

Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan
Programa de Pós-graduação *Lato Sensu*
Especialização em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos

Bruno Botega Foltran

**Avaliação da imunogenicidade de uma porção conservada da proteína LigA de
Leptospira interrogans em camundongo**

São Paulo

2023

Bruno Botega Foltran

**Avaliação da imunogenicidade de uma porção conservada da proteína LigA de
Leptospira interrogans em camundongo**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos do Programa de Pós-graduação *Lato Sensu* da Escola Superior do Instituto Butantan como requisito básico para a obtenção do título de Especialista em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos.

Orientadora: Ana Lucia Tabet Oller do Nascimento

Co-orientador (a): Luis Guilherme V. Fernandes

São Paulo

2023

**Catálogo na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)**

Foltran, Bruno Botega

Avaliação da imunogenicidade de uma porção conservada da proteína LigA de *Leptospira interrogans* em camundongo / Bruno Botega Foltran ; orientador(a) Ana Lucia Tabet Oller do Nascimento - São Paulo, 2023.

41 p. : il.

Monografia (Especialização) - Escola Superior do Instituto Butantan, Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos.

1. Leptospirose 2. *Leptospira*. 3. Patogênica I. do Nascimento, Ana Lucia Tabet Oller. II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos. IV. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela equipe da Biblioteca do Instituto Butantan

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Bruno Botega Foltran, aluno do Curso de Especialização em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
() 06 meses
() 12 meses
() Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 11 de Janeiro de 2023

Bruno Foltran
aluno(a)

De acordo: Ana Naxament
Orientador(a): Ana Lucia Tabet Oller do Nascimento

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, irmão e namorada que me incentivaram nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto me dedicava à realização deste trabalho.

Aos amigos, que sempre estiveram ao meu lado, pela amizade incondicional e pelo apoio demonstrado ao longo de todo o período. Deixo um agradecimento especial à minha orientadora Ana Lucia Tabet Oller do Nascimento pelo incentivo e pela dedicação do seu escasso tempo ao meu projeto de pesquisa, a ESIB e o Instituto Butantan por abrirem essa oportunidade incrível e essencial no meu processo de formação profissional, pela dedicação, e por tudo o que aprendi ao longo deste ano do curso.

“O insucesso é apenas uma oportunidade para recomeçar com mais”.

Henry Ford

RESUMO

FOLTRAN, Bruno Botega. **Avaliação da imunogenicidade de uma porção conservada da proteína LigA de *Leptospira interrogans* em camundongo.**

2022. 41 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2022.

Espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* são o agente causador da leptospirose, uma doença zoonótica amplamente disseminada que afeta humanos e animais. Leptospiras patogênicas colonizam os túbulos renais de uma ampla variedade de animais selvagens e domésticos, os quais excretam as bactérias vivas, via urina, no ambiente. O homem é o hospedeiro acidental e terminal da doença, e após a infecção pode apresentar um quadro variado de manifestações clínicas. Atualmente, estima-se que anualmente cerca de 1 milhão de pessoas são acometidas pela leptospirose em todo o mundo, o que resulta em aproximadamente 60 mil mortes. O entendimento da interação patógeno-hospedeiro, bem como da resposta imune contra proteínas de *Leptospira* spp., é um passo fundamental para o desenvolvimento de vacinas contra a leptospirose. As proteínas presentes na membrana externa das leptospiras são alvos interessantes de estudo, pois devido a sua localização podem interagir diretamente com o hospedeiro. Resultados prévios indicam que as proteínas Leptospiral Immunoglobulin-like A e B (LigA e LigB) são candidatos vacinais interessantes; ambas proteínas apresentam uma região N-terminal bastante conservada, o que pode ser aproveitada para a geração de anticorpos que possam reconhecer concomitantemente LigA e LigB. Assim, o presente estudo tem como objetivo clonar, expressar e purificar uma sequência que corresponde a porção conservada das proteínas LigA/LigB de *L. interrogans* sorovar Copenhageni e avaliar suas propriedades imunogênicas. A porção conservada do gene *LIC10465 (ligA)* foi amplificada por PCR, clonada no vetor pAE e a proteína recombinante expressa em diferentes linhagens de *E. coli*. A purificação da proteína recombinante foi realizada por cromatografia de afinidade ao níquel. A proteína recombinante produzida foi detectada por *Western Blotting* e ELISA a partir de incubação com anticorpos monoclonais anti-his, soro hiperimune produzido em animais BALB/c e soros positivos

para a leptospirose. A obtenção e validação imunológica dessa proteína, na sua forma recombinante contribuirá significativamente para o avanço dos estudos relacionados à patogenicidade das leptospirosas.

Palavras-chave: Leptospira. Leptospirose. Patogenicidade. Imunogenicidade. Bacteria.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	Geral	14
2.2	Específicos.....	14
3	METODOLOGIA.....	15
3.1	Análises de bioinformática e clonagem do fragmento de interesse.....	15
3.2	Clonagem da região conservada do gene LigA e LigB.....	15
3.3	Expressão da proteína recombinante.....	17
3.4	Purificação da proteína recombinante.....	19
3.5	Avaliação da reatividade das proteínas recombinantes com soros de pacientes positivos para leptospirose por ELISA.....	19
3.6	Avaliação da reatividade das proteínas recombinantes com soros positivos para leptospirose por <i>Western blotting</i>	20
3.7	Obtenção de anticorpo policlonal em camundongo e testes de imunogenicidade.....	21
3.8	Avaliação da reatividade das proteínas com anticorpo policlonal mono específico.....	21
4	RESULTADOS.....	22
4.1	Análise <i>in silico</i> do gene selecionado:	22
4.2	Clonagem do fragmento de interesse.....	24
4.3	Expressão do fragmento de interesse.....	28
4.4	Purificação da proteína recombinante.....	31
4.5	Avaliação da reatividade das proteínas recombinantes com soros positivos para leptospirose por ELISA e por <i>Western Blotting</i>	33

4.6	Obtenção de anticorpo policlonal em camundongo, testes de imunogenicidade e detecção da proteína recombinante por <i>Western Blotting</i> e <i>ELISA</i>	35
5	DISCUSSÃO.....	39
6	CONCLUSÕES.....	41
	REFERÊNCIAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose causada por uma bactéria do gênero *Leptospira*, que pertence à família Leptospiraceae, na forma de espiroquetas, finas e bastante móveis se destacando por sua característica única em forma de gancho (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001). Essa zoonose que acomete diversos animais, tanto domésticos como silvestres, tem impacto na pecuária, acarretando em redução drástica na produção de leite, alta incidência de abortos e morte precoce, e com isso levando a perdas econômicas consideráveis. As leptospirosas também infectam humanos, sendo estes seus hospedeiros acidentais e terminais.

A leptospirose possui uma distribuição global, sendo relatados inúmeros casos todos os anos, principalmente em regiões rurais e periféricas, onde a qualidade de saneamento básico é reduzida ou inexistente.

Foram identificadas 64 espécies de leptospirosas, sendo classificadas em espécies patogênicas, intermediárias e saprófitas (VINCENT et al., 2019). As leptospirosas patogênicas são os agentes etiológicos da leptospirose, tendo como a principal espécie patogênica que acomete os humanos a *L. interrogans* sorovar Copenhageni, que é transmitida principalmente pelo contato direto com urina de animais contaminados ou indiretamente através do contato de água ou solos contaminados (BHARTI et al., 2003).

As bactérias conseguem penetrar no hospedeiro através de ferimentos na pele ou mucosa e após a entrada se espalham pela corrente sanguínea até atingir os órgãos alvos, principalmente o fígado e o rim, tendo incubação média entre de 5 a 14 dias, podendo variar de 2 a 30 dias.

Os sintomas da doença normalmente são dos mais variados, desde assintomáticos até quadros mais graves denominados de síndrome de Weil (VINETZ et al., 1996) e a síndrome hemorrágica pulmonar (SPHS) (MCBRIDE et al., 2005). Dados fornecidos por especialistas da OMS (Organização Mundial da Saúde) estimam que anualmente ocorrem cerca de 873.000 casos graves e 49.000 mortes de pessoas por leptospirose, em todo o mundo (PICARDEAU et al., 2014)

Por se tratar de uma doença que possui sintomas tão variados e de grande incidência em regiões mais precárias, ela é facilmente confundida com outras doenças, levando a um diagnóstico errôneo e conseqüentemente uma subnotificação

de casos. Além disso, o diagnóstico tardio gera também a falta de tratamento adequado no início da infecção, reduzindo a eficiência do tratamento e diminuindo a probabilidade de sobrevivência

O teste recomendado pela OMS para diagnóstico da leptospirose é o Teste de Microaglutinação (MAT, *microscopic agglutination test*), que detecta anticorpos aglutinantes contra epítomos dependentes do sorovar das espécies de *Leptospira* (GORIS; HARTSKEERL, 2014). Esse teste, apesar de ser considerado padrão, apresenta algumas limitações, pois depende da disponibilidade de um número grande de estirpes representativas de leptospiros e exige laboratórios amplamente equipados, além de mão de obra qualificada (BHARTI et al., 2003). Além disso, o tempo de coleta da amostra para realização do exame é fundamental para evitar resultados falsos-negativos.

Atualmente existem vacinas licenciadas para o uso veterinário. Essas vacinas são constituídas basicamente de bactérias inativadas ou preparações de membrana de leptospiros patogênicos e parecem induzir resposta protetora a partir da produção de anticorpos contra lipopolissacarídeos de leptospiros (FAINE et al., 1999; LEVETT., 2001). Contudo, estas vacinas falham em induzir proteção em longo prazo contra infecção, o que requer administração anual ou semestral (BOLIN et al., 1989); além disso, não promovem proteção cruzada contra sorovares de leptospiros não inclusas na preparação da vacina. Em países como China, Rússia, Japão e Cuba existem vacinas aprovadas para uso em humanos (MARTÍNEZ et al., 2004; YAN et al., 2003).

A partir do desenvolvimento de novas tecnologias, como o sequenciamento de genomas e ferramentas de bioinformática, a busca por novos alvos vacinais utilizando a vacinologia reversa (VR) cresceu significativamente. Desde 2004, com o sequenciamento do genoma da *L. interrogans* sorovar Copenhageni (NASCIMENTO et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2004) já foram identificadas e testadas quantidade robusta de proteínas em modelo animal (DELLAGOSTIN et al., 2011; GRASSMANN; KREMER et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2019).

O uso dessas novas tecnologias também tem contribuído para o entendimento dos mecanismos de patogênese das leptospiros. Dados interessantes têm sido revelados com a caracterização de novos genes de *Leptospira*, proteínas preditas com função desconhecida tem sido agora identificadas como adesinas, invasinas e evasinas, possivelmente contribuindo com os eventos de adesão, invasão e evasão imune do hospedeiro (ATZINGEN et al., 2008; CAVENAGUE et al., 2019;

DOMINGOS et al., 2015; DOMINGOS et al., 2012; FERNANDES et al., 2012; KOCHI et al., 2019; PEREIRA et al., 2017; TAKAHASHI; TEIXEIRA; NASCIMENTO, 2021; TEIXEIRA et al., 2015; VIEIRA et al., 2014).

Com base nos resultados disponíveis na literatura, as proteínas LigA e LigB têm se mostrado antígenos interessantes para composição de um kit/diagnóstico e/ou vacina (HAAKE; MATSUNAGA, 2021). Ademais, devido a seu espectro de interação com componentes do hospedeiro, sugere-se que sejam participativas no processo infeccioso. Mutagênese simultânea das proteínas Lig acarreta em atenuação de virulência em modelo animal (FERNANDES et al., 2022).

Seguindo a estratégia de vacinologia reversa, o presente projeto propõe a clonagem e expressão de uma porção conservada entre os genes ligA e ligB de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (NASCIMENTO et al., 2004A; NASCIMENTO et al., 2004b). Além disso, objetivou-se analisar a imunogenicidade desta proteína recombinante após imunização experimental em camundongos, e por fim, a sua reatividade com anticorpos presentes em soros positivos para leptospirose. O entendimento da resposta imune desencadeada pela porção conservada das proteínas LigA e LigB será importante para o aprimoramento dos antígenos para composição de uma vacina contra a leptospirose.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Clonagem, expressão e purificação de uma porção conservada das proteínas LigA e LigB de *L. interrogans* a fim de caracterizar suas propriedades imunogênicas.

2.2 Específicos

- a) Análise por bioinformática da sequência *LIC10465* (LigA) e *LIC10464* (LigB), a fim de se definir a região conservada;
- b) Clonagem do fragmento de interesse no vetor de expressão em *E. coli* pAE e sequenciamento dos clones obtidos;
- c) Indução da expressão da proteína recombinante utilizando diferentes cepas de *E. coli* e análise da solubilidade;
- d) Purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade a metal;
- e) Avaliar a reatividade da proteína recombinante com soro de pacientes diagnosticados com leptospirose
- f) Produção de soro hiperimune em camundongos;
- g) Avaliação da imunogenicidade por ELISA e *Western blotting*;

3 METODOLOGIA

3.1 Análises de bioinformática e clonagem do fragmento de interesse

A partir do banco de dados de sequências genéticas GenBank mantido pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI), foi obtido a sequência das proteínas LigA (*LIC10465*) e LigB (*LIC10464*), as quais foram submetidas a uma análise *in silico* para predições dos domínios conservados e analisar as sequências conservadas entre os genes. O programa PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) e SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) foram usados para obtenção dos domínios das proteínas.

Foi realizado um alinhamento entre os genes de interesse pela própria plataforma do NCBI utilizando-se a ferramenta BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e após a identificação da região conservada foram selecionados cerca de 1000 bp correspondente a 328 aminoácidos para constituírem o fragmento de interesse para clonagem. Foi desenhado um par de oligonucleotídeos para a amplificação por PCR com auxílio do *software* SnapGene.

3.2 Clonagem da região conservada do gene LigA e LigB

Para obtenção de produtos de PCR, foi usado como base o genoma da *L. interrogans* sorovar Copenhageni e o par de oligonucleotídeos desenhados para amplificar a região conservada do gene. Para tal, a sequência do peptídeo sinal da proteína foi desconsiderada e sítios de restrição (*XhoI* e *HindIII*) foram adicionados às extremidades 5' dos oligonucleotídeos para a clonagem no vetor pAE (Ramos et al., 2004); ao oligonucleotídeo reverso, também foi incluída a sequência referente ao códon de parada TAA anteriormente ao sítio de restrição. O vetor pAE permite a expressão de proteínas recombinantes contendo um epítipo de 6 resíduos de histidina na região N-terminal, importante para posterior purificação e detecção da proteína recombinante por anticorpos monoclonais anti-poli-histidina.

O PCR foi realizado no equipamento da Applied Biosystems™ Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems, EUA). O processo foi realizado utilizando-se a Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, EUA), uma polimerase com alta eficiência em correção de erros na amplificação e as condições

do PCR seguiram as recomendações do fabricante. O resultado foi confirmado por eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando o tampão TAE (EDTA 1 mM e Tris-Acetato 40 mM) e corado com GelRed (Biotium, EUA). Subsequentemente, após confirmação do resultado esperado, purificou-se a amostra de DNA segundo as descrições do kit Illustra™ GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Reino Unido) e foram obtidas as concentrações da amostra através do Eppendorf BioSpectrometer® basic (Eppendorf, Alemanha) em comprimento de onda de 260 nm.

Para a etapa posterior, foi realizada a digestão do fragmento obtido no PCR (inserto) e do vetor pAE para gerar regiões coesivas, utilizando as enzimas de restrições *Xho*I e *Hind*III, junto ao tampão correspondente a essas enzimas (Buffer R - Thermo Fisher). Foram usados 2 µg das amostras para ambas as digestões e subsequente purificação.

No que diz respeito à reação de ligação do plasmídeo pAE com o inserto, foram realizadas duas reações. Uma na proporção 1:3 e a outra na proporção 1:10 do vetor para o inserto, respectivamente. Foi utilizada a enzima T4 DNA Ligase (1 U/µL) (Invitrogen, EUA) a fim de promover a ligação do inserto ao vetor. Foi realizado o protocolo de ligação rápida, o qual consiste em incubar o inserto e o vetor em água free-nuclease por 10 minutos à 65°C para desfazer possíveis ligações inespecíficas e fracas, em seguida foi realizado um rápido spin para precipitação de qualquer condensado na tampa do tubo e aclimatação. Por fim, foram adicionados a enzima T4 Ligase e seu respectivo tampão e incubado em temperatura ambiente (22°C) por 2 horas.

A estirpe de *E. coli* DH5α foi utilizada para a transformação por choque térmico dos produtos da ligação. Foram retiradas 2 alíquotas do biofreezer (-80°C), uma para cada concentração realizada, as alíquotas possuem um volume de 50 µL de *E. coli* competentes que foram descongeladas no gelo por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 5 µL do produto da reação de ligação em cada tubo correspondente. A mistura foi mantida por 30 minutos no gelo e em seguida incubada por 2 minutos à 42°C. Para finalizar, as estirpes retornaram para o gelo por mais 5 minutos. Após esse período, foi adicionado 350 µL de meio LB Broth, Miller (Luria-Bertani) (LB) (Thermo Fisher Scientific, EUA) em cada tudo e o conjunto foi incubado à 37°C por 1 hora. Então, 100 µL de cada cultura de *E. coli* foram semeadas em 2 placas de Petri

contendo 20 mL de meio LB, 2% de Agar (BD BACTO™ Agar - Thermo Fisher Scientific, EUA) e 50 µg/mL de ampicilina em cada.

A fim de averiguarmos complementarmente o sucesso da transformação, foi feito PCR de colônia, no qual com o auxílio da ponteira, uma alíquota referente a 6 colônias isoladas de cada placa foi transferida da placa de Petri para um microtubo de 0,2 mL contendo 1 µL de água free-nuclease. Em seguida, foi adicionado a Platinum PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen) e os primers T7 (TATGCTAGTTATTGCTCAG e TAATACGACTCACTATAGGG) que flanqueiam a inserção do gene. Ao término do PCR, as reações foram avaliadas por um gel de agarose a 1% para verificar se as colônias continham o plasmídeo recombinante de interesse.

A partir da validação das colônias, foi feito um novo cultivo utilizando duas colônias positivas em diferentes tubos contendo 3 mL de meio LB e 50 µg/mL de ampicilina para fazer extração dos plasmídeos. Foi centrifugado 1,5 mL do cultivo e o *pellet* obtido foi usado para a extração de acordo com as recomendações do kit Cytiva Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit (Cytiva, EUA). Posteriormente, as amostras resultantes foram quantificadas com auxílio do Eppendorf BioSpectrometer basic em comprimento de onda de 260 nm. Em seguida, aproximadamente 100 ng de cada plasmídeo foram digeridos pelas enzimas de restrição XhoI e HindIII (New England Biolabs), novamente no tampão Buffer R. As amostras digeridas foram comparadas com os plasmídeos não digeridos através de eletroforese em gel 1% agarose, a fim de documentar o sucesso da inserção do gene no vetor pAE.

3.3 Expressão da proteína recombinante.

Três estirpes de *E. coli* foram empregadas para ensaios de expressão: *E. coli* BL21(DE3), BL21 Star (DE3) pLysS (Invitrogen) e C43(DE3) (Avidis), que possuem o gene da T7 RNA polimerase controlado pelo promotor *lac UV5*, o qual é induzido por isopropil-B-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). A estirpe BL21 Star (DE3) pLysS possui também o plasmídeo pLysS, responsável por codificar uma lisozima que cliva T7 RNA polimerase, evitando escape de expressão dos genes de interesse na ausência de seu indutor.

As bactérias foram transformadas com os plasmídeos recombinantes por choque térmico e incubadas a 37°C, sob agitação, como descrito anteriormente. Primeiramente as induções ocorreram após os cultivos saturados atingirem densidade

óptica de 0,6 em leitura a 600 nm e foram induzidas com diferentes concentrações de IPTG (0,01, 0,1 e 1 mM) por 3 horas à 37°C, para determinar qual concentração de IPTG a proteína algo teve maior produtividade. Em seguida foi realizada outra indução, mas agora apenas na estirpe BL21 Star (DE3) pLysS com 2 condições de cultivo utilizando 0,01 mM de IPTG: a) Indução por 3 horas à 37°C e b) Indução por 16 horas à 18°C, ambas sempre sob agitação. Para tais experimentos, foram cultivadas em 30 mL de meio LB com os respectivos antibióticos: a estirpe BL21 Star (DE3) pLysS, devido à presença do plasmídeo pLysS, foi cultivada com meio contendo ampicilina (50 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL), ao passo que nas demais estirpes foi utilizada apenas ampicilina, na mesma concentração descrita anteriormente.

Cada estirpe e cada condição de indução após o tempo de cultivo foram coletadas e centrifugadas a 5.000xg por 15 minutos em tubos do tipo falcon. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 2 mL de tampão de lise (Tris pH 8,0 20mM, NaCl 150 mM, Lisozima 200 µg/mL, Fluoreto de Fenilmetilsulfonil (PMSF) 2mM e Triton X-100 1%) e submetido ao sonicador com amplitude de 60% por 2 minutos com intervalos de 20 segundos cada pulso. Em seguida foi centrifugado novamente a 10.000xg por 15 minutos, o sobrenadante foi separado e o pellet foi ressuspenso em 2 mL de tampão de desnaturação (Tris pH 8,0 10 mM, NaCl 150 mM e Ureia 8M) para solubilizar as proteínas insolúveis que precipitaram.

As amostras já em seus respectivos tampões foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida e *Western blotting* para poder determinar se a proteína foi expressa em fração solúvel ou insolúvel e qual estirpe teve melhor eficiência. A estirpe que apresentou banda com a massa molecular esperada e maior intensidade foi selecionada para cultivo e expressão da proteína recombinante em volume maior de meio de cultura para verificação da solubilidade novamente e purificação.

Foram separados 50 µL de cada amostra em novos tubos e então adicionados 12,5 µL de tampão de corrida contendo dodecil-sulfato de sódio (SDS) e β-mercaptoetanol, sendo as amostras aquecidas a 96°C por 10 minutos. As proteínas presentes nas amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. Os géis foram feitos em duplicatas, sendo as réplicas utilizadas para a observação de proteínas totais pelo corante Comassie Blue e detecção específica da proteína recombinante por *Western blotting*. A proteína recombinante foi transferida para uma membrana de nitrocelulose “Hybond-ECL” (GE Healthcare) em sistema

semi-úmido (GE) por 10 minutos 1,3 A/cm² em tampão de transferência Tris-Glicina acrescido de 1,85% de SDS. Em seguida, a membrana foi incubada com uma solução de bloqueio PBS-Tween 0,05%, Leite desnatado 10% (PBS-T-Leite) e mantido sob agitação por 1 hora a temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos com PBS-Tween 0,05% (PBS-T) e incubada com o anticorpo monoclonal IgG anti-poli-histidina conjugado com peroxidase (proporção 1:10.000 de anticorpo para solução de bloqueio, respectivamente). Após 1 hora de incubação, a membrana foi novamente lavada 3 vezes por 5 minutos com PBS-T. A reatividade foi detectada utilizando-se o kit Amersham™ ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Reino Unido).

3.4 Purificação da proteína recombinante.

O sistema de expressão utilizado adiciona uma sequência de 6 resíduos de histidina (6XHis) na extremidade N-terminal da proteína. Isto possibilita a purificação da proteína em coluna de Sepharose (GE) carregada com Ni²⁺. A proteína recombinante se liga ao Ni²⁺ via resíduos de histidina, enquanto proteínas contaminantes são removidas após o uso de tampões contendo baixas concentrações de imidazol (20 mM, 40 mM, 60 mM). Em seguida, a proteína de interesse foi eluída com um tampão contendo 500 mM e 1M de imidazol. As frações de todas as etapas da purificação foram coletadas e analisadas em gel SDS-PAGE antes e após a diálise, realizada com Tris pH 8,0 a 20 mM e 500 mM NaCl, a fim de reduzir as concentrações de imidazol nas amostras. Para tal, foi utilizada a membrana Fisherbrand™ Regenerated Cellulose Dialysis Tubing (Fisher brand, EUA). A concentração estimada da proteína recombinante obtida foi avaliada pelo reagente de Bradford (Sigma-Aldrich, EUA).

3.5 Avaliação da reatividade das proteínas recombinantes com soros de pacientes positivos para leptospirose por ELISA.

A proteína recombinante foi imobilizada na concentração de 500 ng/poço em tampão carbonato 0,1M em placas de ELISA (High Binding, Costar, Corning

incorporated, EUA) durante 16h a 4°C. Após a imobilização, o excesso de proteína foi removido por meio de 3 lavagens com PBS-T. Em seguida, a placa foi bloqueada com solução de PBS-T-Leite, e incubadas por 1 hora à 37°C. Após esse período, um novo ciclo de lavagem foi realizado para remover o bloqueio não ligado. Os soros de humanos pareados foram utilizados como anticorpo primário e divididos em duas categorias: MAT+ (fase convalescente) e MAT- (fase inicial). Como se trata de uma proteína recombinante produzida em *E. coli*, os soros de pacientes foram adsorvidos previamente em 10% de extrato de *E. coli*, para diminuir interações inespecíficas. Para detecção da interação proteína recombinante/soro de paciente, foi utilizado anticorpo anti-IgG e anti-IgM humanos conjugados com peroxidase (ambos 1:10.000). O ensaio foi revelado com solução de o-Fenilenodiamina (OPD) (1 mg/mL) e peróxido de hidrogênio (1µL/mL) diluídos no tampão citrato fosfato e quantificado em leitora de ELISA (Multiskan-FC, Thermo Fisher Scientific, Finlândia) à 492 nm. Como comparativo foi utilizado o *cutoff value*, valor calculado utilizando a média (m) e o desvio padrão (dp) de soro de pacientes que não foram diagnosticados com a doença (soro comercial SIGMA), de acordo com a seguinte equação: $c = m + (3x dp)$, onde todas as amostras que obtiveram um valor acima do cutoff foram consideradas como reativas. Foi plotado um gráfico utilizando os dados obtidos do ensaio através do software GraphPad Prism 6 (GraphPad Prism, EUA).

3.6 Avaliação da reatividade das proteínas recombinantes com soros positivos para leptospirose por *Western blotting*.

Para avaliação da reatividade por *Western blotting* a proteína recombinante (4 ug) e o controle negativo BSA foram separados em triplicata por SDS-PAGE e transferida para uma membrana de nitrocelulose “Hybond-ECL” (GE Healthcare, Reino Unido) em sistema semi-úmido por 10 minutos, 1,3 A por cm² em Tris-Glicina acrescido de 1,85% de SDS (tampão de transferência). Em seguida, a membrana foi cortada e separada em 3 recipientes e as membranas foram incubadas com uma solução de bloqueio (PBS-T-Leite) por 1 hora sob agitação. A solução de bloqueio foi descartada e uma membrana foi incubada com uma mistura de soros MAT+ (1:5000), MAT- (1:5000) ou soros de indivíduos saudáveis (1:5000), em PSB-T-Leite. Após 1 hora de incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com PBS-T e incubadas com um anticorpo secundário anti-IgG (1:10.000 em solução de bloqueio)

por uma hora. Foram realizadas novamente 3 lavagens por 5 minutos para retirada do excesso de anticorpo secundário. A reatividade foi detectada utilizando-se o kit Amershan™ ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare).

3.7 Obtenção de anticorpo policlonal em camundongo e testes de imunogenicidade.

Para a produção de soro hiperimune em camundongos BALB/c (18 a 22g) foram realizados dois esquemas de imunização via subcutânea com 10 µg da Lig recombinante adsorvidas em 12,5% Al(OH)₃, em um volume total de 250 µL por dose. O primeiro esquema foi feito 2 reforços com intervalo de 15 dias, já o segundo esquema foi feito com 6 reforços com intervalo de 7 dias. Ambos os esquemas totalizaram 45 dias de experimento. O uso desses animais como modelo experimental foi aprovado pelo comitê de ética da instituição sob a CEUA: 4632250422, o Biotério Central do Instituto Butantan nos forneceu 4 animais para a realização do projeto.

Os animais, em ambos os esquemas, foram sangrados via plexo retro-orbital antes das imunizações como controle (sangria pré-imunização) e a cada 15 dias para avaliar a imunogenicidade das doses. O sangue coletado foi mantido a 37°C por 30 minutos e posteriormente, o coágulo foi deslocado por centrifugação a 10.000 x g por 5 minutos. Após a centrifugação, o soro foi retirado e separado em novos microtubos de 1,5 mL e foi armazenado a -20°C. A titulação dos soros obtidos foi feita por ELISA, a partir da imobilização de 250 ng da proteína recombinante por poço. O soro dos animais foi utilizado como anticorpo primário, adsorvido em 10% de extrato de *E. coli* e diluído em solução de PBS-T-Leite. Foi realizada diluição seriada do soro policlonal, sendo iniciada na proporção 1:100 de soro para solução de bloqueio com extrato de *E. coli*. Após esse processo, houve a incubação dos anticorpos primários por 1 hora a 37°C. Após a incubação do anticorpo primário, foram feitas 3 lavagens com PBS-T e incubação com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase por 1 hora a 37°C. A detecção foi realizada como descrito anteriormente.

3.8 Avaliação da reatividade das proteínas com anticorpo policlonal mono específico.

A proteína recombinante foi detectada com soro hiperimune produzido em camundongos BALB/c contra a própria proteína recombinante. Em resumo, a proteína recombinante (2 ug) foi separada por SDS-PAGE e transferida para uma membrana de nitrocelulose “Hybond-ECL” (GE Healthcare, Reino Unido) em sistema semi-úmido por 10 minutos, 1,3 A por cm² em Tris-Glicina acrescido de 1,85% de SDS (tampão de transferência). Em seguida, a membrana foi incubada com uma solução de bloqueio (PBS-T-Leite) por 1 hora sob agitação. A membrana foi lavada 3 vezes com PBS-T e incubada com os anticorpos primários de interesse produzidos nos camundongos. Após 1 hora de incubação, a membrana foi novamente lavada 3 vezes por 5 minutos com PBS-T e incubada com um anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase por uma hora a temperatura ambiente. Foram realizadas 3 lavagens por 5 minutos para retirada do excesso de anticorpo secundário. A reatividade foi detectada utilizando-se o kit Amershan™ ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare).

4 RESULTADOS

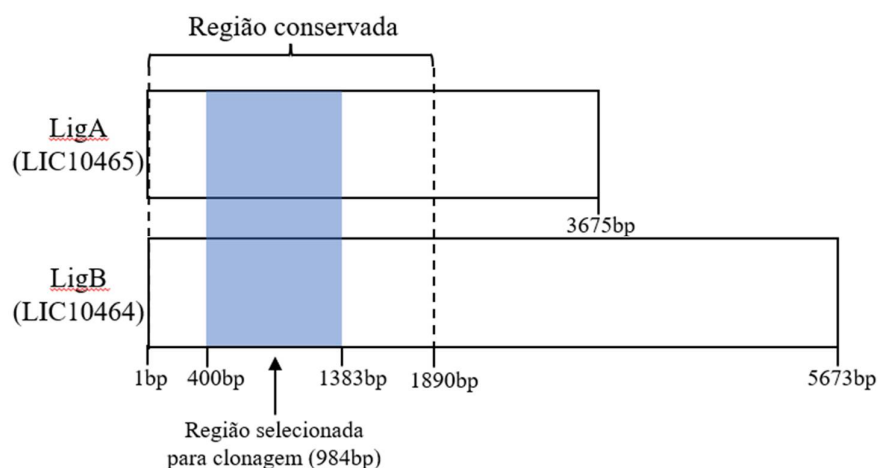
4.1 Análise *in silico* do gene selecionado:

Inicialmente, as sequências de nucleotídeos dos genes LigA e LigB foram obtidas pela plataforma NCBI. Em seguida, os genes foram alinhados pela própria plataforma a fim determinar a região conservada. Após a identificação, foram selecionados 984 nucleotídeos, resultando em 328 aminoácidos na proteína

recombinante, para ser a região de interesse para clonagem. A partir desta sequência foram desenhados os *primers* (tabela 1) pelo software SnapGene.

Utilizando os programas PFAM e SMART foi possível obter a predição do domínio da proteína LigA e LibB que contem 13 e 12 domínios da família Big_2 respectivamente. Esses domínios apresentam dobras semelhantes a imunoglobulinas (Ig) e já foram descritos como a molécula de adesão da célula hospedeira (HAAKE; MATSUNAGA, 2021). Os domínios da LigA começam no do aminoácido 52 ao 1210 e da LigB do aminoácido 7 ao 1544.

Figura 1 - Imagem ilustrativa do gene da LigA e LigB



Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Imagem ilustrativa do gene da LigA e LigB com seus tamanhos correspondentes em pares de base (bp). Delimitação da região conservada e da região selecionada para clonagem.

A tradução da sequência de nucleotídeos selecionada resulta em uma proteína recombinante de interesse com massa estimada em 36 KDa (cerca de 110 Dalton por aminoácido). A massa da proteína recombinante é importante para a aplicação de técnicas como o SDS-Page e *Western Blotting*.

Em seguida, o programa WebCutter (<http://heimanlab.com/cut2.html>) nos forneceu uma lista de enzimas de restrição que não clivariam a sequência do gene de interesse. Essa lista foi comparada com as enzimas de restrição que possuíam sítios de clivagem no vetor pAE. Para a determinação do par de enzimas de restrição a ser utilizado, foi usada a ferramenta “*Double Digest Calculator*”, da Thermo Scientific, (<https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/thermo-scientific/molecular->

biology/thermo-scientific-restriction-modifying-enzymes/restriction-enzymes-thermo-scientific/double-digest-calculator-thermo-scientific.html) que possibilita a determinação de qual par de enzimas possui maior eficiência no mesmo tampão. As enzimas *XhoI* e *HindIII* foram escolhidas, uma vez que não possuíam sítios de clivagem na sequência do gene, sendo também capazes de clivar o vetor pAE e ambas utilizando o Buffer R.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos e enzimas de restrição utilizados para a clonagem

Primer (5' - 3')	Enzima de restrição*	Sequência de nucleotídeos	Amplicon
Forward	XhoI	atcg CTCGAG ACACCAGCCATTCTTAACTC	
Reverse	HindIII	atcg AAGCTTTT TATCCCAGACCTTTATTGTTGTC	984bp

*Os sítios referentes às enzimas de restrição se encontram destacados em negrito e sublinhados.

Fonte: próprio autor, 2022.

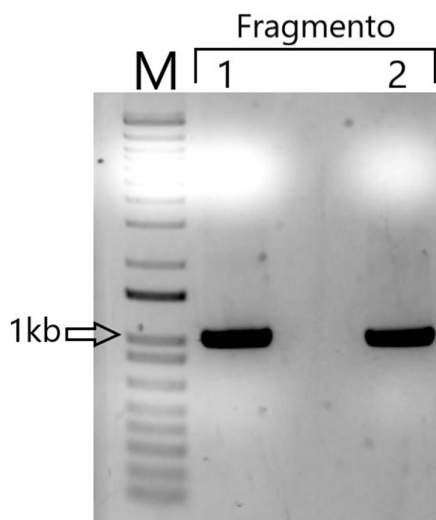
Legenda: Oligonucleotídeos e enzimas de restrição utilizados para a clonagem do fragmento de interesse do genoma de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni.

4.2 Clonagem do fragmento de interesse

Foram construídos os *primers Forward* e *Reverse*, sendo que a construção do *primer Forward* considera o início da sequência do fragmento de interesse a partir da sequência de nucleotídeo codificante do aminoácido 135. As sequências dos primers, bem como as enzimas de restrição utilizadas podem ser observados na Tabela 1.

A amplificação do fragmento foi realizada utilizando-se o kit Q5 High-Fidelity em diferentes temperaturas de anelamento e o genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni como molde. Os fragmentos resultantes foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 2).

Figura 2 - Análise de amplicons por PCR



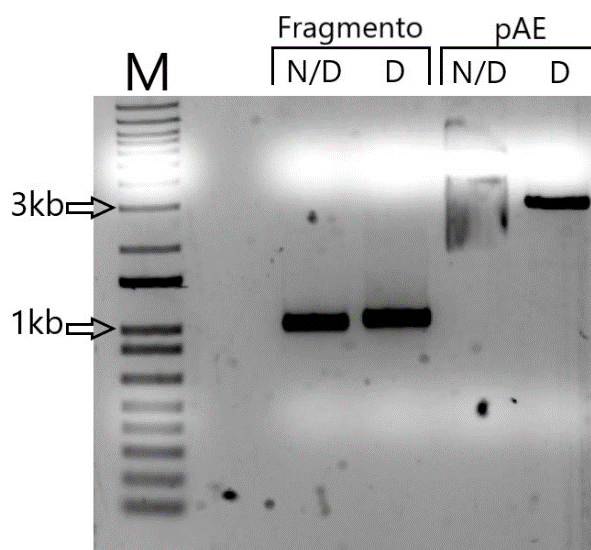
Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Análise de amplicons após PCR da região de interesse a partir do genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Fiocruz L1-130. A seta indica o amplicon com tamanho esperado, de aproximadamente 1000 pares de base. (M) Marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); O PCR foi realizado conforme as condições estabelecidas pelo fabricante, variando-se a temperatura de anelamento em 55°C (fragmento1) ou 60°C (fragmento 2)

Como podemos observar na Figura 2, as amostras 1 e 2 exibiram banda com tamanho esperado, indicando que ambas as temperaturas funcionaram. Em seguida, as amostras foram agrupadas e purificadas. Subsequentemente foi realizada a quantificação dos produtos da PCR, totalizando 52 ng/μL.

Na etapa seguinte, foi realizada a digestão de cerca de 2 μg do inserto e do vetor com as enzimas de restrição selecionadas, de modo a permitir a construção do plasmídeo recombinante. Após reação de ligação mediada pela enzima T4 ligase, os produtos foram utilizados para transformar por choque térmico *E. coli* DH5α competentes para seleção dos clones recombinantes.

Figura 3 - Gel de agarose para análise do fragmento e vetor diferidos

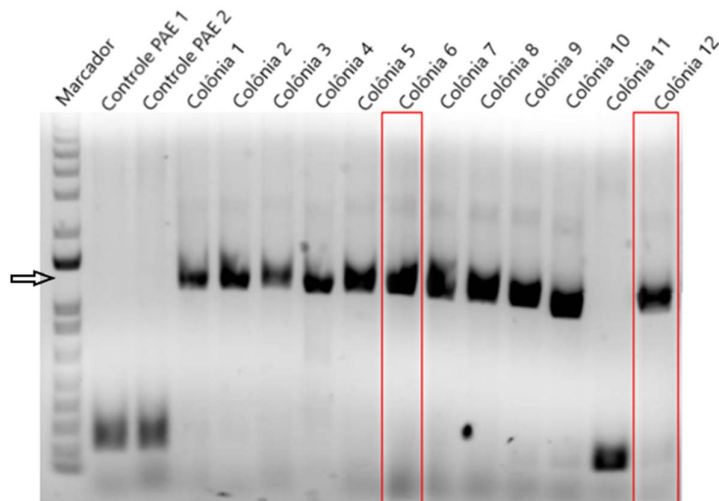


Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Gel de agarose para análise do fragmento e vetor digeridos. (Marcador) padrão molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Fragmento de interesse não digerido (N/D) e digerido (D); Vetor pAE não digerido (N/D) e digerido (D)

Com o intuito de confirmar o sucesso do processo de transformação, foi realizado PCR de colônia (Figura 4). Ambas as concentrações de inverteo/vetor (3:1 e 10:1) utilizadas resultaram em colônias, sendo então selecionadas 6 colônias de cada condição e realizado o PCR utilizando os primers T7, o qual flanqueia o inserto ligado ao vetor. Quase todas as colônias apresentaram o plasmídeo recombinante de interesse, indicando corretamente sucesso da clonagem.

Figura 4 - PCR de colônia



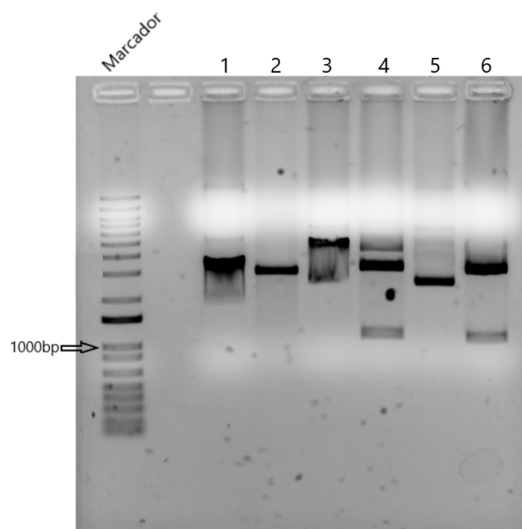
Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Gel de agarose para análise da reação de PCR de colônia para confirmar a transformação vetor pAE. (Marcador) Padrão molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Como controle para determinar o tamanho do vetor pAE sem o fragmente foi aplicado 2 amostras no gel contendo o vetor nativo (Controle pAE 1 e 2). As respectivas amostras foram produtor do PCR, sendo colônia de 1 a 6 selecionadas da placa com concentração de 3×10^{-1} e colônia 7 a 12 selecionadas da placa com concentração 10^{-1} .

A partir do resultado do PCR de colônia, foram escolhidas 2 colônias para as próximas etapas, sendo elas a colônia 6 (C6) e a colônia 12 (C12) como mostra a Figura 4. Sendo assim, foi realizado um novo cultivo contendo 3 mL de meio LB e ampicilina para obtenção de uma maior quantidade celular e em seguida fazer a extração do plasmídeo.

Após a extração os plasmídeos foram separadamente purificados e digeridos (100 ng) pelas enzimas de restrição XhoI e HindIII a 37°C por cerca de 1 hora e 30 minutos, com o objetivo de se certificar da presença do inserto no vetor recombinante (Figura 5).

Figura 5 – Digestão enzimática do vetor pAE com o fragmento



Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Análise de confirmação da presença do fragmento de interesse no vetor pAE recombinante através da digestão enzimática do vetor. (Marcador) padrão molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); (1) Vetor pAE íntegro sem digerir; (2) Vetor pAE selvagem digerido (linearizado); (3) Plasmídeo recombinante extraído da colônia 6 não digerido; (4) Plasmídeo recombinante extraído da colônia 6 duplamente digerido; (5) Plasmídeo recombinante extraído da colônia 12 não digerido; (6) Plasmídeo recombinante extraído da colônia 12 duplamente digerido. A seta destaca os fragmentos dos vetores pAE recombinantes correspondentes ao fragmento de interesse, que estão no tamanho esperado de cerca de 1000 pares de bases.

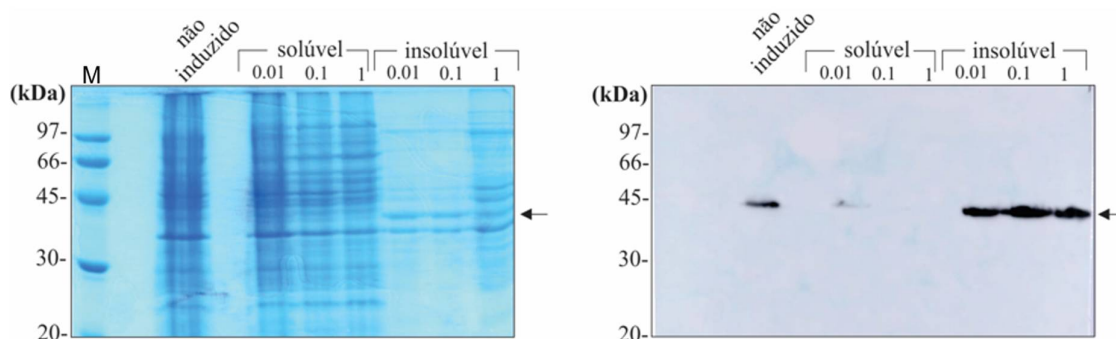
Após o processo de digestão, ficou evidente que as duas colônias selecionadas continham os plasmídeos recombinantes, uma vez que a liberação do inserto de interesse foi observada. No entanto como o plasmídeo proveniente da colônia 12 apresentou bandas mais uniforme, foi selecionada para continuar nos próximos experimentos. O plasmídeo recombinante foi sequenciado pelo método de Sanger, não sendo observadas mutações na sequência, possibilitando, portanto, as próximas etapas do trabalho.

4.3 Expressão do fragmento de interesse

Para verificar o perfil de expressão da proteína de interesse, três diferentes estirpes de *E. coli* foram transformada com o plasmídeo recombinante C12, tais como BL21 (DE3) (Figura 6), BL21 Star (DE3) pLysS (Figura 7) e C43 (DE3) (Figura 8). A indução ocorreu conforme descrito na metodologia, 3 horas a 37°C sob agitação com diferentes concentrações de IPTG (0,01, 0,1 e 1 mM). Inicialmente foram coletadas as

amostras de extrato de *E. coli* Antes da indução e a pós a indução de todas as estirpes em todas as condições de indução.

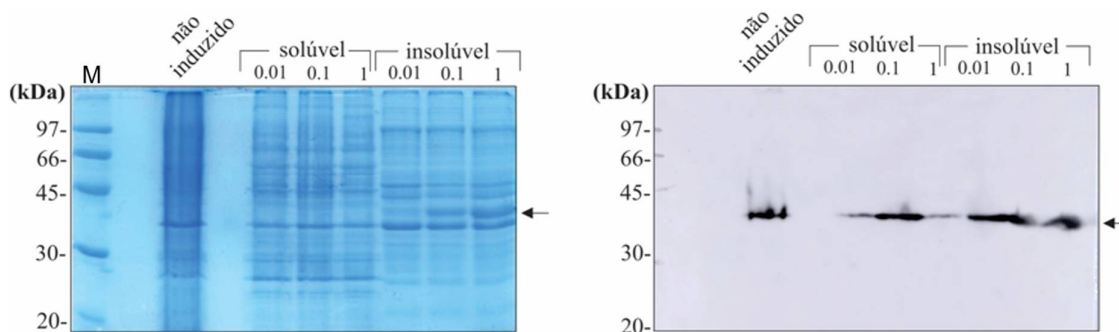
Figura 6 - Análise da expressão da proteína recombinante na cepa BL21 DE3



Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Análise da expressão da proteína recombinante por eletroforese em gel de poliácridamida 12% (imagens à esquerda), com posterior detecção da proteína alvo por Western Blotting (imagens à direita). Avaliação da expressão da proteína recombinante utilizando a estirpe de *E. coli* BL21 (DE3) induzidas com 0,01; 0,1 e 1 mM de IPTG. (M) Padrão de massa molecular; fração não induzido; fração solúvel e fração insolúvel. As setas indicam a faixa de massa molecular na qual a proteína alvo

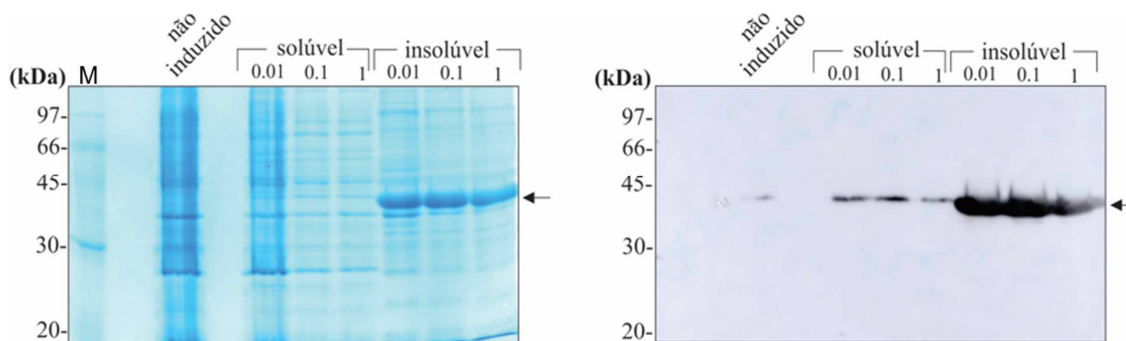
Figura 7 - Análise da expressão da proteína recombinante na cepa BL21 C43



Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Análise da expressão da proteína recombinante por eletroforese em gel de poliácridamida 12% (imagens à esquerda), com posterior detecção da proteína alvo por Western Blotting (imagens à direita). Avaliação da expressão da proteína recombinante utilizando a estirpe de *E. coli* C43 (DE3) induzidas com 0,01; 0,1 e 1 mM de IPTG. (M) Padrão de massa molecular; fração não induzido; fração solúvel e fração insolúvel. As setas indicam a faixa de massa molecular na qual a proteína alvo

Figura 8 - Análise da expressão da proteína recombinante na cepa BL21 Star (DE3) pLysS

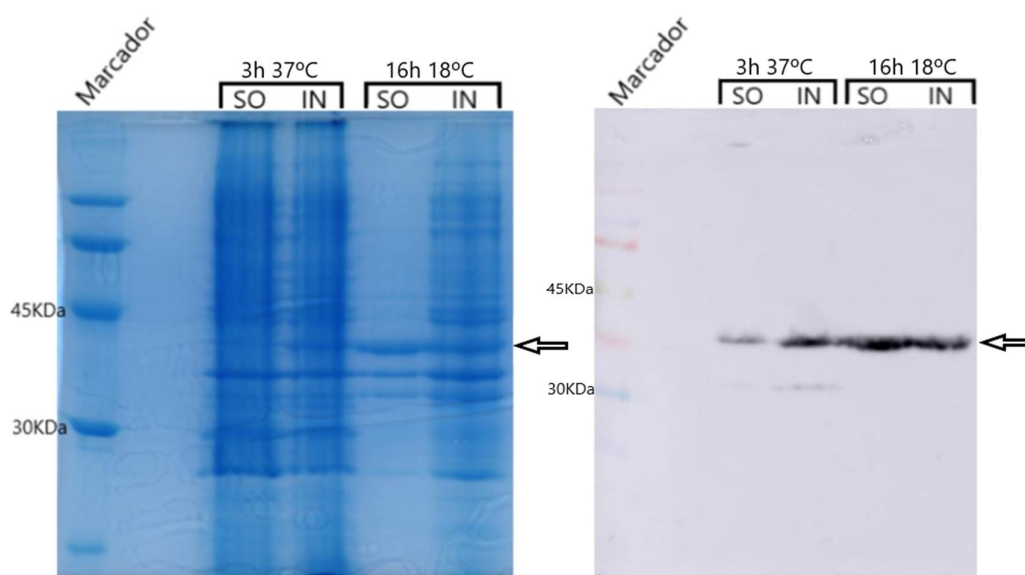


Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Análise da expressão da proteína recombinante por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (imagens à esquerda), com posterior detecção da proteína alvo por Western Blotting (imagens à direita). Avaliação da expressão da proteína recombinante utilizando a estirpe de *E. coli* BL21 Star (DE3) pLysS induzidas com 0,01; 0,1 e 1 mM de IPTG. (M) Padrão de massa molecular; fração não induzido; fração solúvel e fração insolúvel. As setas indicam a faixa de massa molecular na qual a proteína alvo

Como podemos observar, todas as estirpes apresentaram a banda proteica no tamanho esperado, apresentaram escape de expressão, bem como uma maior expressão na fração insolúvel. Desse modo, como a estirpe BL21 Star (DE3) pLysS apresentou um menor escape de expressão e uma quantidade maior na fração solúvel comparada as outras, foi feito um segundo cultivo em um volume maior (400 mL) apenas com esta estirpe para verificar a indução em 16 horas a 18°C sob agitação. Otimizar a produção da proteína na fração solúvel facilita a purificação da mesma e como pouca diferença foi observada nas diferentes concentrações de IPTG, a concentração de 0,01 mM foi mantida (Figura 9).

Figura 9 - Análise da expressão da proteína recombinante na cepa BL21 Star (DE3) pLysS a 18 horas de indução



Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Análise da expressão da proteína recombinante por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (imagem à esquerda), com posterior detecção da proteína alvo por Western Blotting (imagem à direita). Avaliação de expressão em larga escala (400mL) expressa em *E. coli* BL21 Star (DE3) pLysS. (Marcador) Padrão de massa molecular; fração solúvel (SO) e insolúvel (IN) por 3 horas a 37°C e fração solúvel (SO) e insolúvel (IN) por 16 horas a 18°C, respectivamente.

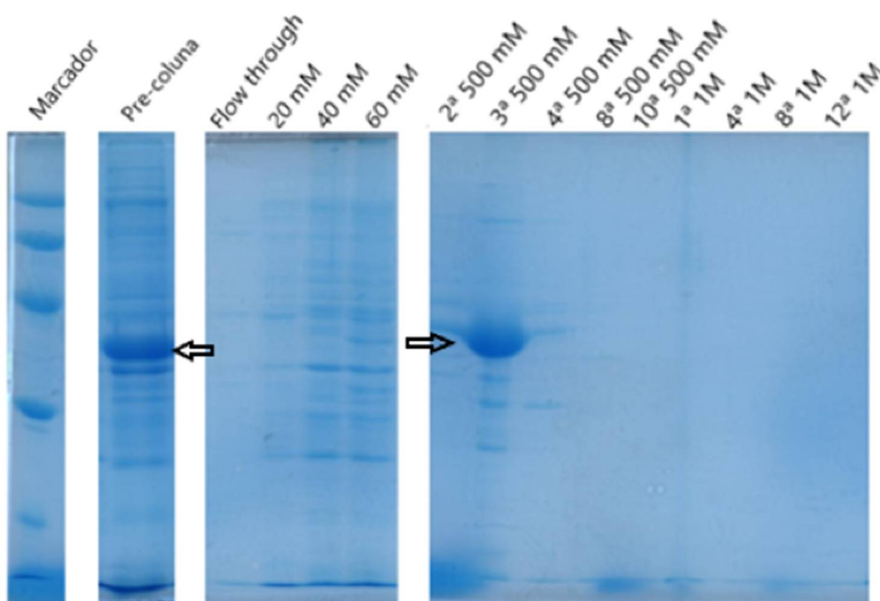
Como pode ser observado, a estirpe BL21 Star (DE3) pLysS apresentou um aumento na produção da proteína alvo na fração solúvel na condição de indução em 16 horas a 18°C, a qual foi selecionada para a purificação por cromatografia de afinidade à metal.

4.4 Purificação da proteína recombinante

Após a confirmação da presença da proteína-alvo na fração solúvel do extrato de *E. coli*, a fração foi purificada em coluna de *Sepharose* tratada com íons Ni^{+2} . Através dos anéis imidazólicos presentes em sua estrutura, as histidinas são capazes de se ligar e interagir com os íons de níquel, componentes da coluna. Desse modo, com o auxílio das poli-histidinas adicionada à proteína recombinante produzida pelo vetor pAE, a proteína de interesse tende a interagir com o níquel e se fixar à coluna, enquanto que as proteínas contaminantes, com menor afinidade por este metal, passam diretamente pela coluna e são coletadas no *flowthrough*. Com o objetivo de retirar as proteínas contaminantes, são realizadas lavagens com concentrações crescentes de imidazol. Esse componente compete com os anéis imidazólicos da

estrutura molecular das histidinas pela interação com o Ni^{+2} , dessa forma, há retirada das proteínas que tem uma ligação mais inespecífica à coluna. Como a cauda de polihistidina permite uma ligação relativamente forte com o metal da coluna, é esperado que a eluição da proteína alvo ocorram nas lavagens com 500 mM e 1 M de imidazol. O *flowthrough* de cada etapa de lavagem foi coletado para posterior análise por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% e a solução obtida com a eluição à 500 mM e a 1 M de imidazol foi coletada de 2 em 2 mL em microtubos distintos (Figura 10)

Figura 10 - Análise por SDS-PAGE da purificação da proteína alvo



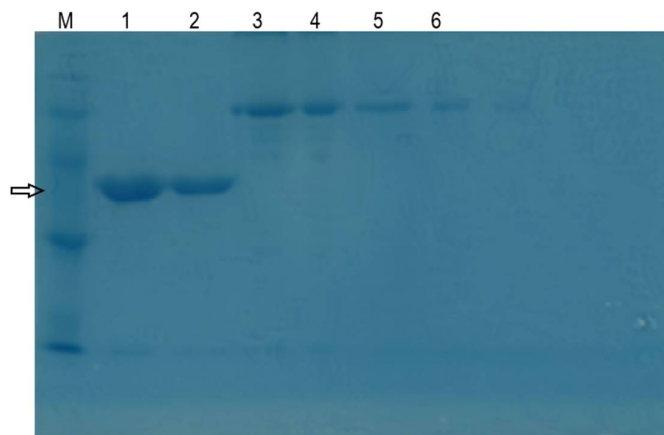
Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Análise por SDS-PAGE da purificação da proteína alvo. (Marcador) Padrão de massa molecular; Amostra antes de passar pela coluna de cromatografia (Pré-Coluna); Amostra após a passagem da amostra pela coluna (*flowthrough*); Lavagens da coluna com baixas concentrações de imidazol (20 mM, 40 mM e 60 mM); Eluição da proteína alvo com 500 mM de imidazol em diferentes tubos de 2 mL, tubo 2 (2ª 500 mM), tubo 3 (3ª 500 mM), tubo 4 (4ª 500 mM), tubo 8 (8ª 500 mM) e tubo 10 (10ª 500 mM); Lavagem da coluna com 1 M de imidazol em diferentes tubos de 2 mL, tubo 1 (1ª 1M), tubo 4 (4ª 1M), tubo 8 (8ª 1M), tubo 12 (12ª 1M). As setas indicam a faixa de massa molecular na qual a proteína alvo se encontra.

A Figura 10 ilustra que a proteína foi eluída à 500 mM de imidazol já nos primeiros tubos coletados. Como podemos observar, há uma baixa quantidade de proteína no tubo 2 e 4 indicando que a maior parte da proteína já foi eluída no tubo 3 e nas demais amostras de lavagem não apresentaram a proteína alvo. Em seguida a amostra 2, 3 e 4 foram misturadas e realizado a diálise (Figura 11), O processo foi realizado à temperatura ambiente em 2 trocas de 2 horas, sob agitação, utilizando-se

2 L de solução tampão contendo 20 mM Tris pH 8,0 e 500 mM NaCl em cada passagem. A concentração estimada da proteína foi obtida com o auxílio do software (GelQuant) comparando a amostra da proteína alvo com amostras de BSA com concentrações estabelecidas, resultando aproximadamente 0,2 μ g/ μ L.

Figura 11 – Quantificação da proteína alvo



Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: - Análise por SDS-PAGE da diálise da proteína alvo purificada. A seta indica a faixa de massa molecular na qual a proteína alvo se encontra. (M) Padrão de massa molecular; (1) 20 μ L rLig; (2) 10 μ L rLig; (3) 4 μ g de BSA; (4) 3 μ g de BSA; (5) 2 μ g de BSA; (6) 1 μ g de BSA.

4.5 Avaliação da reatividade das proteínas recombinantes com soros positivos para leptospirose por ELISA e por *Western Blotting*

A forma de diagnóstico mais utilizada na leptospirose é o teste MAT, capaz de detectar a presença de anticorpos aglutinantes sorovar-específicos presentes no soro de pacientes.

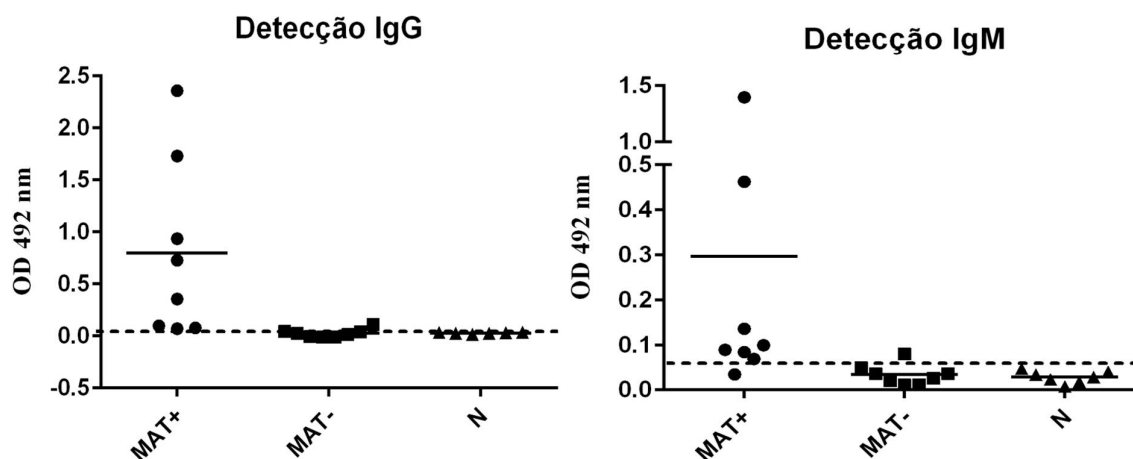
A fim de avaliar tanto se a proteína recombinante é expressa durante o processo de infecção da leptospirose, quanto sua imunogenicidade, foi analisada sua reatividade com 8 pares de soros pertencentes a 8 pacientes diagnosticados com a doença. Os pares de soro estavam organizados em MAT negativo, quando o paciente ainda não produz anticorpos aglutinantes contra o agente etiológico da doença, ou seja, na fase inicial da leptospirose, e em MAT positivo, quando há soroconversão e o paciente possui anticorpos aglutinantes contra os antígenos da *Leptospira*. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 12.

Observar-se que, na fase inicial da doença, anteriormente à soro conversão (MAT-), 12,5% dos pacientes possuíam soro reativo à Lig recombinante em ambas as detecções (IgG e IgM), ao passo que após a soroconversão (MAT+) 100% dos pacientes foram reativos na detecção IgG e 87,5% na detecção IgM. Esses resultados revelam que a Lig recombinante é um bom candidato a diagnóstico para leptospirose na fase convalescente, mas não é um candidato a diagnóstico para fase inicial da doença.

Para avaliação da reatividade por *Western Blotting* (Figura 13) foi usado a combinação dos 8 soros MAT+ e MAT- e 4 soros normais como anticorpo primário e a detecção de IgG a partir da incubação com anticorpos anti-IgG-humano conjugado com peroxidase.

Foi feito um gel de poliacrilamida 12% e aplicados 2 µg da proteína recombinante rLig e BSA, como controle negativo, em triplicata, para posterior incubação com distintas amostras de soro como fonte de anticorpos anti-LigA e/ou anti-LigB resultantes da infecção. Após a corrida, o gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose e cortada em 3 partes, cada uma contendo uma replicata. Cada membrana foi incubada com seu respectivo soro e como podemos observar há uma grande detecção da proteína com o soro MAT+ e nem uma detecção com soro MAT- e soros normais, confirmando o resultado feito por ELISA.

Figura 12 - Reatividade da proteína recombinante com soro de pacientes diagnosticados com leptospirose

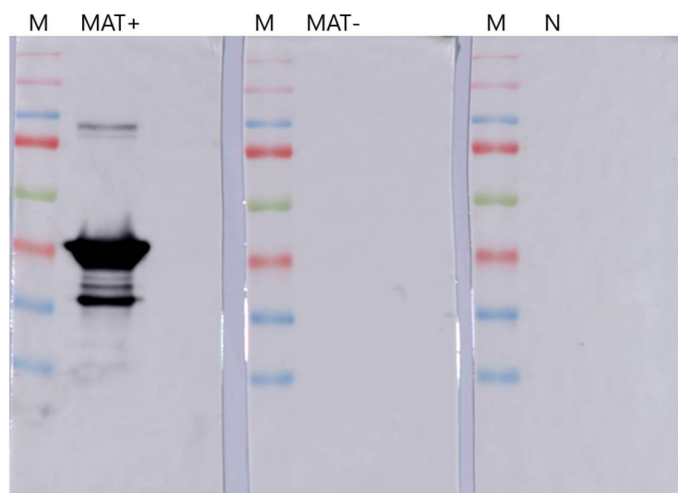


Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: A leitura das amostras foi feita em comprimento de onda (OD) de 492 nm; Soros MAT positivo (MAT+); Soros MAT negativo (MAT-); Soros normais (N). A detecção de IgG foi feita com Anti-IgG-

humano conjugado com peroxidase e a detecção de IgM foi feita com Anti-IgM-humano conjugado com peroxidase. A linha tracejada representa o cutoff, calculado a partir da média de reatividade de 4 soros normais adicionado três vezes de seu desvio padrão.

Figura 13 - Reatividade da proteína recombinante com soro de pacientes diagnosticados com leptospirose



Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Reatividade da proteína recombinante com soro de pacientes diagnosticados com leptospirose. (Marcador) Padrão de massa molecular; Soros MAT positivo (MAT+); Soros MAT negativo (MAT-); Soros normais (N). A detecção de IgG foi feita com Anti-IgG-humano conjugado com peroxidase.

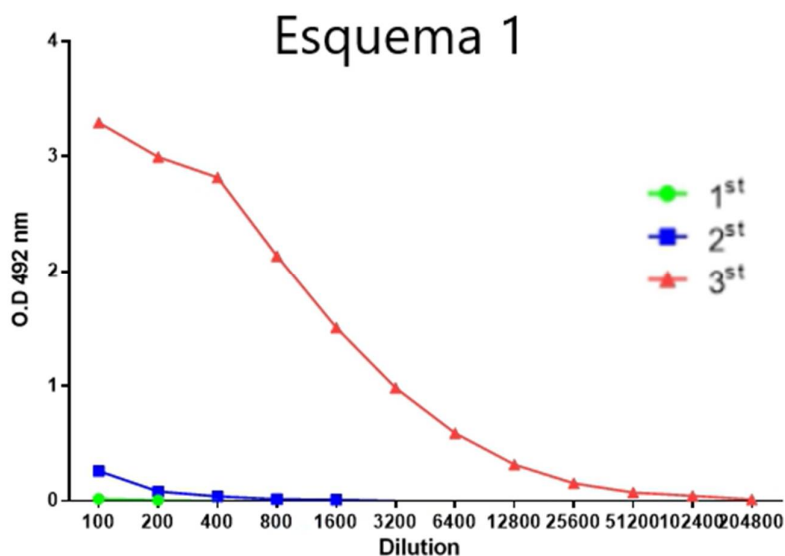
4.6 Obtenção de anticorpo policlonal em camundongo, testes de imunogenicidade e detecção da proteína recombinante por *Western Blotting* e *ELISA*

Camundongos imunizados com a proteína recombinante para a obtenção de anticorpo policlonal foram usados para realizar os testes de imunogenicidade e detecção da proteína recombinante por *Western Blotting* e por *ELISA*.

Observa-se na Figura 14 que não houve resposta imunológica na primeira sangria e na segunda houve um título muito baixo, sendo que apenas na terceira sangria foi observada uma resposta imune humoral robusta. Dessa forma podemos concluir que a resposta contra a Lig recombinante foi muito pequena. Então foi realizado o teste novamente em outros camundongos alterando apenas o intervalo das doses, de 15 dias para 7 dias e totalizando 7 doses administrada por camundongo ao todo.

Como pode ser observado na Figura 15, após as duas primeiras doses (primeira sangria) já houve um aumento na produção de anticorpos contra a Lig recombinante e após as doses de reforço, houve aumento ainda maior na produção, evidenciando o desenvolvimento de uma resposta imunológica contra a proteína, indicando, portanto, sua imunogenicidade.

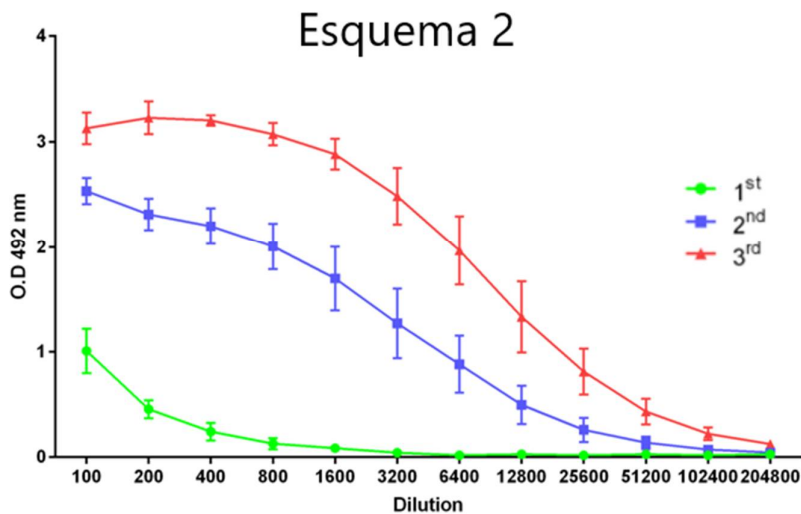
Figura 14 - Titulação do soro policlonal dos animais imunizados com Lig recombinante



Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Titulação do soro policlonal dos animais imunizados com Lig recombinante. Os camundongos BALB/c foram imunizados 3 vezes em um intervalo de 15 dias com 10 µg da proteína recombinante adsorvidos em 12,5% de adjuvante. Foi realizado um pool com volume equivalente do soro obtido de cada um dos quatro animais utilizados e feito uma diluição seriada de 1:100. (1ST) Primeira sangria, 15 dias; (2nd) Segunda sangria, 30 dias; (3rd) Terceira sangria, 45 dias.

Figura 15 - Titulação do soro policlonal dos animais imunizados com Lig recombinante segundo esquema



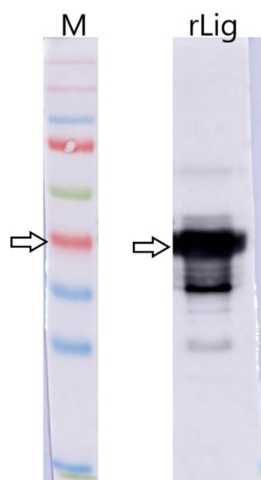
Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Titulação do soro policlonal dos animais imunizados com o segundo esquema. Os camundongos BALB/c foram imunizados 7 vezes em um intervalo de cerca de 7 dias com 10 µg da proteína recombinante adsorvidos em 12,5% de adjuvante. Foi realizado um pool com volume equivalente do soro obtido de cada um dos quatro animais utilizados e feito uma diluição seriada de 1:100. (1st) Primeira sangria, 15 dias; (2nd) Segunda sangria, 30 dias; (3rd) Terceira sangria, 45 dias.

A partir disso, o soro policlonal contra a Lig recombinante obtido foi utilizado para realizar a detecção da proteína recombinante por *western blotting* (Figura 16).

Foi realizada eletroforese em gel de poliácridamida 12%, onde foram aplicados apenas o marcador de peso molecular e cerca de 3 µg da proteína recombinante desnaturada. Após o SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose. Uma alíquota do pool de soro hiperimune produzido pelos camundongos BALB/c (na proporção de 1 µL de soro para 5.000 µL de solução de bloqueio), adsorvido em 10% de extrato de *E. coli*, foi incubado na membrana a temperatura ambiente por uma hora. Em seguida, houve incubação com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase para posterior revelação.

Figura 16 - Detecção da proteína recombinante a partir do soro policlonal



Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Detecção da proteína recombinante a partir do soro policlonal dos animais imunizados com a Lig recombinante por western blotting. (M) Padrão de massa molecular; (rLig) Lig recombinante. As setas indicam a faixa de massa molecular na qual a proteína alvo se encontra.

Como podemos observar os anticorpos produzidos pelos camundongos foram capazes de detectar a proteína recombinante através da técnica de *Western blotting*, evidenciando o sucesso da produção do soro hiperimune contra a Lig recombinante.

5 DISCUSSÃO

As proteínas Lig são proteínas de superfície da *Leptospira* spp., tendo sido caracterizadas quanto à adesão *in vitro* a diversos componentes do hospedeiro, sobremaneira a reguladores negativos do complemento (FRAGA et al., 2017). Evidências experimentais suportam seu papel na virulência das leptospiras (CHOY et al., 2011).

As proteínas Lig são expressas durante a infecção, uma vez que foi mostrada a reatividade de soro anti - LigA em secções de rins de hamsters experimentalmente infectados (PALANIAPPAN et al., 2002). A atenuação de virulência, rotineiramente observada após sucessivas passagens de leptospiras em meio de cultura, está correlacionada a uma redução da expressão de LigA e LigB (MATSUNAGA et al., 2005). Ademais, o silenciamento múltiplo de LigA e LigB pela ferramenta de CRISPR-interferência resultou na atenuação da virulência de *L. interrogans* (FERNANDES et al., 2022).

As proteínas LigA e LigB são os candidatos vacinais mais promissores até o momento (EVANGELISTA et al., 2017). Neste presente trabalho foi feita a clonagem de uma porção conservada dentre essas proteínas a fim de avaliar sua reatividade com soro de paciente e sua imunogenicidade.

Diante disso, a reatividade com soro de paciente foi avaliada por ELISA e por *Western Blotting* que demonstrou que soro de pacientes em fase MAT+ apresentam alta reatividade tanto para detecção de anticorpos do tipo IgM quanto IgG, mas que para MAT- a reatividade é muito baixa. A proteína recombinante LigA tem sido recentemente usada como antígeno para teste diagnóstico *point of care* pela Bio-Manguinhos/Fiocruz (DPP® Leptospirose). Entretanto, dada a baixa sensibilidade na fase inicial da doença, na qual a terapêutica por antibióticos é mais efetiva, novos antígenos recombinantes, incluindo proteínas quiméricas, estão sendo exploradas por nosso grupo.

Nos experimentos realizados em camundongos neste projeto pôde-se observar que a resposta imunológica contra a proteína Lig recombinante aumentou em todas as doses aplicadas, evidenciando o desenvolvimento de uma resposta imunológica contra a proteína.

O esquema padrão de imunização do nosso grupo, constituindo-se de 3 doses em intervalos de duas semanas, mostrou-se pouco eficiente para a geração de altos

títulos em soro anti-Lig; para contornar esse problema, foi adotado um esquema adicional de imunização, constante de reforço a cada 7 dias e sangria a cada 2 semanas. A partir deste esquema de imunização, altos títulos de anticorpos anti-Lig foram observados, o que favorece sua utilização para experimentos subsequentes.

6 CONCLUSÕES

As proteínas LigA e LigB de *L. interrogans* apresentam uma região N-terminal altamente conservada sendo, portanto, selecionada uma sequência contida nesta região para clonagem, expressão e purificação da proteína recombinante. Após obtenção dos plasmídeos recombinantes, foi mostrado que as sequências não apresentaram mutações, sendo a proteína recombinante expressa em *E. coli* com massa molecular esperada. A *Lig* recombinante se mostrou como um bom candidato diagnóstico para detecção da leptospirose em fase convalescente, por apresentar alta reatividade com anticorpos presentes no soro de pacientes na fase MAT+, mas não apresentou boa reatividade em fase inicial da doença (MAT-). Complementarmente, a proteína foi capaz de induzir resposta imunológica e produção de anticorpos em camundongos, evidenciando sua imunogenicidade.

REFERÊNCIAS¹

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, 25, n. 17, p. 3389-3402, Sep 1997.
- ATZINGEN, M. V.; BARBOSA, A. S.; DE BRITO, T.; VASCONCELLOS, S. A. *et al.* Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. **BMC Microbiol**, 8, p. 70, 2008.
- BHANDARI, P.; GOWRISHANKAR, J. An Escherichia coli host strain useful for efficient overproduction of cloned gene products with NaCl as the inducer. **J Bacteriol**, 179, n. 13, p. 4403-4406, Jul 1997.
- BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, J. N.; MATTHIAS, M. A. *et al.* Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect Dis**, 3, n. 12, p. 757-771, Dec 2003.
- BOLIN, C. A.; ZUERNER, R. L.; TRUEBA, G. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine containing Leptospira interrogans serovar hardjo type hardjo-bovis on type hardjo-bovis infection of cattle. **Am J Vet Res**, 50, n. 12, p. 2004-2008, Dec 1989.
- CAVENAGUE, M. F.; TEIXEIRA, A. F.; FILHO, A. S.; SOUZA, G. O. *et al.* Characterization of a novel protein of Leptospira interrogans exhibiting plasminogen, vitronectin and complement binding properties. **Int J Med Microbiol**, 309, n. 2, p. 116-129, Mar 2019.
- CINCO, M. New insights into the pathogenicity of leptospire: evasion of host defences. **New Microbiol**, 33, n. 4, p. 283-292, Oct 2010.
- DELLAGOSTIN, O. A.; GRASSMANN, A. A.; HARTWIG, D. D.; FÉLIX, S. R. *et al.* Recombinant vaccines against leptospirosis. **Hum Vaccin**, 7, n. 11, p. 1215-1224, Nov 2011.
- DOMINGOS, R. F.; FERNANDES, L. G.; ROMERO, E. C.; DE MORAIS, Z. M. *et al.* Novel Leptospira interrogans protein Lsa32 is expressed during infection and binds laminin and plasminogen. **Microbiology**, 161, n. Pt 4, p. 851-864, Apr 2015.
- DOMINGOS, R. F.; VIEIRA, M. L.; ROMERO, E. C.; GONÇALES, A. P. *et al.* Features of two proteins of Leptospira interrogans with potential role in host-pathogen interactions. **BMC Microbiol**, 12, p. 50, 2012.
- ESHGHI, A.; GAULTNEY, R. A.; ENGLAND, P.; BRÛLÉ, S. *et al.* An extracellular Leptospira interrogans leucine-rich repeat protein binds human E- and VE-cadherins. **Cell Microbiol**, 21, n. 2, p. e12949, 02 2019.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis** Melbourne, Australia: MediSci, 1999.

FERNANDES, L. G.; VIEIRA, M. L.; KIRCHGATTER, K.; ALVES, I. J. *et al.* OmpL1 is an extracellular matrix- and plasminogen-interacting protein of *Leptospira* spp. **Infect Immun**, 80, n. 10, p. 3679-3692, Oct 2012.

GAGNIUC, P.; CIMPONERIU, D.; IONESCU-TÎRGOVIȘTE, C.; MIHAI, A. *et al.* Detection of possible restriction sites for type II restriction enzymes in DNA sequences. **Rom J Intern Med**, 49, n. 2, p. 121-128, 2011.

GORIS, M. G.; HARTSKEERL, R. A. Leptospirosis serodiagnosis by the microscopic agglutination test. **Curr Protoc Microbiol**, 32, p. Unit 12E.15., Feb 2014.

GRASSMANN, A. A.; KREMER, F. S.; DOS SANTOS, J. C.; SOUZA, J. D. *et al.* Discovery of Novel Leptospirosis Vaccine Candidates Using Reverse and Structural Vaccinology. **Front Immunol**, 8, p. 463, 2017.

GROMIHA, M. M.; YABUKI, Y.; SURESH, M. X.; THANGAKANI, A. M. *et al.* TMFunction: database for functional residues in membrane proteins. **Nucleic Acids Res**, 37, n. Database issue, p. D201-204, Jan 2009.

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. Leptospiral Immunoglobulin-Like Domain Proteins : Roles in Virulence and Immunity. v. 11, n. January, p. 1–21, 2021.

JONES, D. T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. **J Mol Biol**, 292, n. 2, p. 195-202, Sep 17 1999.

JUNCKER, A. S.; WILLENBROCK, H.; VON HEIJNE, G.; BRUNAK, S. *et al.* Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. **Protein Sci**, 12, n. 8, p. 1652-1662, Aug 2003.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochim Biophys Acta**, 1751, n. 2, p. 119-139, Aug 10 2005.

KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nat Rev Microbiol**, 7, n. 10, p. 736-747, Oct 2009.

KOBE, B.; DEISENHOFER, J. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. **Trends Biochem Sci**, 19, n. 10, p. 415-421, Oct 1994.

KOBE, B.; KAJAVA, A. V. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. **Curr Opin Struct Biol**, 11, n. 6, p. 725-732, Dec 2001.

KOCHI, L. T.; FERNANDES, L. G. V.; SOUZA, G. O.; VASCONCELLOS, S. A. *et al.* The interaction of two novel putative proteins of. **Virulence**, 10, n. 1, p. 734-753, 12 2019.

LAURICHESSE, H.; GOURDON, F.; SMITS, H. L.; ABDOE, T. H. *et al.* Safety and immunogenicity of subcutaneous or intramuscular administration of a monovalent inactivated vaccine against *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae in healthy volunteers. **Clin Microbiol Infect**, 13, n. 4, p. 395-403, Apr 2007.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clin Microbiol Rev**, 14, n. 2, p. 296-326, Apr 2001.

MARTÍNEZ, R.; PÉREZ, A.; QUIÑONES, M. E. C.; CRUZ, R. *et al.* [Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba]. **Rev Panam Salud Publica**, 15, n. 4, p. 249-255, Apr 2004.

MCBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. Leptospirosis. **Curr Opin Infect Dis**, 18, n. 5, p. 376-386, Oct 2005.

NASCIMENTO, A. L.; KO, A. I.; MARTINS, E. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B. *et al.* Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **J Bacteriol**, 186, n. 7, p. 2164-2172, Apr 2004.

NASCIMENTO, A. L.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; VAN SLUYS, M. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B. *et al.* Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **Braz J Med Biol Res**, 37, n. 4, p. 459-477, Apr 2004.

NG, A.; XAVIER, R. J. Leucine-rich repeat (LRR) proteins: integrators of pattern recognition and signaling in immunity. **Autophagy**, 7, n. 9, p. 1082-1084, Sep 2011.

PEREIRA, P. R. M.; FERNANDES, L. G. V.; DE SOUZA, G. O.; VASCONCELLOS, S. A. *et al.* Multifunctional and Redundant Roles of *Leptospira interrogans* Proteins in Bacterial-Adhesion and fibrin clotting inhibition. **Int J Med Microbiol**, 307, n. 6, p. 297-310, Sep 2017.

PETERSEN, T. N.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nat Methods**, 8, n. 10, p. 785-786, Sep 29 2011.

PUNTA, M.; COGGILL, P. C.; EBERHARDT, R. Y.; MISTRY, J. *et al.* The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Res**, 40, n. Database issue, p. D290-301, Jan 2012.

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**, 37, n. 8, p. 1103-1109, Aug 2004.

RANJBAR, B.; GILL, P. Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses- a review. **Chem Biol Drug Des**, 74, n. 2, p. 101-120, Aug 2009.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 74, n. 12, p. 5463-5467, Dec 1977.

STUDIER, F. W. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. **J Mol Biol**, 219, n. 1, p. 37-44, May 1991.

TAKAHASHI; TEIXEIRA; NASCIMENTO, A. The leptospiral LipL21 and LipL41 proteins exhibit a broad spectrum of interactions with host cell components. **Virulence**, 12, n. 1, p. 2798-2813, 12 2021.

TEIXEIRA, A. F.; DE MORAIS, Z. M.; KIRCHGATTER, K.; ROMERO, E. C. *et al.* Features of two new proteins with OmpA-like domains identified in the genome sequences of *Leptospira interrogans*. **PLoS One**, 10, n. 4, p. e0122762, 2015.

TEIXEIRA, A. F.; FERNANDES, L. G. V.; CAVENAGUE, M. F.; TAKAHASHI, M. B. *et al.* Adjuvanted leptospiral vaccines: Challenges and future development of new leptospirosis vaccines. **Vaccine**, 37, n. 30, p. 3961-3973, 07 09 2019.

VIEIRA, M. L.; FERNANDES, L. G.; DOMINGOS, R. F.; OLIVEIRA, R. *et al.* Leptospiral extracellular matrix adhesins as mediators of pathogen-host interactions. **FEMS Microbiol Lett**, 352, n. 2, p. 129-139, Mar 2014.

VINCENT, A. T.; SCHIETTEKATTE, O.; GOARANT, C.; NEELA, V. K. *et al.* Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. **PLoS Negl Trop Dis**, 13, n. 5, p. e0007270, May 2019.

VINETZ, J. M.; GLASS, G. E.; FLEXNER, C. E.; MUELLER, P. *et al.* Sporadic urban leptospirosis. **Ann Intern Med**, 125, n. 10, p. 794-798, Nov 1996.

YU, C. S.; LIN, C. J.; HWANG, J. K. Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions. **Protein Sci**, 13, n. 5, p. 1402-1406, May 2004.

YU, N. Y.; WAGNER, J. R.; LAIRD, M. R.; MELLI, G. *et al.* PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. **Bioinformatics**, 26, n. 13, p. 1608-1615, Jul 01 2010.

YAN, W. *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Leptospira* immunoglobulin-like protein B (rLigB) in a hamster challenge model. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 2, p. 230-237, 2009.