

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE PROTETORA DE VACINA RECOMBINANTE VETORIZADA POR *Mycobacterium bovis* BCG CONTRA LEPTOSPIROSE

AMANDA SILVA HECKTHEUER¹; EVERTON BETTIN²; JESSICA DORNELES³
AMILTON CLAIR SEIXAS⁴; ODIR ANTÔNIO DELLAGOSTIN⁵ E THAÍS LARRÉ
OLIVEIRA⁶

¹ Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – amandasheck@hotmail.com

² Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – tombbettin@gmail.com

³ Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – jeehdorneles@hotmail.com

⁴ Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – amiltonseixas@gmail.com

⁵ Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – odirad@gmail.com

⁶ Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – thais.larreoliveira@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é a principal zoonose em termos de morbidade e mortalidade no mundo, tendo 1,03 milhões de casos com 58.900 mortes confirmadas anualmente (COSTA *et al.*, 2015). A doença é causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* (ADLER, 2015) e a infecção ocorre pela exposição direta à urina de animais carreadores da bactéria, ou indireta pelo contato com água, solo ou alimentos contaminados (LEVETT, 2015).

A vacinação é um dos métodos mais indicados e eficazes na prevenção de doenças infecciosas (DELLAGOSTIN *et al.*, 2011). Porém, a formulação comercial disponível contra leptospirose, constituída pela bactéria inativada, apresenta uma série de efeitos colaterais locais e sistêmicos. Outras limitações incluem a indução de imunidade de curta duração e a proteção apenas contra os sorovares presentes na sua formulação (ADLER, 2015; ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

Uma das abordagens mais inovadoras no estudo de vacinas de nova geração é a vacinologia estrutural. Esta estratégia considera a estrutura tridimensional da proteína, permitindo a identificação de epítomos imunodominantes expostos e a união destes em uma única molécula, promovendo a indução de uma resposta imune mais ampla (DELANY *et al.*, 2013). Dentre as proteínas preditas como promissoras alvos vacinais, as proteínas dependentes de Ton-B (TBDR) se destacam por já terem sido avaliadas em formulações vacinais contra diferentes patógenos. As proteínas TBDR desempenham funções vitais ao patógeno dentre eles o transporte de nutrientes, compostos férricos e vitaminas (STORK *et al.*, 2010, HU *et al.*, 2012).

Além disso, vacinas recombinantes vetorizadas se mostram alternativas promissoras. Dentre elas, destaca-se o uso do Bacilo *Calmette-Guérin* (BCG) recombinante, uma vacina atenuada por Albert Calmette e Camille Guérin no início do século XX no Instituto Pasteur da França (CALMETTE *et al.*, 1927). Atualmente, BCG é a única vacina disponível para prevenção da tuberculose (TB), sendo a vacina mais utilizada no mundo (ROWLAND & MCSHANE, 2011). Fatores como o baixo custo de produção, fácil administração e uma boa estabilidade térmica (STOVER *et al.*, 1991), fazem o BCG um bom candidato para vetor vacinal. Além disso, o uso de BCG recombinante expressando antígenos

vacinais contra leptospirose já demonstrou proteção significativa em estudos anteriores (SEIXAS et al. 2007, OLIVEIRA et al. 2019). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade protetora de cepa de BCG recombinante expressando antígeno vacinal predito como TBDR frente ao desafio letal por leptospirose.

2. METODOLOGIA

2.1 Preparação das formulações vacinais

A cepa de *Mycobacterium bovis* BCG recombinante previamente construída (pUP500/pAN:TBDRchimera) e a cepa BCG Pasteur foram cultivadas em meio líquido 7H9 suplementado com 0,05% de Tween 80 e 10% de OADC até atingirem a $DO_{600\text{ nm}}$ superior a 0,6. Posteriormente, 1 mL da cultura foi centrifugado por 15 minutos a 4000 rpm e o pellet foi ressuspensionado em 10 mL de Tampão fosfato-salino (PBS) estéril a fim de ajustar a concentração do cultivo para 10^7 células/mL.

2.2 Avaliação da capacidade protetora das formulações vacinais

Para avaliação da capacidade protetora da formulação, hamsters (*Mesocricetus auratus*) de 4 a 6 semanas de idade, do sexo masculino, receberam 10^6 UFC das vacinas descritas acima por via subcutânea. Os animais foram distribuídos em três grupos de 10 animais cada, sendo esses BCG Pasteur (controle negativo), BCG recombinante e bacterina (controle positivo).

O reforço foi dado nas mesmas condições, com intervalo de 21 dias entre as imunizações. O desafio ocorreu 30 dias após a segunda dose com $5 \times DL_{50}$ de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa FIOCRUZ L1-130. Os hamsters foram acompanhados diariamente para monitoramento de sinais clínicos, tais como prostração e perda de peso. Os animais sobreviventes 30 dias pós desafio foram eutanasiados. Foram realizados dois experimentos independentes, aprovados sob protocolo 4646-2015 do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEAA).

2.3 Avaliação da proteção contra colonização renal

Os animais sobreviventes foram eutanasiados e os rins foram coletados de forma asséptica, macerados com o auxílio de uma seringa e imersos em meio *Leptospira* Medium Base (EMJH) (Difco) suplementado com 10% de suplemento enriquecimento de *Leptospira* (Difco). As culturas foram incubadas a 28 °C e permaneceram na estufa por 8 semanas, sendo monitoradas semanalmente através de microscopia de campo escuro.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quanto ao ensaio de sobrevivência, 100% (10/10) dos animais imunizados com *M. Bovis* BCG recombinante expressando a quimera, sobreviveram, constituindo proteção significativa. Este mesmo resultado se manteve na repetição do experimento (Figura 1). Este resultado corrobora com o fato das proteínas TBDR serem alvos vitais para a sobrevivência e patogênese da bactéria.

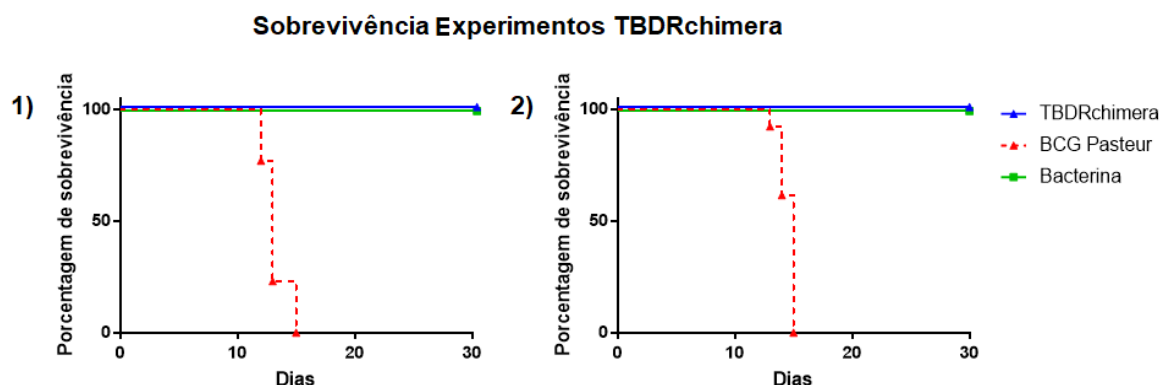


Figura 1. Curva de sobrevivência frente ao desafio letal. Os gráficos 1 e 2 representam os dois experimentos realizados de forma independente.

Os animais vacinados apresentaram pequena variação do peso em relação ao peso inicial, após o desafio. Com exceção do controle negativo, grupo Pasteur, que apresentou uma grande perda de peso e demais sinais clínicos (Figura 2). Leptospiras não foram reisoladas nos rins dos animais sobreviventes, sugerindo a indução de uma imunidade esterilizante, ou seja, proteção contra a colonização renal.

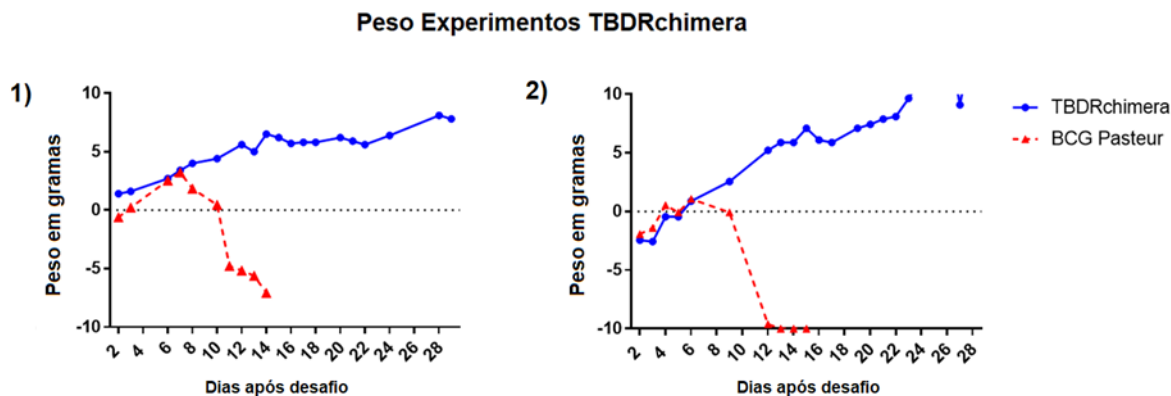


Figura 2. Acompanhamento diário de peso dos animais imunizados, após o desafio. Gráficos 1 e 2 representam experimentos independentes.

4. CONCLUSÕES

A quimera expressa pela cepa *M. Bovis* BCG recombinante mostrou-se uma vacina protetora contra leptospirose, conferindo 100% de proteção e evitando os sinais clínicos da doença. Como perspectiva desse trabalho, pretende-se avaliar a resposta humoral e celular induzida pela formulação, para compreender os mecanismos envolvidos na proteção.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, B. Vaccines against leptospirosis. **Curr Top Microbiol Immunol**, 387, 251-72. 2015

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

CALMETTE, A., GUÉRIN, C., BOQUET, A. & NÈGRE, L. La Vaccination. Préventive Contre La Tuberculose Par Le Bcg. **Masson Et Cie**. 1927

COSTA F, HAGAN JE, CALCAGNO J, KANE M, TORGERSON P, MARTINEZSILVEIRA MS, et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 9:e0003898; 2015.

DELANY, I.; RAPPUOLI, R.; SEIB, K.L. Vaccines, Reverse Vaccinology, and Bacterial Pathogenesis. **Cold Spring Harb Perspect Med**. May 1;3(5):a012476. 2013.

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.

HU, Y. H., DANG, W. & SUN, L. A TonB-dependent outer membrane receptor of *Pseudomonas fluorescens*: virulence and vaccine potential. **Arch Microbiol**, 194, 795-802. 2012

LEVETT, P. N. Systematics of leptospiraceae. **Curr Top Microbiol Immunol**, 387, 11-20; 2015

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.

ROWLAND, R. & MCSHANE, H. Tuberculosis Vaccines In Clinical Trials. **Expert Rev Vaccines**. 10(5). p. 645–658. 2011.

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.

STORK, M., BOS, M. P., JONGERIUS, I., DE KOK, N., SCHILDERS, I., WEYNANTS, V. E., POOLMAN, J. T. & TOMMASSEN, J.. An Outer Membrane Receptor of *Neisseria meningitidis* Involved in Zinc Acquisition with Vaccine Potential. **PLOS Pathogens**, 6, e1000969. 2010

STOVER, C.K., DE LA CRUZ, V.F., FUERST, T.R., BURLEIN, J.E., BENSON, L.A. & BENNETT, L. T. E. A. New Use Of Bcg For Recombinant Vaccines. **Nature**. 351(6326). p. 456–60. 1991