

EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE QUIMERA COM POTENCIAL IMUNOCONTRACEPTIVO CONTENDO GnRH EM *Escherichia coli*

LÍVIA BUDZIAREK ESLABÃO¹; ALCEU GONÇALVES SANTOS JUNIOR²; ITAUÁ LESTON ARAUJO³; JÉSSICA RODRIGUES ORLANDIN⁴; MATHEUS COSTA DA ROSA²; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE⁵

¹Graduando em Biotecnologia – liviaeslabao@gmail.com

²Pós-graduando em Veterinária – alceugsjr@gmail.com; matheus.costa.rosa@gmail.com

³Pós-graduando em Biotecnologia – itauache@hotmail.com

⁴Graduando em Medicina Veterinária – jessica.orlandin@hotmail.com

⁵Docente do Núcleo de Biotecnologia – fabio_leite@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A utilização de hormônios como antígenos na produção de vacinas imunocontraceptivas vem sendo proposta como uma proeminente alternativa que satisfaz a maioria, senão todas, características de um contraceptivo ideal. Por apresentarem propriedades como a alta especificidade ao alvo de interesse, um longo período de ação, o baixo custo de produção e os poucos efeitos adversos, o desenvolvimento de vacinas imunocontraceptivas é considerado um grande avanço no campo da contracepção (NAZ, 2011).

O Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH) é um decapeptídeo hipotalâmico responsável pelo controle da liberação hipofisária de Hormônio Luteinizante (LH) e de Hormônio Folículo Estimulante (FSH), os quais por sua vez controlam a testosterona e a espermatogênese, em machos, e o estrogênio e o desenvolvimento folicular, em fêmeas. Por controlar as respostas de fertilidade e de comportamento de ambos os sexos e por apresentar uma alta conservação na sua sequência de aminoácidos em todas as espécies de mamíferos, o GnRH é considerado o antígeno alvo ideal para a imunocontracepção (LEVY, 2011).

Entretanto, por ser um antígeno próprio de baixo peso molecular, sua resposta imunogênica é pobre. Essa característica torna necessária a utilização de proteínas estranhas ao organismo e de peso molecular elevado conjugadas com o hormônio (WU *et al*, 2009; LEVY, 2011). A subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB) é uma alternativa válida para a função de molécula carreadora já que é composta por cinco polipeptídeos idênticos (com peso molecular de 11,6 kDa cada), é capaz de modular a resposta do sistema imunológico e é caracterizada como um potente adjuvante de mucosas (HORA *et al*, 2010).

O objetivo do nosso trabalho foi a clonagem e a expressão, em *Escherichia coli*, do Hormônio Liberador de Gonadotrofina fusionado a LTB como molécula carreadora.

2. METODOLOGIA

A quimera foi sintetizada pela empresa Epoch Biolabs, Inc. (USA). Para a clonagem, foram utilizados iniciadores responsáveis pela amplificação da quimera sintética e pelo posterior direcionamento da inserção no plasmídeo pAE, o qual é responsável pela adição de 6 histidinas a proteína expressa.

O produto proveniente da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) e o vetor de expressão foram submetidos ao processo de digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII* (BioLabs). Logo após, a ligação foi realizada

com a enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen). O produto da ligação foi utilizado na transformação da cepa *E. coli* TOP10 e a seleção dos clones recombinantes foi efetuada através da técnica de MicroPrep (SAMBROCK e RUSSEL, 2001).

Os clones foram confirmados pela técnica da PCR e, posteriormente, sequenciados pela empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. O clone 9, contendo a quimera, foi selecionado para a transformação da cepa de expressão *E. coli* BL21 StarTM (DE3). A cepa foi cultivada durante 3 horas a 37 °C na presença de 1mM de IPTG (*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*) para induzir a expressão da proteína recombinante.

O cultivo foi centrifugado e o *pellet* formado foi separado do sobrenadante. Logo após, o *pellet* foi eluído em tampão PBS (*Phosphate Buffered Saline*). Para a desintegração da parede celular, foi adicionada Lisozima (10 mg/ml) com incubação por 1 hora a 4 °C. Posteriormente, foram realizados os processos de lise celular por ultrassom e de centrifugação. O *pellet* resultante foi eluído em tampão contendo 8M de ureia, para desnaturação de proteínas insolúveis, incubado a 4 °C por 24 horas e centrifugado. O sobrenadante contendo a proteína recombinante foi submetido ao processo de diálise e, logo após, foi analisado pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) com concentração de 15%.

A caracterização da quimera foi efetuada através da técnica de *Western Blot*, a qual consiste na eletrotransferência de proteínas a partir do gel de poliacrilamida resultante do SDS-PAGE para uma membrana de nitrocelulose. Após a transferência, foi realizado o bloqueio com leite em pó desnatado, para evitar falsos-positivos resultantes da posterior ligação de anticorpos nos espaços que não foram ocupados pela proteína. A membrana foi dividida em tiras contendo uma amostra proveniente do cultivo e outra proveniente do cultivo de uma cepa não transformada, utilizada como controle negativo. Cada tira de membrana foi submetida à incubação ou com anticorpo monoclonal anti-6xHis (reconhece a cauda composta por 6 histidinas) diluído 1:5000 ou com anticorpo policlonal anti-CT (reconhece a proteína LTB) diluído 1:5000 ou com anticorpo anti-GnRH (proveniente de soro de coelhos imunizados com vacina comercial e capaz de reconhecer o hormônio GnRH) diluído 1:400. Os anticorpos foram retirados, as membranas foram lavadas com PBS-T (*Phosphate Buffered Saline + Tween 20*) e foi realizada uma nova incubação com conjugados anti-anticorpos de camundongos (referente às tiras anteriormente incubadas com anti-6xHis e anti-CT) e anti-anticorpos de coelho (referente à tira anteriormente incubada com anti-GnRH). Uma nova lavagem com PBS-T foi realizada e a etapa de revelação das membranas foi efetuada com diaminobenzidina (DAB) e H₂O₂.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida sugerem a expressão da quimera (Figura 1), apresentando peso molecular de aproximadamente 15 kDa. Além disso, foi possível observar que a expressão da quimera ocorreu antes mesmo da indução com IPTG. Já a técnica de *Western Blot* confirmou a presença da mesma proteína (Figura 2) frente à incubação com anticorpos que reconhecem regiões específicas da quimera.

A partir dos resultados obtidos pela técnica de *Western Blot*, é possível observar que a fusão do GnRH com a LTB não prejudicou a antigenicidade da quimera já que anticorpos específicos (anti-CT e anti-GnRH) foram capazes de reconhecê-la.

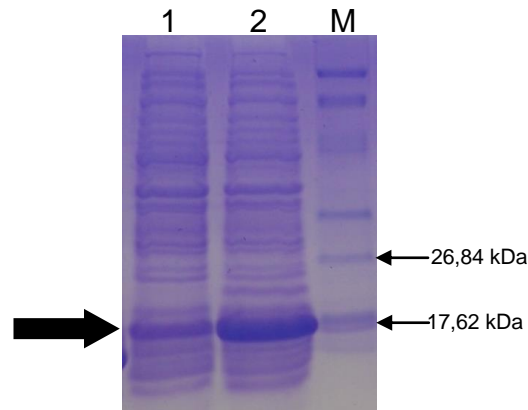


Figura 1 – SDS-PAGE 15% da expressão da quimera. 1) Amostra do cultivo antes da expressão da quimera; 2) Amostra do cultivo após a expressão da quimera; M) Marcador *Prestained SDS-PAGE Standards Low Range* (Bio-Rad).

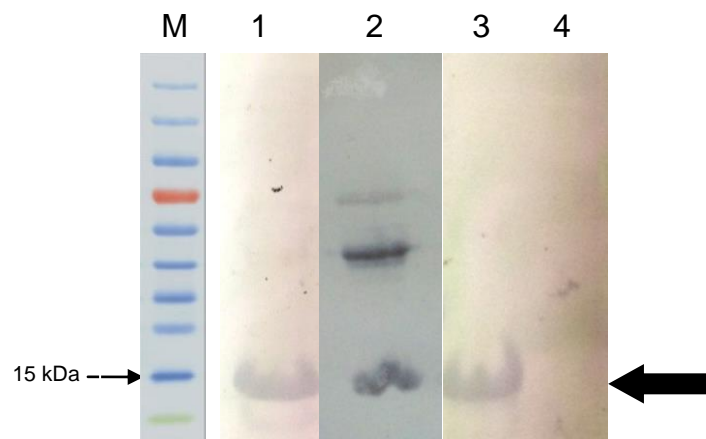


Figura 2 – *Western Blot* da expressão da quimera. M) Marcador *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific); 1) Quimera contendo o GnRH – reação com anti-CT; 2) Quimera contendo o GnRH – reação com anti-GnRH; 3) Quimera contendo o GnRH – reação com anti-6xHis; 4) Controle negativo – cepa selvagem de *E. coli* BL21 StarTM (DE3).

4. CONCLUSÕES

A partir do presente trabalho, conclui-se que através das metodologias utilizadas foi possível clonar e expressar em quantidades desejáveis a quimera contendo o gene do GnRH, além de demonstrar que sua associação a outra molécula não comprometeu sua antigenicidade. No entanto são necessários testes em modelos biológicos para verificar se sua atividade anticoncepcional não foi prejudicada pela fusão.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HORA, V.P.; CONCEIÇÃO, F.R.; DELLAGOSTIN, O.A.; DOOLAN, D.L. Non-toxic derivatives of LT as potent adjuvants. **Vaccine**, v.29, p.1538-1544, 2011.

LEVY, J.K. Contraceptive vaccines for the humane control of community cat populations. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.66, p.63-70, 2011.

NAZ, R.K. Contraceptives Vaccines: Success, Status, and Future Perspective. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.66, p.2-4, 2011.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: A laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

WU, X.; FRANKA, R.; SVOBODA, P.; POHL, J.; RUPPRECHT, C.E. Development of combined vaccines for rabies and immunocontraception. **Vaccine**, v.27, p.7202-7209, 2009.