

CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA VACINA DE DNA RECOMBINANTE CONTRA LEPTOSPIROSE

XIMENDES, Carolina[†]; GRASSMANN, André A.; MOREIRA, Gustavo M. S. G.; COLONETTI, Karina; DELLAGOSTIN, Odir A.

Unidade de Biotecnologia – Centro de Desenvolvimento Tecnológico – UFPel
[*carolinaximendes@hotmail.com](mailto:carolinaximendes@hotmail.com)

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose emergente de ocorrência global causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. Em humanos, 5 a 15% dos casos progridem para quadros graves, com letalidade acima de 50%. No Brasil, mais de três mil casos são registrados a cada ano e a taxa de letalidade é de aproximadamente 11%. As vacinas disponíveis para prevenção da leptospirose são bacterinas, que possuem várias limitações. A principal é imunidade restrita apenas aos sorovares que compõem a vacina. Diante disso, busca-se o desenvolvimento de uma vacina que gere imunidade de longa duração, contra diferentes sorovares patogênicos (Adler e de la Pena Moctezuma, 2010).

Os principais alvos para produção de vacinas recombinantes são proteínas de membrana externa, expostas na superfície da célula, e que interagem com o hospedeiro (Haake e Matsunaga, 2010). A lipoproteína leptospiral de 32 kDa, LipL32, representa 75% do proteoma de membrana externa (Cullen, Cordwell et al., 2002), sendo a proteína mais abundante de leptospiros (Malmstrom, Beck et al., 2009). Esta proteína tem afinidade a diversos componentes da matriz extracelular do hospedeiro (Hoke, Egan et al., 2008), é altamente conservada e não está presente em espécies saprófitas (Adler e de la Pena Moctezuma, 2010). LipL32 é expressa durante a infecção em todas as espécies patogênicas de *Leptospira* (Adler e de la Pena Moctezuma, 2010) e mais de 95% dos pacientes produzem anticorpos contra esta proteína (Guerreiro, Croda et al., 2001).

Entre as possíveis abordagens para o desenvolvimento de uma vacina contra leptospirose, a vacina de DNA apresenta algumas vantagens. É capaz de induzir resposta imune específica, predominantemente celular, sem o risco de causar a doença; sua obtenção é rápida e de custo relativamente baixo; além da fácil administração no modelo animal (Wang, Jin et al., 2007). As vacinas recombinantes, apesar de mais seguras do que as convencionais, são menos imunogênicas. Adjuvantes são componentes capazes de aperfeiçoar a eficiência destas vacinas. A subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB) é um potente adjuvante imunológico (da Hora, Conceicao et al., 2011). LTB estimula ampla e duradoura resposta imune humoral e celular contra antígenos co-administrados ou fusionados. O presente trabalho visou a obtenção e caracterização de uma vacina contra a leptospirose utilizando uma estratégia inovadora, que combina a fusão do antígeno LipL32 ao adjuvante LTB, apresentados ao sistema imune na forma de vacina de DNA.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A técnica de PCR foi utilizada para amplificação do gene *ltb::lipL32* a partir do vetor pAE-*ltb::lipL32*, previamente construído (Grassmann et al., 2008). O produto da reação foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose 1%. O gene

ltb::lipL32 purificado foi ligado ao vetor de expressão em eucariotos pTarget (Promega) conforme recomendações do fabricante. O vetor recombinante pTarget-*ltb::lipL32* foi utilizado para transformar por choque térmico *E. coli* TOP10F. Após a transformação, as células foram cultivadas em meio LB sólido com 100 mg/mL de ampicilina a 37 °C *overnight*. Algumas colônias foram selecionadas para triagem de clones recombinantes por extração rápida de DNA com fenol-clorofórmico. O DNA plasmideal foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% e os possíveis clones recombinantes foram selecionados e cultivados em LB líquido com ampicilina a 37 °C *overnight*. Estas culturas foram submetidas à extração do DNA plasmideal utilizando o kit comercial *Plasmid Prep Mini Spin* (GE Healthcare).

Os plasmídeos purificados foram caracterizados por PCR, digestão por enzimas de restrição e sequenciamento de DNA. A presença do inserto foi avaliada por PCR com os mesmos primers utilizados na amplificação inicial. A orientação do inserto no vetor foi analisada por reações de digestão com as enzimas *Bam*HI e *Kpn*I. As reações de PCR e digestão foram analisadas em eletroforese em gel de agarose 1%. O padrão de digestão observado no gel foi comparado ao esperado para plasmídeos com inserto em sentido horário ou anti-horário. Os vetores identificados na orientação correta (horário) foram submetidos ao sequenciamento de DNA para confirmação da sequência. O sequenciamento foi realizado pelo método automatizado de Sanger, no equipamento MegaBACE™ 500 (GE Healthcare).

A expressão de LTB::LipL32 foi avaliada em cultivo *in vitro* de células de origem mamífera. A linhagem celular CHO-K1 foi cultivada sobre lamínulas de microscópio inseridas em placas de cultivo de seis cavidades. Após atingir confluência de 50%, as células foram transfectadas com 2 µg de pTarget-*ltb::lipL32* complexado a Nanofect (Qiagen). Após 48 h de cultivo, a lamínula com a cultura foi submetida à imunofluorescência indireta para visualização da expressão de LTB::LipL32. Para isso, as células foram tratadas com metanol por 5 min e incubadas com anticorpos anti-LTB (1:100) ou anti-LipL32 (1:100), seguidos por reações com anticorpos secundários conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:200). O DNA das células foi corado com Hoechst 33258. A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência em aumento de 400 vezes. Células tratadas apenas com Nanofect foram utilizadas como controle negativo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a PCR e a eletroforese, foi observado no gel de agarose uma única banda de 1080 pb, correspondente ao esperado para o gene *ltb::lipL32* (dado não mostrado). Na PCR, após a etapa de amplificação, a enzima *Taq* DNA polimerase adiciona um nucleotídeo adenina (A) não pareado à extremidade de cada fragmento. O vetor pTarget é linear e possui em cada extremidade um nucleotídeo timina (T) livre que é pareado ao A do inserto, permitindo a ligação de ambos. O produto da ligação originou o vetor recombinante pTarget-*ltb::lipL32* (Figura 1A). Centenas de colônias de *E. coli* cresceram após transformação com este vetor e 41 foram aleatoriamente selecionadas para triagem de recombinantes. Sete clones que apresentaram migração de DNA plasmideal mais lenta na eletroforese foram selecionados (resultados não mostrados). Estes vetores foram sujeitos aos ensaios de caracterização.

Todos os sete vetores selecionados foram positivos no PCR (resultado não mostrado). Porém, após digestão, apenas dois (clones 8 e 30) apresentaram o

padrão de bandas de acordo com o esperado para os vetores recombinantes com inserto no sentido horário (6066 pb e 684 pb quando digeridos por *Bam*HI; 5970 pb e 780 pb quando digeridos por *Kpn*I). A figura 1B mostra o gel de agarose com os dois vetores recombinantes digeridos pelas enzimas de restrição. O sequenciamento de DNA destes vetores confirmou a identidade da sequência de *ltb::lipL32* presente nestes dois vetores.

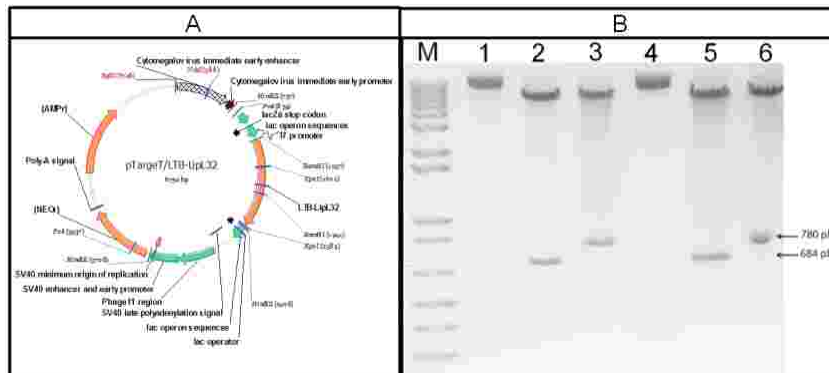


Figura 1. Obtenção do vetor recombinante pTarget-*ltb::lipL32* para utilização como vacina de DNA contra leptospirose. **A)** Esquema da estrutura da molécula pTarget-*ltb::lipL32*. **B)** Eletroforese em gel de agarose 1% dos vetores oriundos dos clones recombinantes 8 e 30, digeridos com enzimas de restrição. M, Marcador 1kb Plus (Invitrogen); 1, vetor 8 não digerido; 2, vetor 8 digerido por *Bam*HI; 3, vetor 8 digerido por *Kpn*I; 4, vetor 30 não digerido; 5, vetor 30 digerido por *Bam*HI; 6, vetor 30 digerido por *Kpn*I.

Os procedimentos para a transfecção da linhagem celular CHO-K1 com pTarget-*ltb::lipL32* oriundo dos clones 8 e 30 foram realizados com sucesso. O vetor pTarget possui um promotor de citomegalovírus que permite a expressão de proteínas heterólogas em células de eucariotos. O resultado da imunofluorescência indireta realizada com as células transfectadas com estes vetores (Figura 2) sugere que a construção é funcional e a expressão de LTB::LipL32 *in vivo* ocorreu conforme previsto. Além disso, a reação com os anticorpos específicos para cada subunidade da proteína (anti-LTB e anti-LipL32) sugere que, tanto o antígeno LipL32, quanto o adjuvante LTB mantiveram epitopos antigênicos. Este resultado é importante, pois assegura que o gene fusionado é expresso em células eucarióticas, e que o plasmídeo construído pode ser testado como vacina de DNA. Espera-se que uma resposta imune gerada contra LTB::LipL32 seja capaz de proteger indivíduos contra infecção por leptospirosas patogênicas.

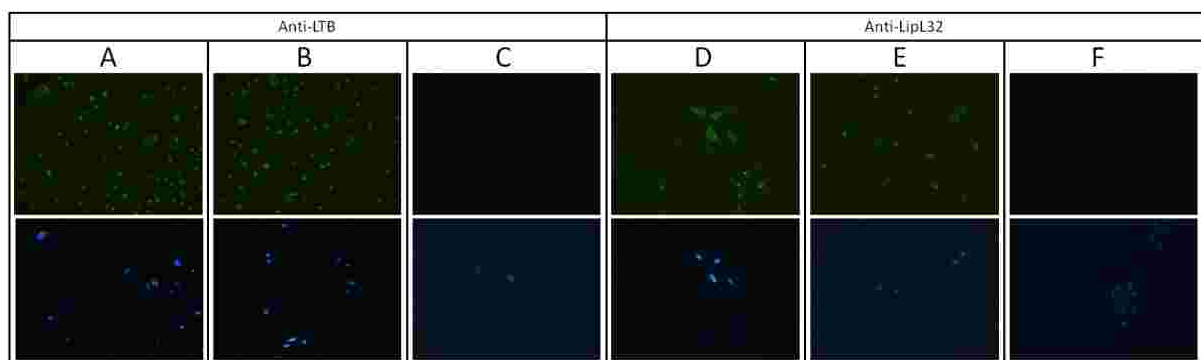


Figura 2. Imunofluorescência indireta em células CHO-K1 transfectadas com pTarget-*ltb::lipL32* clones 8 e 30, realizada com anticorpos anti-LTB (A, B e C) e anti-LipL32 (D, E e F). As imagens superiores representam a fluorescência de FITC, correspondente à reação com as proteínas expressas, enquanto as imagens inferiores representam a fluorescência do Hoechst 33258, correspondente à marcação do DNA. **A e D:** clone 8; **B e E:** clone 30; **C e F:** apenas Nanofect.

4 CONCLUSÃO

O vetor pTarget-*ltb::lipL32* é funcional e capaz de gerar as proteínas LipL32 e LTB em conformação reconhecida por anticorpos específicos contra estas subunidades. Estudos subsequentes serão executados com o objetivo de avaliar o potencial imunoprotetor desta molécula como vacina de DNA contra leptospirose, através do teste de desafio em modelo animal suscetível.

5 REFERÊNCIAS

- Adler, B.; Moctezuma, A. de la Peña. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, 140(3-4): 287-296, 2010.
- Grassmann, A. A.; Félix, S. R.; Seixas, F. K.; Silva, E. F.; Hartman, D. M.; Fagundes, M. Q.; Conceição, F. R.; Dellagostin, O. A. Antigenicidade de uma quimera recombinante composta pelo adjuvante LTB e o antígeno LipL32 de *Leptospira interrogans*. In: **XVII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPEL**, Pelotas/RS, 2008. Anais do XVII Congresso de Iniciação Científica da UFPEL.
- Guerreiro, H.; Croda, J. et al. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. **Infection and Immunity**, 69(8): 4958-4968, 2001.
- Haake, D. A.; Matsunaga, J. *Leptospira*: a spirochaete with a hybrid outer membrane. **Molecular Microbiology**, 2010.
- Hoke, D. E.; Egan, S. et al. LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata*. **Infection and Immunity**, 76(5): 2063-2069, 2008.
- Malmstrom, J.; Beck, M. et al. Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. **Nature**, 460(7256): 762-765, 2009.
- Wang, Z., L. Jin, et al. Leptospirosis vaccines. **Microbial Cell Factories**, 6: 39, 2007.