

VACINAÇÃO COM DUAS NOVAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES CONFERE IMUNIDADE PROTETORA EM HAMSTERS CONTRA LEPTOSPIROSE LETA

PAULA SOARES PACHECO¹, TANISE PACHECO FORTES², CAROLINE DEWES², GILMAR BATISTA MACHADO², SAMUEL RODRIGUES FÉLIX³, ÉVERTON FAGONDE DA SILVA⁴

¹Graduanda em Medicina Veterinária da UFPel – paulaa_pacheco@hotmail.com

²Doutora em veterinária – tanisefortes@gmail.com

²Pós-graduanda do Programa de Pós-graduação em Veterinária da UFPel – carolinedewesvet@hotmail.com

²Pós-graduando do Programa de Pós-graduação em Veterinária da UFPel – gilmarmachado84@hotmail.com

³PNPD do Programa de Pós-graduação em Veterinária da UFPel – samuelrf@gmail.com

⁴Professor da Faculdade de Veterinária da UFPel – fagondee@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*, sendo a mais difundida mundialmente. Roedores sinantrópicos albergam as leptospiras nos rins, o que propicia a contaminação ambiental, pois as eliminam viáveis pela urina (ADLER; MOCTEZUMA, 2010). Em países de clima tropical a incidência da enfermidade é alta, podendo ser encontrada tanto em ambientes rurais quanto urbanos (REIS et al., 2008). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2016 estimou-se um milhão de novas infecções em todo o mundo, acarretando aproximadamente 59 mil mortes.

A estratégia mais promissora para o combate à leptospirose é a vacinação, visto que a erradicação de roedores sinantrópicos é inviável principalmente em centros urbanos, fazendo-se necessário o desenvolvimento de uma vacina efetiva (SILVA, L. P. 2016). As vacinas atualmente disponíveis são bacterinas que induzem resposta humoral predominantemente contra o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, o que não fornece proteção cruzada contra os diferentes sorovares da bactéria devido à alta variação do LPS, além da possibilidade de causar efeitos colaterais (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; ZENG et al., 2015). Devido a esse fator, nos últimos anos as proteínas da membrana externa (OMPs), lipoproteínas e as *Leptospiral immunoglobulin-like proteins* (Ligs) vêm sendo avaliadas em modelo animal como candidatos vacinais, resultando em estratégias promissoras para a prevenção da leptospirose (SILVA et al., 2007). No presente estudo, duas proteínas recombinantes foram emulsificadas em adjuvante oleoso e testadas em modelo animal com o objetivo de avaliar sua capacidade de proteção em hamsters submetidos ao desafio letal homólogo com leptospiras virulentas.

2. METODOLOGIA

Neste estudo utilizou-se *Leptospira interrogans* sorovar *Copenhageni* cepa Fiocruz L1-130 para extração de DNA e nos ensaios de desafio. Para a extração do DNA utilizou-se kit comercial, conforme as recomendações do fabricante *illustra™ bacteriagenomicPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare®). Para clonagem e expressão heteróloga cepas de *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen®) e *E. coli* BL21 Star (DE3) (ThermoFisher®).

Utilizando informação do GenBank, selecionou-se as sequências codificadoras para proteínas LIC11889 e LIC10666, relacionadas a processos patogênicos da bactéria e até então não avaliadas quanto a imunoproteção. Para

desenhar os primers foi utilizado o software Vector NTI11 e sítios para enzimas de restrição foram adicionados nas extremidades das sequências, permitindo a clonagem no vetor pAE, foram eles:

LIC11889-F 5'-ACCATGGTTATCAATCACAAACCTGAGTGC;
LIC11889-R 5'-TTAGATCTGCTGCCAGAAGCTT;
LIC10666-F5'- CGGGATCCCGCCGTAAAATTCTGG;
LIC10666-R 5'-GGGAAGCTTTAATTTCCTGATTGATCT.

Os produtos da PCR foram então克lonados no plasmídeo pAE para expressão das proteínas recombinantes. As cepas transformadas de *E. coli* BL21 Star (DE3) foram cultivadas em meio LB com ampicilina a 37°C até alcançarem a fase log de crescimento. A expressão dos genes foi induzida com isopropil β-D-tiogalactopiranósideo (IPTG). Após 3 horas, centrifugou-se as culturas a 6.000 x g por 30 minutos a 4°C, descartando o sobrenadante. Os sedimentos foram suspensos em tampão de purificação com ureia, rompidos por sonicação e centrifugados a 10.000 x g por 30 minutos em temperatura de 4°C. O sobrenadante foi filtrado e as proteínas foram purificadas em coluna de sefarese carregada com níquel, e dialisadas a 4°C com tampão fosfato alcalino (PBS) contendo concentrações decrescentes de ureia. As proteínas foram quantificadas utilizando o kit BCA ProteinAssay (PIERCE®) e albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

Para o ensaio de imunoproteção as proteínas purificadas foram emulsificadas em adjuvante oleoso. As doses foram de 50µg de proteína (individualmente), ou 25µg de cada e o volume final ajustado para 300µL (com adjuvante). Trinta e seis hamsters (*Mesocricetus auratus*) fêmeas de 4 semanas de idade foram divididos em 6 grupos, cada grupo contendo 6 animais, estes foram vacinados com as preparações descritas acima, um controle negativo foi vacinado apenas com PBS, um controle positivo foi vacinado com bacterina homóloga à cepa de desafio e um grupo testemunha foi recebido apenas adjuvante oleoso (Tabela 1). Foram realizadas duas doses com intervalo de 2 semanas entre cada uma, no 28º desafiou-se os animais pela via intraperitoneal, com 1000 leptospiras da cepa homóloga Fiocruz L1-130, referente a 20 vezes a DL50% (Silva et al., 2007).

O resultados do ensaio de proteção foram expressos em “dias para óbito”, e apresentados em uma curva de sobrevida, as curvas foram então comparadas através do ensaio de LogRank. O número de sobreviventes em cada grupo foi comparado através de um teste de Fischer. Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da UFPel (CEEA – 5237).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proteção conferida pelas emulsões das proteínas com adjuvante oleoso e pela bacterina apresentaram significância estatística ($p=0,0022$), resultados completos podem ser vistos na tabela 1. As curvas de sobrevida podem ser vistas na figura 1. A comparação das mesmas por ensaio de LogRank revelou diferença estatística entre os animais que receberam as vacinas recombinantes e bacterinas ($p=0,0162$), quando comparados ao grupo controle (figura 1).

Tabela 1. Grupos experimentais e percentual de proteção conferido 21 dias após o desafio.

| Grupos Vacinais Ajustado para 300 μl | Doses Aplicadas aos 0 e 14 dias | Proteção (%) 21 dias após o desafio ^a |
|--------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| PBS | 300 μl | 0 |
| Bacterina | 10 ⁸ células | 100 |
| Oleoso | 150μl + 50% Adj. ^b | 0 |
| rLIC11889 | 50μg + 50% Adj. ^b | 100 |
| rLIC10666 | 50μg + 50% Adj. ^b | 100 |
| rLIC11889+rLIC1 0666 | 25μg cada + 50% Adj. ^b | 100 |

^a O desafio ocorreu aos 28 dias de ensaio. ^b Adjuvante oleoso.

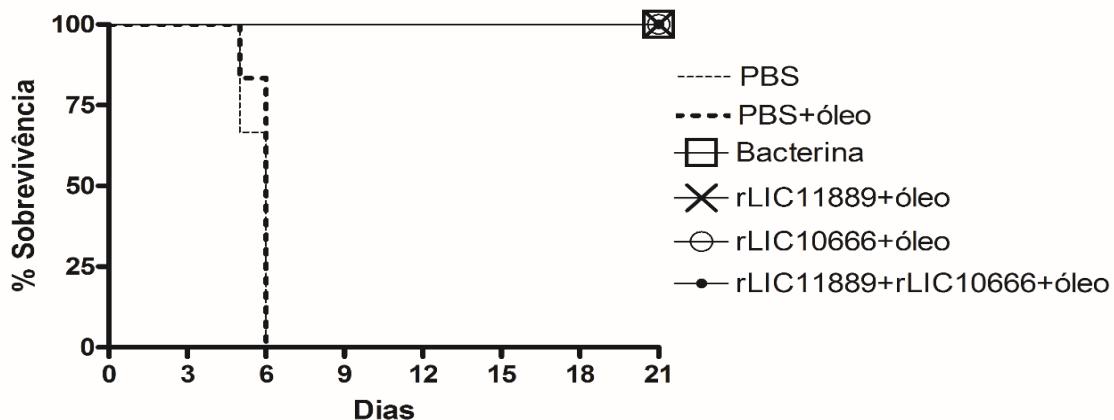


Figura 1. Curvas de sobrevivência dos hamsters imunizados com as proteínas recombinantes e os controles após o desafio com a cepa homóloga virulenta.

Apesar de ensaios de desafio serem custosos, estes representam a forma mais segura de avaliar a proteção conferida por alvos vacinais (GRASSMANN et al., 2017). Neste tipo de ensaio, raros são os alvos que conferem 100% de proteção, como o observado neste estudo. O uso de adjuvante oleoso pode ter sido um diferencial, visto que muitos estudos usam o hidróxido de alumínio (DELLAGOSTIN et al., 2011), um adjuvante menos potente, mas com uso liberado em humanos. Entretanto, a aplicação mais frequente das vacinas contra leptospirose é em animais, portanto não há motivos para não usar adjuvante oleoso, particularmente na fase de desenvolvimento.

Apesar de o mecanismo de proteção na leptospirose não ser completamente conhecido, estudos têm demonstrado a contribuição das respostas imune humoral e celular contra a doença; compreender a resposta imunitária envolvida é um degrau importante para o desenvolvimento de vacinas contra a leptospirose (LUCAS et al., 2011). Nesse estudo, as proteínas recombinantes administradas com adjuvante oleoso forneceram proteção imunológica aos animais vacinados contra o desafio letal homólogo. Assim, ensaios futuros devem avaliar o tipo de resposta imune gerada, com possível tipagem de anticorpos. Estes ensaios podem também usar outros adjuvantes, para avaliar a possibilidade do uso destes抗ígenos em vacinas para humanos.

4. CONCLUSÕES

Nas condições deste estudo, a emulsão das proteínas recombinantes rLIC11889 e rLIC10666, junto ao adjuvante oleoso forneceu proteção imune em todos os animais vacinados contra o desafio homólogo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, B., MOCTEZUMA, A. P. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary microbiology**, v.140, p.287-296, 2010.

REIS, R. B., RIBEIRO, G. S., FELZEMBURGH, R. D. M., SANTANA, F. S., MOHR, S., MELENDEZ, A. X. T. O., QUEIROZ, A., SANTOS, A. C., RAVINES, R. R., TASSINARI, W. S., CARVALHO, M. S., REIS, M. G., KO, A. I. Impact of Environment and Social Gradient on Leptospira Infection in Urban Slums. 2008. www.plosntds.org

SILVA, L. P. Clonagem, expressão e caracterização de prováveis proteínas de membrana identificadas no genoma de *Leptospira interrogans*. 2016, p.17-79, Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas.

ZENG, L., ZHUANG, X., HUANG, L., ZHANG, Y., CHEN, C., DONG, K., ZHANG, Y., CUI, Z., DING, X., CHANG, Y., GUO, X., ZHU, Y. Comparative subproteome analysis of three representative *Leptospira interrogans* vaccine strains reveals cross-reactive antigens and novel virulence determinants. **ScienceDirect**, v.112, p.27-37, 2015.

SILVA, E. F., MEDEIROS, M. A., MCBRIDE, A. J. A., MATSUNAGA, J., ESTEVES, G. S., RAMOS, J. G. R., SANTOS, C. S., CRODA, J., HOMMA, A., DELLAGOSTIN, O. A., HAAKE, D. A., REIS, M. G., KO, A. I. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **ScienceDirect**, v.25, p.6277-6286, 2007.

GRASSMANN, F., HEID, I. M., WEBER, B. H. F., and International AMD Genomics Consortium. Recombinant Haplotypes Narrow the ARMS2/HTRA1 Association Signal for Age-Related Macular Degeneration. **Genetics**, v.205, p.919-924, 2017.

DELLAGOSTIN, O. A., GRASSMAN, A. A., HARTWIG, D. D., FÉLIX, S. R., SILVA, E. F., MCBRIDE, A. J. A. Recombinant vaccines against Leptospirosis. **Human vaccines**, v.7, p.1215-1224, 2011.

LUCAS, D. S. D., CULLEN, P. A., LO, M., SRIKRAM, A., SERMSWAN, R. W., ADLER, B. Recombinant LipL32 and LigA from *Leptospira* are unable to stimulate protective immunity against leptospirosis in the hamster model. **Vaccine**, p.3413-3418, 2011.