, 2020.

GRASSMANN AA, KREMER FS, DOS SANTOS JC, SOUZA JD, PINTO LDS, MCBRIDE AJA. Discovery of novel leptospirosis vaccine candidates using reverse and structural vaccinology. **Frontiers in immunology**, v.8, p.463, 2017.

KARPAGAM KB, GANESH B. Leptospirosis: a neglected tropical zoonotic infection of public health importance-an updated review. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v.39, n.5, p.835-846, 2020.

KOIZUMI, N. & WATANABE, H. Leptospirosis resent: past, present, and future. **Journal of postgraduate medicine**, v.51, n.3, p.210-214, 2005.

MOREIRA C Jr, FERREIRA MRA, FINGER PF, et al. Protective efficacy of recombinant bacterin vaccine against botulism in cattle. **Vaccine**, v.38, n.11, p.2519-2526, 2020.

OLIVEIRA TL, RIZZI C, DA CUNHA CEP, et al. Recombinant BCG strains expressing chimeric proteins derived from *Leptospira* protect hamsters against leptospirosis. **Vaccine**, v.37, n.6, p.776-782, 2019.

SHARMA VK, DEAN-NYSTROM EA, CASEY TA. 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**, v.29, n.31, p.5078-5086, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Report of the second meeting of the leptospirosis burden epidemiology reference group. 2011.