

TÍTULO: Obtenção de cepa de *Escherichia coli* inativada expressando quimera recombinante contendo fragmentos de proteínas de *Leptospira* spp. para futura utilização como vacina vetorizada

AUTORES: HECKTHEUER, A. S.; BETTIN, E. B.; FIGUEIRA, I.; DELLAGOSTIN, O. A.; OLIVEIRA, T. L.

INSTITUIÇÃO: NÚCLEO DE BIOTECNOLOGIA, CENTRO DE DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO, UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS – BRASIL

ABSTRACT:

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial causada por bactérias do gênero *Leptospira*, responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade em humanos e perdas econômicas na produção animal. Um dos métodos mais indicados e eficazes para sua profilaxia é a vacinação, porém as formulações disponíveis apresentam limitações. Sendo assim, o desenvolvimento de alternativas promissoras, como vacinas recombinantes vetorizadas, se faz necessário. Proteínas Dependentes de TonB (TBDR) são descritas como potenciais alvos vacinais para diversos patógenos. Dessa forma, esse trabalho buscou produzir uma cepa recombinante de *Escherichia coli* C41 (DE3) inativada expressando uma quimera recombinante composta por fragmentos de três proteínas TBDR de *Leptospira interrogans* visando sua futura utilização como vacina. Utilizando uma abordagem reversa e estrutural, 9 fragmentos externos à membrana e contendo epítomos de células B e T foram mapeadas. As sequências codificadoras para os fragmentos foram combinadas e clonadas no vetor de expressão pAE. A cepa foi transformada por choque térmico e os clones recombinantes cultivados em caldo Luria-Bertani com $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de Ampicilina. Para a inativação da cepa de *E. coli* recombinante, três concentrações de formaldeído, 0,2%, 0,4% e 0,8%, foram utilizadas em tempos de 24 e 48 h. A inativação do DNA plasmidial foi avaliada após extração com *illustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare) através de eletroforese em gel de agarose e posteriormente, usados para transformação de células de *E. coli* eletrocompetentes. A quimera recombinante foi caracterizada com sucesso através de SDS-PAGE e *Western blot* quanto ao reconhecimento por anti-6xHis conjugado a peroxidase (1:5000) e anticorpo policlonal específico à quimera recombinante (1:800) previamente produzido. As membranas foram reveladas usando *Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare). A metodologia usada nesse trabalho realizou com êxito a clonagem e expressão da proteína recombinante, com manutenção dos epítomos nativos. Observou-se que a concentração de 0,8% de formaldeído levou a degradação do antígeno, enquanto a concentração de 0,2% foi insuficiente para inativação celular do lote avaliado. A concentração de 0,4% em 48 h foi escolhida por permitir a inativação celular, por apresentar uma inativação do DNA plasmidial e por conter a proteína de interesse íntegra. Como perspectiva, pretende-se avaliar a capacidade protetora da formulação vacinal.

Palavras chaves: Leptospirose; TBDR; Vacinologia

Agências de Fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico