

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOPROTETOR DE VACINAS VETORIZADAS POR *Mycobacterium bovis* BCG EXPRESSANDO ANTÍGENOS LEPTOSPIRAIS

ANDRIELE BONEMANN MADRUGA¹; JESSICA DORNELES²; AMILTON SEIXAS NETO²; ODIR ANTÔNIO DELLAGOSTIN²; THAIS LARRÉ OLIVEIRA³

¹Núcleo de Biotecnologia - Centro de Desenvolvimento Tecnológico-Universidade Federal de Pelotas
dri.bonemannmadruga@gmail.com

²Núcleo de Biotecnologia - Centro de Desenvolvimento Tecnológico Universidade Federal de Pelotas
jessicadornelesrs@gmail.com

²Núcleo de Biotecnologia - Centro de Desenvolvimento Tecnológico Universidade Federal de Pelotas
amiltonseixas@gmail.com

²Núcleo de Biotecnologia - Centro de Desenvolvimento Tecnológico Universidade Federal de Pelotas
odir@ufpel.edu.br

³Núcleo de Biotecnologia - Centro de Desenvolvimento Tecnológico-Universidade Federal de Pelotas
thais.larreoliveira@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença zoonótica de importância mundial causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. A infecção se dá através do contato direto com o ambiente (água e solo) contaminado com urina de animais carreadores da doença (ADLER et al., 2010). Sendo assim, a doença está diretamente relacionada a fatores ocupacionais como agricultura e pecuária, atividades recreativas, bem como a fatores de risco habitacionais como exposições recorrentes a áreas sem saneamento, pobreza e falta de recursos como comumente ocorre em países subdesenvolvidos como o Brasil (GOARANT, 2016). O método atual de controle da leptospirose animal se dá através da vacinação com bacterinas (bactérias inativadas), porém este método apresenta algumas limitações, pois conferem proteção de curta duração e apenas contra um limitado número de sorovares (DELLAGOSTIN, et al., 2011).

Mycobacterium bovis BCG é uma vacina viva atenuada com grande potencial para ser utilizada como vetor vacinal, por apresentar diversas vantagens como baixo custo de produção, estabilidade, segurança, propriedades adjuvantes e indução de imunidade humoral e celular a longo prazo (MATSUO; YASUTOMI, 2011). Além disso, estudos já comprovaram que o BCG possui a capacidade de expressar diversos antígenos heterólogos incluindo de leptospiros (BASTOS et. al, 2009; OLIVEIRA et. al, 2019).

Proteínas que encontram-se ancoradas à membrana externa de leptospiros patogênicas e as que são super expressas no momento da infecção, demonstram ser promissoras como alvos vacinais, e dentre elas estão LemA, LigAni e LipL32, cujos estudos relatam sua capacidade de conferir proteção em hamsters (SEIXAS et al., 2007, SILVA et al., 2007, HARTWIG et al., 2013). Entretanto, vacinas recombinantes produzidas com cada proteína individualmente, não impedem a colonização renal dos animais infectados, mantendo-os assim como disseminadores da bactéria no ambiente. A utilização do BCG como vetor vacinal e/ou o emprego de antígenos quiméricos representam alternativas promissoras para melhorar a eficácia vacinal em comparação à utilização dos antígenos isolados (OLIVEIRA et. al, 2019). Portanto, o objetivo do presente trabalho foi utilizar as proteínas LemA, LigAni, LipL32 e as combinações LipL32:LemA e LemA:LigAni como antígenos e avaliá-las como vacinas vetorizadas por *Mycobacterium bovis* BCG contra a leptospirose.

2. METODOLOGIA

As sequências que codificam os antígenos LemA, LigAni, LipL32, e as combinações LipL32:LemA e LemA:LigAni foram previamente clonadas no plasmídeo pUP500/pAN. Os plasmídeos recombinantes foram, então, inseridos em *M. bovis* BCG (Pasteur) através da técnica de eletroporação. As células transformadas foram então plaqueadas em meio 7H10 suplementado com Oleic Acid Albumin Dextrose Complex 10% (OADC) e 25 µg.mL⁻¹ de canamicina, e incubadas à 37 °C por 21 dias, até as colônias ficarem visíveis.

Em seguida, as colônias formadas foram cultivadas em meio líquido seletivo 7H9 Middlebrook (Difco) suplementado com OADC, canamicina, Tween 80% e incubadas no shaker à 37 °C por 5 dias. Após, os cultivos foram expandidos para garrafas de cultivo celular e incubados em estufa à 37 °C por mais 7 dias. Para análise da expressão das proteínas leptospirais, alíquotas do cultivo celular foram centrifugadas, o pellet foi ressuscitado com 1 mL de tampão Tris HCl 100 mM pH 7,8 e as células foram rompidas por sonicação. Em seguida, realizou-se Western blot, onde os extratos celulares foram submetidos a separação por SDS-PAGE 12% e eletrotransferidos para membrana de nitrocelulose. A detecção das proteínas foi realizada utilizando anticorpos primários: anti-LipL32, anti-LigAni, anti-quimera recombinante, anti-LemA, e anticorpos secundários anti-espécie específica conjugado com peroxidase, anti-IgG de hamster e anti-IgG de camundongo. As incubações com os anticorpos foram realizadas por 1 h e intercaladas com etapas de lavagem com PBST. As reações foram reveladas por quimioluminescência usando o substrato Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare).

Depois de detectada a expressão das proteínas pelas cepas recombinantes de BCG (rBCG), foi feito o preparo das vacinas utilizando a concentração de 10⁶ UFC por dose. Para isso, 1 mL de cada cultivo foi centrifugado por 15 min a 4.000 rpm e o pellet foi ressuscitado em 10 mL de PBS 1X estéril. Os hamsters foram segregados em 7 grupos de 10 animais cada para imunização com as cepas vacinais de rBCG e BCG Pasteur (controle negativo). Os grupos foram imunizados com 100 µL pela via subcutânea nos dias 0 e 21. O grupo controle positivo contendo 4 animais recebeu a vacina bacterina (10⁹ células de *L. Interrogans* sorovar Copenhageni cepa L1-130). Cinquenta e um dias após a primeira dose, os animais foram desafiados com 5 x DL50 de *L. Interrogans* sorovar Copenhageni cepa L1-130. Os animais foram monitorados diariamente para sinais clínicos de leptospirose. Dentre os critérios de avaliação estava a perda de 10% do peso máximo, prostração, pelo eriçado, apatia e falta de apetite. Os animais apresentando estes sinais foram eutanasiados conforme normas e regulamentos do Comitê de Ética em Experimentação Animal (projeto aprovado sob nº 4646), os demais animais sobreviventes foram eutanasiados aos 30 dias após o desafio e foi realizada a coleta de rins para avaliar a proteção contra colonização renal através de cultura em meio EMJH (Difco).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após cultivo das cepas de rBCG e lise celular por sonicação, foi possível detectar a expressão das proteínas recombinantes através de Western blot no tamanho esperado. A expressão da proteína LemA não foi detectada, o que pode ser atribuído aos seus baixos níveis de expressão ou ao tamanho da proteína (17 kDa), e por isso essa construção não foi usada nos ensaios de imunização.

Nenhuma expressão foi detectada no extrato celular da cepa BCG Pasteur não transformada (Figura 1).

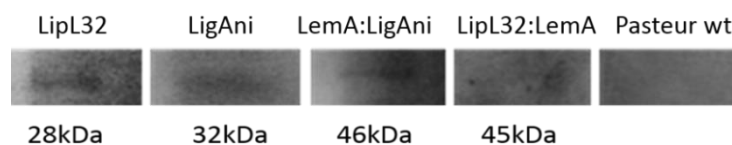


Figura 1. Avaliação da expressão dos antígenos recombinantes em *M. bovis* BCG através de Western blot. LipL32, pAb anti-LipL32 e anti-IgG de camundongo; LigAni, pAb anti-LigAni e anti-IgG de hamster; LemA:LigAni, pAb anti-quimera recombinante e anti-IgG de camundongo; LipL32:LemA, pAb anti-LemA e anti-IgG de hamster; Pasteur wt, BCG não transformado (controle negativo).

Os animais vacinados apresentaram pequena variação do peso em relação ao peso inicial, exceto para o grupo Pasteur (controle negativo) que após o desafio apresentou os sinais clínicos da doença e obteve uma grande perda de peso até o óbito (Figura 2).

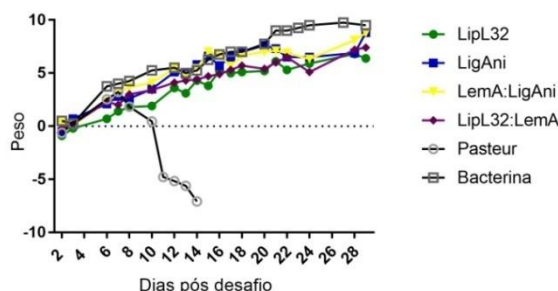


Figura 2. Gráfico do acompanhamento diário do peso dos animais vacinados e do grupo controle negativo (Pasteur) após o desafio.

Os animais dos grupos vacinados obtiveram 100% de proteção contra a leptospirose demonstrando a eficácia das vacinas, enquanto no grupo controle negativo nenhum animal sobreviveu ao desafio (Figura 3 e Tabela 1). Os animais sobreviventes foram negativos para a cultura renal, sugerindo que as vacinas também protegeram contra colonização renal pela bactéria (Tabela 1).

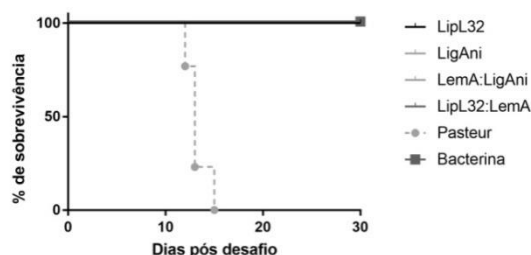


Figura 3. Avaliação da taxa de sobrevivência após o desafio com 5x DL50 de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa L1-130.

Tabela 1. Proteção conferida por diferentes vacinas baseadas em rBCG contra desafio letal em hamster.

Imunógeno	% Proteção (sobreviventes/total)	P value	Cultura Renal (positivo/sobreviventes)
rBCG (pUP500/P _{pAN} :LipL32)	100 (10/10)	<0.0001	0/10
rBCG (pUP500/P _{pAN} :LigAni)	100 (10/10)	<0.0001	0/10
rBCG (pUP500/P _{pAN} :LemA:LigAni)	100 (10/10)	<0.0001	0/10

rBCG (pUP500/P _{pAN} :LipL32:LemA)	100 (10/10)	<0.0001	0/10
Bacterina (controlepositivo)	100 (4/4)	0.0010	0/4
BCG Pasteur (controle negativo)	0 (0/10)	-	-

4. CONCLUSÕES

A utilização do *M. bovis* BCG mostrou-se eficaz na expressão das proteínas leptospirais LigAni, LipL32 e as combinações LipL32:LemA e LemA:LigAni. Os antígenos sendo expressos *in vivo* também se mostraram eficazes contra leptospirose conferindo 100% de proteção, evitando os sinais clínicos e o óbito. Futuramente serão realizados testes de ELISA, para avaliar a resposta imune, a fim de detectar a produção de anticorpos contra estes antígenos e a técnica de PCR em tempo real, para verificar a possível ausência de leptospiras nos rins e confirmar os resultados obtidos através da cultura renal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, B., DE LA PENA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 287-296, 2010.

DELLAGOSTIN, O.A.; GRASSMANN, A.A.; HARTWIG, D.D.; FELIX, S.R.; DA SILVA, E.F.; MCBRIDE, A.J.A. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Human vaccines**, v. 7, p. 1215-1224, 2011.

GOARANT, C. Leptospirosis: risk factors and management challenges in developing countries. **Tropical Medicine**, v.7, p. 49-62, 2016.

HARTWIG, D.D.; FORSTER, K.M.; OLIVEIRA, T.L.; AMARAL, M.; MCBRIDE, A.J.A.; DELLAGOSTIN, O.A. A prime-boost strategy using the novel vaccine candidate, LemA, protects hamsters against leptospirosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, p.747-752, 2013.

SEIXAS, F.K.; DA SILVA, E.F.; HARTWIG, D.D.; CERQUEIRA, G.M.; AMARAL, M.; FAGUNDES, M.Q.; DOSSA, R.G.; DELLAGOSTIN, O.A. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. **Vaccine**, v. 26, p.88-95, 2007.

SILVA, E.F.; MEDEIROS, M.A.; MCBRIDE, A.J.A.; MATSUNAGA, J.; ESTEVES, G.S.; RAMOS, J.G.; 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. **Vaccine**, v. 25, p. 6277-6286, 2007.

MATSUO, K.; YASUTOMI, Y. *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin as a Vaccine Vector for Global Infectious Disease Control. **Tuberculosis Research and Treatment**, v. 2011, p. 9, 2011.

OLIVEIRA, T; RIZZI, C; CUNHA, C. E. P; DORNELES, J; NETO, A. C. P. S; AMARAL, M. G; HARTWIG, D. D; DELLAGOSTIN, O. D. Recombinant BCG strains expressing chimeric proteins derived from *Leptospira* protect hamsters against leptospirosis. **Elsevier**, v., p.776-782, 2019.