

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOPROTECTOR DA PROTEÍNA LIC11966 COMO VACINA DE SUBUNIDADE RECOMBINANTE CONTRA LEPTOSPIROSE

GUILHERME ROIG PUREZA INDA^{1,2}; THAÍS LARRÉ OLIVEIRA¹; RODRIGO ANDRADE SCHUCH¹; DAIANE DRAWANZ HARTWIG^{1,2}

¹Laboratório de Vacinologia - Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil – guilhermeinda@hotmail.com

²Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil – daianehartwig@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. Os seres humanos e os animais domésticos são mais comumente infectados através do contato direto com a urina de animais portadores, ou através do contato com água e solo contaminado (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). As pesquisas para desenvolvimento de novas vacinas contra a leptospirose justificam-se devido ao fato de que as vacinas atuais (preparações de células inteiras inativadas - bacterinas) apresentam diversos problemas: são reatogênicas, induzem imunidade de curta duração e sorovar-específica (DELLAGOSTIN et al., 2011). Uma possível forma de contornar esses problemas seria a utilização de vacinas recombinantes de subunidade utilizando antígenos conservados em diferentes sorovares da bactéria (WANG et al., 2007).

No entanto, por serem altamente purificadas, as vacinas recombinantes de subunidade normalmente possuem baixa imunogenicidade. Assim, a utilização de adjuvantes é uma alternativa para potencializar a resposta imune (PASQUALE et al., 2015). Já foram desenvolvidos diversos trabalhos buscando uma vacina recombinante promissora contra leptospirose, nos quais diferentes antígenos e adjuvantes foram avaliados bem como diferentes formas de apresentação do antígeno. Porém, ainda não foram obtidos resultados indicando uma proteção total e esterilizante, justificando a necessidade de avaliar novos alvos, formulações e estratégias vacinais.

Addavax™ é um adjuvante comercial baseado em uma nanoemulsão de óleo em água (MF59). Este adjuvante atua através de um efeito de depósito, do aumento do antígeno no local da injeção, do recrutamento e ativação de células apresentadoras de antígeno, bem como através da indução direta de citocinas e quimiocinas (MBOW et al., 2010).

A LIC11966 é uma proteína de *Leptospira interrogans* até então não avaliada quanto ao seu potencial imunoprotetor. Este antígeno é uma lipoproteína que possui sequência muito similar a fatores de virulência encontrados em outros patógenos (ESHGHI et al., 2009). Além disso, também foi descrita a presença do gene *lic11966* em diferentes espécies patogênicas de *Leptospira*, estando ausente em uma espécie saprófita, o que sugere que essa proteína tenha importância no processo de infecção e potencial para ser utilizada como antígeno vacinal (LUCAS et al., 2010).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a proteína recombinante LIC11966 em uma formulação contendo o adjuvante Addavax™ como vacina de subunidade contra leptospirose em hamsters.

2. METODOLOGIA

A cepa de expressão *E. coli* BL21 StarTM (DE3) foi transformada por choque térmico com o vetor pAE/lic11966 e cultivada em meio Luria-Bertani. A expressão da proteína foi induzida com 1mM IPTG e a purificação foi realizada em condições desnaturantes através de cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sefarose. Após, rLIC11966 foi dialisada contra tampão contendo concentrações decrescentes de uréia e quantificada pelo kit BCATM Protein Assay (Pierce), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Através de *Western blot* (WB), rLIC11966 foi caracterizada com anticorpo monoclonal (MAb) anti-6xHis (Sigma) (1:6000), seguido da adição de anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma) (1:6000). A reação foi revelada com diaminobenzidina (DAB) e H₂O₂.

Para os ensaios de imunoproteção, grupos de 8 hamsters, com 4-6 semanas de idade, foram imunizados via intramuscular com duas doses vacinais, obedecendo um intervalo de 14 dias, da seguinte forma: rLIC11966-AddavaxTM (80 µg) e salina-Addavax, na proporção de 1:1 de antígeno:adjuvante. Um grupo com 4 animais, imunizado com bacterina, foi utilizado como controle positivo. Vinte e oito dias após a primeira dose, os animais foram desafiados intraperitonealmente com 5 x DL₅₀ de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1130. Os animais foram acompanhados diariamente quanto à morbidade e mortalidade, e os animais sobreviventes foram eutanasiados 30 dias após o desafio. Amostras de sangue foram coletadas pelo plexo retro-orbital nos dias 0 (pré-imune), 14 e 28 e o soro foi congelado à -20 °C. Estes experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPEL (CEEA) sob o nº 6255. Para as análises estatísticas, os resultados de sobrevivência foram avaliados por teste de LogRank, e os resultados de mortalidade pelo teste de Fischer, considerando significativas as diferenças com *p*<0,05.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proteína rLIC11966 foi expressa na forma insolúvel por *E. coli* BL21 StarTM (DE3) e apresentou o tamanho esperado de 13 kDa. O protocolo de purificação, bem como de solubilização da proteína em uréia foi eficiente e o rendimento obtido foi de 25,5 mg.L⁻¹. A caracterização da proteína por WB resultou no reconhecimento de rLIC11966 no tamanho esperado de 13 kDa pelo anticorpo anti-6xHis (Fig. 1). A proteína rOmpL37 utilizada como controle positivo também foi reconhecida na reação.

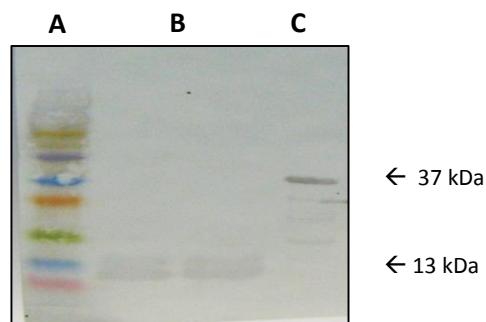


Figura 1: Caracterização de rLIC11966 através de *Western blot* (WB) com anticorpo monoclonal anti-histidina. (A) Marcador de massa molecular BenchMark™ Pre-stained (Invitrogen); (B) rLIC11966; (C) rOmpL37 utilizada como controle positivo.

A avaliação da vacina de subunidade recombinante LIC11966 em hamsters demonstrou que esta proteína em formulação com o adjuvante Addavax™ induziu proteção significativa contra leptospirose ($p<0,05$), em comparação ao grupo controle negativo. No grupo controle Addavax + Salina, todos os animais vieram a óbito após 12 dias do desafio, enquanto o grupo rLIC11966+Addavax apresentou sobrevivência de 62,5% dos animais vacinados até o final do experimento (Fig. 2). O grupo controle positivo (bacterina) apresentou 100% de sobrevivência.

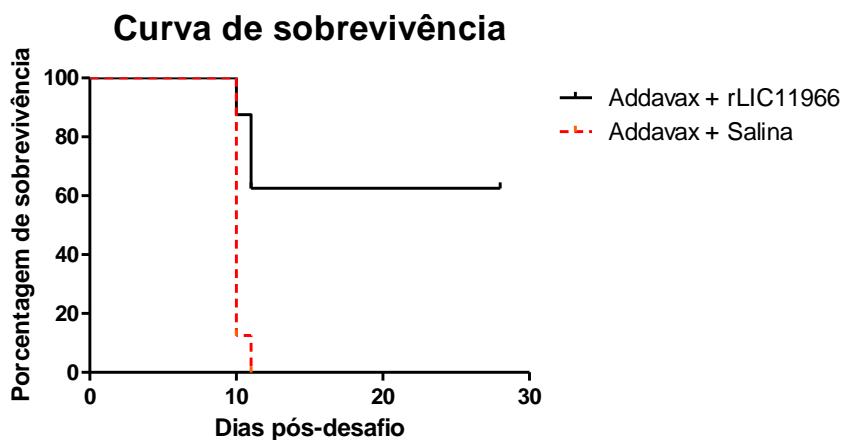


Figura 2: Curva de sobrevivência dos hamsters imunizados com rLIC11966 e desafiados com cepa virulenta de *L. interrogans*. As análises estatísticas foram realizadas por teste LogRank e teste de Fischer utilizando o software Graphpad Prism 4.

4. CONCLUSÕES

A estratégia adotada para a purificação da proteína foi eficaz, sendo esta obtida na forma insolúvel, e com rendimento suficiente para realização dos ensaios de imunoproteção. O antígeno recombinante LIC11966 se mostrou promissor como candidato vacinal, quando acrescido do adjuvante Addavax™. Outros experimentos serão realizados para avaliar a resposta imune induzida pela vacina, bem como a reproduzibilidade destes resultados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, B. e DE LA PENA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, Australia, v.140, n.3-4, p. 287-96, 2010.
- DELLAGOSTIN, O.A.; GRASSMANN, A.A.; HARTWIG, D.D.; FELIX, S.R.; DA SILVA, E.F. e MCBRIDE, A.J.A. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Human Vaccines**, Brasil, v.7, n.11, p. 1215-24, 2011.
- ESHGHI, A.; CULLEN, P.A.; COWEN, L.; ZUERNER, R.L. e CAMERON, C.E. Global Proteome Analysis of *Leptospira interrogans*. **Journal of proteome research**, Canada, v.8, p.4564-78, 2009.
- LUCAS, C.; FAGUNDES, M.; HARTLEBEN, C.; DELLAGOSTIN, O.; COLLARES, T. e SEIXAS, F. Análise da presença dos genes *lic11966*, *lic13166* e *lic12575* em

diferentes espécies de *Leptospira* spp. In: **XIX CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA UFPEL**, Pelotas, 2010.

MBOW, M.L.; DE GREGORIO, E.; VALIANTE, N.M. e RAPPOLI, R. New adjuvants for human vaccines. **Current Opinion Immunology**, Estados Unidos, v.22, p.411-6, 2010.

PASQUALE, A.D.; PREISS, S.; DA SILVA, F.T. e GARÇON, N. Vaccine adjuvants: from 1920 to 2015 and beyond. **Vaccines**, Belgium, v.3, p.320-343, 2015.

UFPEL. **Addavax**. Acessado em 7 jul. 2015. Online. Disponível em: <http://www.invivogen.com/PDF/AddaVax.pdf>

WANG, Z.; JIN, L. e WEGRZYN, A. Leptospirosis vaccines. **Microbial Cell Factories**, Reino Unido, v.6, p. 1-10, 2007.