

Potencial antigênico de proteínas recombinantes de *Leptospira Interrogans***Antigenic potential of recombinant proteins from *Leptospira Interrogans***

DOI:10.34117/bjdv6n8-177

Recebimento dos originais: 13/07/2020

Aceitação para publicação: 13/08/2020

Tanise Pacheco Fortes

Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas

Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel

Endereço: Avenida Eliseu Maciel, Campus Universitário, S/N - Capão do Leão – RS, Brasil

E-mail: tanisefortes@gmail.com

Amilton Clair Pinto Seixas Neto

Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas

Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel

Endereço: Avenida Eliseu Maciel, Campus Universitário, S/N - Capão do Leão – RS, Brasil

E-mail: amiltonseixas@gmail.com

Gilmar Batista Machado

Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas

Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel

Endereço: Avenida Eliseu Maciel, Campus Universitário, S/N - Capão do Leão – RS, Brasil

E-mail: gilmar.machado84@hotmail.com

Caroline Dewes

Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas

Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel

Endereço: Avenida Eliseu Maciel, Campus Universitário, S/N - Capão do Leão – RS, Brasil

E-mail: caroldewesvet@hotmail.com

Paula Soares Pacheco

Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas

Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel

Endereço: Avenida Eliseu Maciel, Campus Universitário, S/N - Capão do Leão – RS, Brasil

E-mail: paulassoarespacheco@gmail.com

João Pedro Mello Silva

Discente do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas

Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel

Endereço: Avenida Eliseu Maciel, Campus Universitário, S/N - Capão do Leão – RS, Brasil

E-mail: jptam97@gmail.com

Flávia Aleixo Vasconcelos

Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas
Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel
Endereço: Avenida Eliseu Maciel, Campus Universitário, S/N - Capão do Leão – RS, Brasil
E-mail: aleixo.fv@gmail.com

Éverton Fagonde da Silva

Docente da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas
Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel
Endereço: Avenida Eliseu Maciel, Campus Universitário, S/N - Capão do Leão – RS, Brasil
E-mail: fagondee@gmail.com

RESUMO

A leptospirose é uma zoonose generalizada no mundo. Atualmente, as vacinas comerciais disponíveis não oferecem proteção heteróloga contra todos os sorovares leptospirais. Assim, é importante identificar alvos conservados e capazes de induzir imunidade protetora de amplo espectro. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a antigenicidade de proteínas recombinantes de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni, a fim de selecionar candidatos para o desenvolvimento de uma vacina recombinante contra a leptospirose. Após análise *in silico*, cinco lipoproteínas foram selecionadas (LIC10463, LIC10498, LIC10666, LIC11889 e LIC12666), clonadas e expressas em *Escherichia coli* e purificadas por cromatografia de afinidade. As proteínas recombinantes rLIC10463, rLIC10498, rLIC10666 e rLIC11889 obtidas demonstraram potencial antigênico e, portanto, podem ser utilizadas em ensaios de imunogenicidade e imunoproteção em modelo animal.

Palavras-chave: *Leptospira*, vacinologia reversa, antigenicidade, antígenos recombinantes.

ABSTRACT

Leptospirosis is a widespread zoonosis in the world. Currently, the commercial vaccines available do not offer heterologous protection against all leptospiral serovars. Thus, it is important to identify targets conserved and capable of inducing broad-spectrum protective immunity. In this context, the objective of this study was to evaluate the antigenicity of recombinant proteins from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni, in order to select candidates for the development of a recombinant vaccine against leptospirosis. After *in silico* analysis, five putative lipoproteins were selected (LIC10463, LIC10498, LIC10666, LIC11889, and LIC12666), cloned and expressed in *Escherichia coli* and purified by affinity chromatography. The recombinant proteins rLIC10463, rLIC10498, rLIC10666 and rLIC11889 obtained demonstrated antigenic potential and, therefore, can be used in immunogenicity and immunoprotection assays in animal model.

Keywords: *Leptospira*, reverse vaccinology, antigenicity, recombinant antigens.

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial causada por espécies patogênicas de *Leptospira* (Adler, 2014). A doença é frequente em regiões de clima tropical, como o Brasil, onde aumentos na incidência costumam ser observados durante a estação chuvosa (Blanco *et al.*, 2016). Os hospedeiros suscetíveis adquirem a infecção através do contato com a urina, água ou solo contaminados com a bactéria (Murray, 2013). Depois de penetrar no organismo, a disseminação das leptospirosas acontece rapidamente para órgãos como fígado, pulmões e rins, onde elas podem realizar a colonização (Adler, 2014; Blanco *et al.*, 2016).

Atualmente, as vacinas disponíveis contra a leptospirose são bacterinas, as quais induzem uma resposta imune humoral predominantemente contra o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano (Zeng *et al.*, 2015). Nas leptospirosas, o LPS é uma estrutura altamente variável, possuindo diferenças significativas entre os sorovares, o que torna as bacterinas incapazes de fornecer proteção contra aqueles sorovares que não fazem parte da preparação vacinal (Pinne e Haake, 2009). Diante deste cenário, a identificação de fatores de virulência bacterianos reconhecidos durante os primeiros estágios da resposta imune e que possam ser utilizados no desenvolvimento de uma vacina recombinante capaz de fornecer proteção cruzada, tornou-se importante (Gamberini *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, o sequenciamento e a anotação dos genomas microbianos possibilitou a identificação de potenciais antígenos para o desenvolvimento de vacinas (Gamberini *et al.*, 2005). As proteínas da membrana externa de leptospira (OMP), lipoproteínas e *Leptospiral immunoglobulin-like proteins* (Ligs) tem sido avaliadas como candidatos vacinais em modelo animal. Diferentes grupos de pesquisa já testaram a atividade protetora de proteínas recombinantes de *Leptospira* como vacinas, revelando que nem todas parecem capazes de conferir proteção parcial em hamsters contra o desafio com bactérias virulentas. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a antigenicidade de proteínas recombinantes de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni, a fim de selecionar candidatos para o desenvolvimento de uma vacina recombinante contra a leptospirose.

2 MATERIAL E MÉTODOS

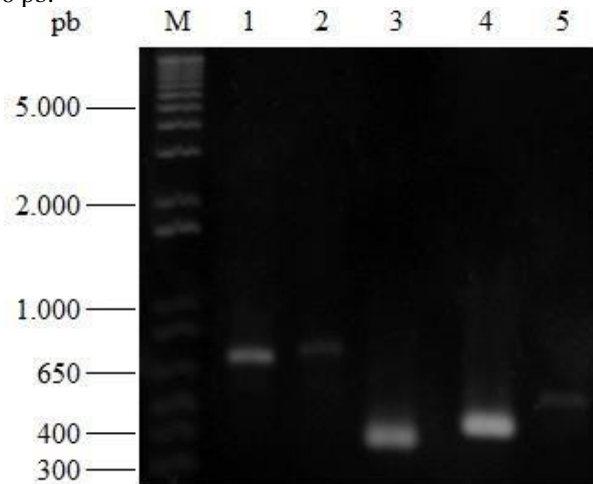
Para a realização deste estudo, *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni foi cultivada em meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) líquido e mantida a 29°C em estufa bacteriológica. A extração do DNA genômico foi realizada utilizando kit comercial *illustra™ bacteria genomicPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare®). Para clonagem e expressão heteróloga, foram utilizadas as cepas *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen®) e *E. coli* BL21 Star (DE3)

(ThermoFisher®), cultivadas a 37°C em meio Luria-Bertani (LB). A seleção das sequências codificadoras foi realizada com base nas informações disponíveis no GenBank (NCBI) e a escolha foi baseada em informações sobre proteínas correspondentes, obtidas a partir de análises no banco de dados *UniProt Knowledgebase* (UniProt KB). Os *primers* foram desenhados com o auxílio do software Vector NTI 11 (Invitrogen®) e sítios para enzimas de restrição foram adicionados em cada uma das extremidades, permitindo a clonagem no vetor pAE de expressão heteróloga em *E. coli*. Após a extração do DNA genômico, os genes foram amplificados através da reação em cadeia da polimerase (PCR) e os amplicons foram analisados através de eletroforese em gel de agarose (Silva *et al.*, 2007). Os genes foram amplificados no vetor pAE (Ramos *et al.*, 2004) e utilizados para transformar células de *E. coli* TOP10 através de choque térmico. Os plasmídeos recombinantes resultantes foram utilizados para transformar a cepa *E. coli* BL21 Star (DE3) e a expressão dos genes LIC10463, LIC10498, LIC10666, LIC11889 e LIC12666 foi induzida pelo uso de isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). As proteínas resultantes foram purificadas através de cromatografia de afinidade com colunas de sefarose e níquel (Ni⁺²) e dialisadas para que voltassem à sua conformação original (Silva *et al.*, 2007). As proteínas recombinantes obtidas foram submetidas à eletroforese com gel 12% (SDS-PAGE) para estimar a massa molecular e a pureza das preparações. A quantificação dos lotes produzidos foi realizada pelo método de Bradford ou BCA. Para o ensaio de antigenicidade, as proteínas recombinantes foram submetidas a um *Western Blotting* com soros obtidos de pacientes convalescentes de leptospirose, utilizando-se para a detecção primária um anticorpo comercial de cabra anti-humano conjugado com peroxidase. A reação foi revelada com diaminobenzidina (DAB) e H₂O₂.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

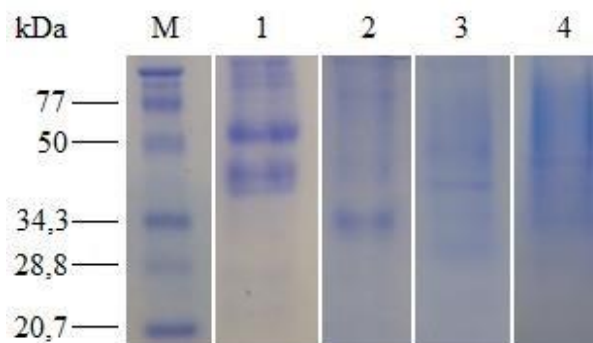
Neste estudo, cinco genes (LIC10463, LIC10498, LIC10666, LIC11889 e LIC12666) foram identificados através do uso de ferramentas de bioinformática e eficientemente amplificados a partir do DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni através de PCR (Figura 1).

Figura 1. Amplificação dos genes selecionados por PCR. (M) Marcador de peso molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen®); (1) LIC11889 - 855 pb (pares de bases); (2) LIC10498 - 890 pb; (3) LIC10666 - 338 pb; (4) LIC12666 - 405 pb; e (5) LIC10463 - 496 pb.



Os clones recombinantes foram selecionados através de triagem e os vetores recombinantes foram detectados através de visualização em gel de agarose. A digestão enzimática foi realizada com o objetivo de confirmar a presença dos insertos no vetor pAE e resultou em um padrão de fragmentos com o tamanho esperado para cada uma das construções (dados não mostrados). As proteínas recombinantes rLIC11889, rLIC10666, rLIC10498 e rLIC10463 foram expressas na forma de corpúsculos de inclusão insolúveis e purificadas através de cromatografia de afinidade. A pureza, estabilidade e quantidade das proteínas obtidas foram avaliadas através de SDS-PAGE (Figura 2), enquanto a antigenicidade foi testada por *Western Blotting* (dados não mostrados). Não foi possível purificar o alvo LIC12666 e, dessa forma, este foi excluído da etapa de antigenicidade.

Figura 2. Análise da pureza e aparente peso molecular das proteínas por SDS-PAGE. Todas as proteínas purificadas foram submetidas à SDS-PAGE 12% e coradas com coomassie blue. (M) Marcador de peso molecular; (1) rLIC11889; (2) rLIC10666; (3) rLIC10463; e (4) rLIC10498.



O ensaio de antigenicidade revelou que todas as proteínas expressas neste estudo reagiram com o pool de soros de pacientes convalescentes de leptospirose. Embora a caracterização da

antigenicidade seja um passo importante durante a identificação de novos candidatos vacinais, não existe, ainda, a confirmação de uma relação direta com a amplitude da resposta imune produzida e a proteção contra a leptospirose. Um exemplo desse fato, é a proteína LipL32, a qual está exposta na superfície da bactéria, é altamente antigênica e imunogênica, mas não parece capaz de induzir imunidade protetora em modelo animal (Murray, 2013).

No Brasil, assim como a América Latina, existe um grande potencial para o desenvolvimento de vacinas contra a leptospirose. Nos últimos anos, grupos de estudo vêm adotando novas estratégias para o desenvolvimento de uma vacina de amplo espectro (Dellagostin *et al.*, 2011), tendo em vista que as vacinas disponíveis contra a leptospirose continuam sendo principalmente bacterinas inativadas pelo calor. Essas bacterinas possuem importantes limitações, incluindo a falha em prevenir a transmissão da enfermidade, já que protegem contra os antígenos presentes na preparação (Adler, 2014). Esse tipo de vacina requer o conhecimento dos principais sorovares causadores da enfermidade num determinado país ou região, para que sejam incluídas as cepas isoladas locais e aqueles sorovares mais prevalentes nos estudos sorológicos (Murray *et al.*, 2013).

Embora a imunidade contra a leptospirose seja predominantemente humoral (Balakrishnan e Roy, 2014), estudos demonstram que bovinos, por exemplo, mesmo com altos níveis de anticorpos aglutinantes, não estavam protegidos da infecção por leptospirosas. Embora a transferência do soro desses bovinos para hamsters tenha induzido imunidade passiva nos roedores, a correlação da imunidade dos bovinos com a resposta Th1 medida pelo IFN- γ resultou em consequências para o desenvolvimento de vacinas para essa espécie animal (Naiman *et al.*, 2001).

Durante a infecção em mamíferos, as leptospirosas patogênicas expressam antígenos que se tornam alvos da resposta imune do hospedeiro. Entre esses antígenos, encontram-se proteínas conservadas entre os diferentes sorovares de *Leptospira* e descritas como alvos importantes para o desenvolvimento de vacinas (Gamberini *et al.*, 2005). Desde a última década, vários alvos proteicos foram identificados como potenciais candidatos vacinais visando o desenvolvimento de uma vacina recombinante contra a leptospirose. No entanto, a grande maioria dos alvos testados não foi capaz de conferir proteção significativa em modelo animal.

4 CONCLUSÃO

No presente estudo, quatro proteínas foram expressas na forma recombinante e purificadas através da cromatografia de afinidade. O ensaio de antigenicidade revelou que todas as proteínas expressas neste estudo reagiram com soros de pacientes convalescentes da leptospirose. Assim,

essas proteínas constituem alvos potenciais para a utilização em ensaios de imunogenicidade e imunoproteção em modelo animal.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES, CNPq e a FAPERGS pelas bolsas de estudo e pelos demais auxílios financeiros para a execução deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ADLER, B. Pathogenesis of leptospirosis: cellular and molecular aspects. *Veterinary Microbiology*, v.172, p.353-358, 2014.
- BALAKRISHNAN, G.; ROY, P. Comparison of efficacy of two experimental bovine leptospira vaccines under laboratory and field. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.159, p.11-15, 2014.
- BLANCO, R. M.; SANTOS, L. F.; GALLOWAY, R.L.; ROMERO, E. C. Is the microagglutination test (MAT) good for predicting the infecting serogroup for leptospirosis in Brazil? *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v.44, p.34-36, 2016.
- DELLAGOSTIN, O. A.; GRASSMANN, A. A.; HARTWIG, D. D.; FELIX, S. R.; SILVA, E. F.; MCBRIDE, A. J. Recombinant vaccines against leptospirosis. *Hum Vaccin*, v.7, p.1215-1224, 2011.
- GAMBERINI, M.; GOMEZ, R. M.; ATZINGEN, M. V.; MARTINS, E. A. L.; VASCONCELLOS, S. A.; ROMERO, E. C.; LEITE, L. C. C.; HO, P. L.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. *FEMS Microbiology Letter*, v.244, p.305-313, 2005.
- MURRAY, G. L. The lipoprotein LipL32, an enigma of leptospiral biology. *Veterinary Microbiology*, v.162, p.305-314, 2013.
- NAIMAN, B. M.; ALT, D.; BOLIN, C. A.; ZUERNER, R.; BALDWIN, C. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and gT lymphocytes. *Infection and immunity*, v.69, n.12, p.7550-7558, 2001.
- PINNE, M.; HAAKE, D. A. A comprehensive approach to identification of surface-exposed, outer membrane-spanning proteins of *Leptospira interrogans*. *PLoS ONE*, v.4, 2009.
- RAMOS, C. R.; ABREU, P. A.; NASCIMENTO, A. L.; HO, P. L. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Braz J Med Biol Res*, v.37, p. 1103-1109, 2004.
- SILVA, E. F.; MEDEIROS, M. A.; MCBRIDE, A. J.; MATSUNAGA, J.; ESTEVES, G. S.; RAMOS, J. G. R.; SANTOS, C. S.; CRODA, J.; HOMMA, A.; DELLAGOSTIN, O. A.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamsters model of leptospirosis. *Vaccine*, v.25, p.6277-6286, 2007.
- ZENG, L.; ZHUANG, X.; HUANG, L.; ZHANG, Y.; CHEN, C.; DONG, K.; ZHANG, Y.; CUI, Z.; DING, X.; CHANG, Y.; GUO, X.; ZHU, Y. Comparative subproteome analysis of three representative *Leptospira interrogans* vaccine strains reveals cross-reactive antigens and novel virulent determinants. *Journal of Proteomics*, v.112, p.27-37, 2007.