

CARACTERIZAÇÃO DO ANTÍGENO RECOMBINANTE LipL32 DE *Leptospira interrogans* FUSIONADO À LTB, POR GM1-ELISA

XIMENDES, Carolina^{1*}; GRASSMANN, André Alex¹; DINIZ, Juliana Alcoforado¹; SILVA, Everton Fagonde^{1,2}; DELLAGOSTIN, Odir Antônio^{1,2}

¹Laboratório de Biologia Molecular – Centro de Biotecnologia – Cenbiot – UFPel

²Faculdade de Veterinária – UFPel

Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900.

*carolinaximendes@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de ampla distribuição mundial causada por mais de 260 sorovares patogênicos pertencentes ao gênero *Leptospira*. A infecção é contraída por contato direto ou indireto com urina de animais portadores (principalmente roedores) e, em 5 a 15% dos casos, pode evoluir para quadros graves, caracterizados por falência renal, icterícia e hemorragia pulmonar (Gouveia et al., 2008). As perdas econômicas causadas pela doença e os prejuízos em termos de saúde pública justificam o uso de vacinas em humanos e animais. Deste modo, o desenvolvimento de novas estratégias para a prevenção da leptospirose se faz necessário. As vacinas disponíveis atualmente, constituídas de células inteiras inativadas (bacterinas), não proporcionam proteção cruzada contra os diferentes sorovares que podem causar a leptospirose. Diante disso, o desenvolvimento de uma vacina multisorovar, que gere proteção cruzada contra os diferentes sorovares de *Leptospira*, ainda representa um grande desafio (Adler & Moctezuma, 2009; Levett, 2001; McBride et al., 2005).

Proteínas de membrana externa são apontadas como vacinógenos potenciais, devido a sua localização na superfície da célula e a sua participação na interação com o hospedeiro (Sonrier et al., 2000). LipL32 é a proteína mais abundante na membrana externa de leptospiros e encontrada exclusivamente em cepas patogênicas, apresentando potencial como antígeno vacinal (Cullen et al., 2005). Essa proteína altamente antigênica (Haake et al., 2000) é expressa durante a infecção, induz resposta humoral (Flannery, 2001), liga-se à matriz extracelular de mamíferos (Hauk, 2008; Hoke, 2008) e mais de 95% dos pacientes com leptospirose produzem anticorpos contra LipL32 durante a infecção (Guerreiro, 2001).

As vacinas recombinantes, apesar de serem mais seguras do que as convencionais são menos imunogênicas. Adjuvantes são componentes essenciais capazes de aperfeiçoar a eficiência destas vacinas (Dzierzbicka & Kołodziejczyk, 2006). A subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB) demonstrou em diversos estudos ter atividade imuno-adjuvante, com produção de resposta imune humoral e celular, tanto co-administrada quanto fusionada ao antígeno (Millar, 2001; Lebens, 2003; da Silva Ramos Rocha, 2008; Chen, 2009). A função adjuvante da LTB está diretamente relacionada com a capacidade dela se ligar no gangliosídeo GM1, presente na superfície de células eucarióticas (De Haan et al., 1998).

O objetivo deste estudo foi produzir rLTBLipL32, rLipL32 e rLTB e caracterizar estas proteínas recombinantes através de GM1-ELISA.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Expressão e purificação das proteínas recombinantes: Os vetores recombinantes pAE//*ltb*, pAE//*lipL32* e pAE//*ltb-LipL32* (Grassmann et al., 2008) foram inseridos por eletroporação na cepa de expressão *E. coli* BL21 (DE3) Star. As bactérias foram crescidas em meio LB, para produção em larga escala. As culturas foram monitoradas até atingir uma densidade óptica (DO₆₀₀) de 0,6 a 0,8, quando foi induzida a expressão das proteínas recombinantes através da adição de 1 mM de IPTG. As culturas foram centrifugadas para produzir o precipitado de massa bacteriana, o sobrenadante foi descartado e os *pellets* tratados com tampão para purificação de proteínas no caso de rLipL32, ou o mesmo tampão acrescido de 0,2% do agente desnaturante *N-Lauroylsarcosine*, para rLTB ou rLTB-LipL32. A purificação das proteínas recombinantes foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose (HisTrap™), carregada com níquel. A identidade das proteínas foi checada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e por Western blot (WB) com soro anti-LTB e anti-LipL32.

GM1-ELISA: Placas de poliestireno foram sensibilizadas com 100 ng por cavidade de gangliosídeo GM1 bovino (Sigma Aldrich Co.) diluído em tampão carbonato-bicarbonato (0,05 M; pH 9,6) (100 µL/cavidade) e incubadas *overnight* a 4 °C. A placa foi lavada três vezes com 200 µL de PBS-T por cavidade e bloqueada com 1% de leite em pó diluído em PBS-T. Em seguida foram adicionados 100 ng por cavidade de rLTB, rLTBLipL32, rLipL32 ou toxina colérica (CT) (Sigma Aldrich Co.) em triplicata e a placa foi incubada por 1 h a 37 °C. Após três novas lavagens com PBS-T foi adicionado anticorpo de coelho anti-CT na diluição 1:6000 ou Mab anti-LipL32 1:6000 e incubado 1 h a 37 °C. Após três lavagens com PBS-T a reação foi incubada 1 h a 37 °C com 100 uL de anticorpo anti-imunoglobulinas de coelho conjugado com peroxidase 1:6000 ou anticorpo anti-imunoglobulinas de camundongo conjugado com peroxidase 1:6000. Após a última lavagem, a reação foi revelada utilizando 100 uL por cavidade de solução contendo ortofenilenodiamina (OPD) diluído em tampão citrato-fosfato pH 4,0 (0,2 M com 0,01% de H₂O₂) e incubada ao abrigo da luz por 15 min, quando a reação foi parada com adição de 25 uL de H₂SO₄ 4 N. A leitura foi realizada em espectrofotômetro para microplacas com filtro de 492 nm. Como controle da ligação entre as proteínas e o gangliosídeo utilizou-se poços sem GM1 e poços com GM1 sem proteínas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As proteínas rLTB, rLipL32 e rLTBLipL32 foram produzidas e purificadas com sucesso. A caracterização por SDS-PAGE e Western blot demonstrou a identidade e antigenicidade das proteínas recombinantes.

rLTB e rLTBLipL32 foram avaliadas *in vitro* quanto à habilidade de ligação ao gangliosídeo GM1 em ensaio de ELISA. A rLTB e a quimera rLTBLipL32 produzidas

demonstraram capacidade de ligação ao GM1 (Figura 1). Quando utilizado anticorpo anti-CT, tanto a rLTB como a rLTBLipL32 apresentaram capacidade de ligação ao GM1 semelhante à toxina colérica comercial e significativamente maior do que a observada pelo controle rLipL32 ($p < 0,01$). Na reação utilizando anticorpo anti-LipL32 apenas a quimera rLTBLipL32 apresentou resposta positiva ($p < 0,01$), já que o anticorpo não reconhece CT e rLTB e a rLipL32 não possui afinidade pelo GM1. Não houve reação nos controles negativos sem GM1 ou apenas GM1.

Estes resultados sugerem que a rLTB produzida manteve conformação estrutural semelhante à molécula nativa. Da mesma forma, a fusão de LTB à LipL32 aparentemente não comprometeu sua estrutura. Estudos anteriores demonstraram que a atividade biológica de LTB é dependente da ligação desta subunidade ao gangliosídeo GM1 (Haake, 1998). Neste trabalho, demonstramos que tanto a rLTB como a fusão rLTBLipL32 produzidas detêm capacidade de ligação ao gangliosídeo GM1, fornecendo indícios da manutenção da atividade adjuvante esperada de LTB.

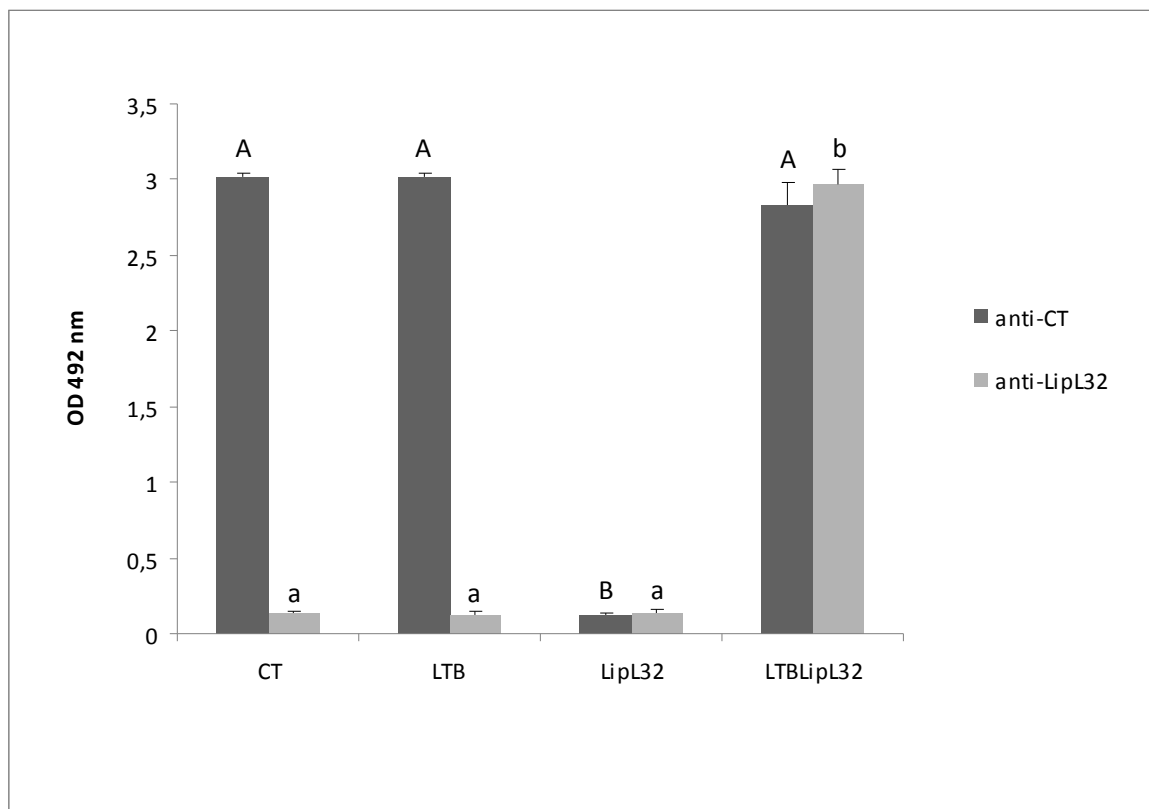


Figura 1. Ligação das proteínas produzidas ao gangliosídeo GM1 determinado por GM1-ELISA. Os dados foram obtidos através da média das absorvâncias em triplicatas e desvio padrão, utilizando o Teste T de Student. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

4. CONCLUSÃO

As proteínas rLTBLipL32 e rLTB produzidas aparentemente mantiveram a conformação e atividade biológica da molécula LTB nativa. Estudos subsequentes

serão realizados com a intenção de determinar a atividade adjuvante de LTB em vacinação contra a leptospirose utilizando LipL32 como antígeno vacinal.

5. REFERÊNCIAS

- ADLER, B.; MOCTEZUMA A. P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary and Microbiology**, 2009.
- CULLEN, P. A.; XU, X.; MATSUNAGA, J.; SANCHEZ, Y.; KO, A. I.; HAAKE, D.; ADLER, B. Surfaceome of *Leptospira* spp. **Infection and Immunity**, 2005, v. 73, p. 4853-4863.
- FAINE, S. B.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira* and Leptospirosis. **MediSci: Melbourne**, 1999, 272p.
- GRASSMANN, A. A.; FELIX, S. R.; SEIXAS, F. K.; SILVA, E. F.; HARTMANN, 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, UFPel, Pelotas, 2008.
- HAAKE, D.A.; CHAO, G.; ZUERNER, R.L.; BARNETT, J.K.; BARNETT, D.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; LEVETT, P.N.; BOLIN, C.A. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infection and Immunity**, 2000, v. 68, p. 2276-2285.
- McBRIDE, A.J.A.; ATHANAZIO, D.A.; REIS, M.G.; KO, A.I. Leptospirosis. **Current opinion in infectious diseases**, 2005, v.18, p. 376-386.
- NALLY, J.E.; WHITELEGGE, J.P.; BASSILIAN, S.; BLANCO, D.R.; LOVETT, M.A. Characterization of the outer membrane proteome of *Leptospira interrogans* expressed during acute lethal infection. **Infection and Immunity**, 2007 v. 75, n.2, p.766-773.
- SEIXAS, F. K.; FERNANDES, C. H.; HARTWIG, D. D.; CONCEIÇÃO, F. R.; ALEIXO, J. A. G.; DELLAGOSTIN, O. A. Evaluation of different ways of presenting LipL32 to the immune system with the aim of developing a recombinant vaccine against leptospirosis. **Canadian Journal of Microbiology**, 2007, 53: 472-479.
- VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P.; SHRIRAM, A. N. Leptospirosis: an emerging global public health problem. **Journal of Biosciences**, 2008, 33(4): 557-569.