



POTENCIAL IMUNOPROTETOR DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *Leptospira interrogans* EM HAMSTERS

HARTWIG, Dajane D.^{1,2*}; **SEIXAS, Fabiana K.**¹; **SILVA, Éverton F.**¹; **CERQUEIRA, Gustavo M.**¹; **AMARAL, Marta**^{1,2}; **GALLI, Vanessa**¹; **FAGUNDES, Michel Q.**¹; **MCBRIDE, Alan J.**³; **DELLAGOSTIN, Odir A.**¹

¹Laboratório de Biologia Molecular - Centro de Biotecnologia - CENBIOT – UFPEL

²Instituto de Biologia – UFPel / ³Fiocruz – CPqMG - Salvador

Campus Universitário s/n - Caixa Postal 354 - CEP 96010-900. daiane_dh@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Espiroquetas são agentes etiológicos de doenças de importância humana e animal. Dentre elas a leptospirose é caracterizada como uma infecção de caráter emergente e reemergente [1]. A incidência dessa doença aumenta durante os períodos de chuva e enchentes, que na América do Sul e Central têm sido intensificados devido ao fenômeno El Niño [6], resultando perdas de importância econômica e social.

As vacinas estão entre as intervenções médicas mais importantes contra a maioria das infecções. Vacinas para prevenção da leptospirose estão sendo avaliadas em alguns países e estas se baseiam na resposta imune contra o LPS (lipopolissacarídeo). No entanto, somente poucas pessoas desenvolvem anticorpos e estudos *in vitro* demonstram que eles conferem imunidade protetora curta e restrita a sorovares antigenicamente relacionados [2]. Portanto, torna-se imprescindível o desenvolvimento de uma vacina multivalente, através da identificação de antígenos protéicos conservados. Neste sentido, proteínas de membrana externa de *Leptospira interrogans* têm sido os maiores alvos para o desenvolvimento de uma vacina efetiva contra a leptospirose. Atualmente, o número de proteínas de superfície celular caracterizadas é pequeno, sendo elas; LipL21, LipL31, LipL32, LipL36, LipL41, LipL45 e LipL48 [4, 9, 10, 5, 3].

Neste contexto, este estudo teve por objetivo a avaliação do potencial imunoprotetor em hamsters, de proteínas de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, visando o desenvolvimento de uma vacina contra leptospirose.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Clonagem, expressão e purificação das proteínas recombinantes: Os genes amplificados (*LIC10009*, *LIC10054*, *LIC11058*, *LIC11567*, *LIC13059* e *LIC20172*) de *L. interrogans* L1 130, através da técnica de PCR, foram clonados em

E. coli TOP10F utilizando o vetor de expressão pQE30 (Invitrogen). Os clones foram verificados quanto a expressão das proteínas recombinantes, sendo estas purificadas através de cromatografia de afinidade utilizando uma coluna de Ni²⁺-Sephrose (Ge Healthcare).

Imunização dos hamsters e testes desafio: Hamsters fêmeas Golden Syrian utilizados neste experimento foram obtidos do Biotério Central da UFPel. A triagem das proteínas recombinantes quanto ao potencial imunoprotetor foi realizada em três experimentos. Em todos os experimentos os animais foram imunizados com duas doses, via intramuscular, com 21 dias de intervalo. Cada dose foi composta de proteína recombinante (100 µg) acrescida de hidróxido de alumínio (15%) como adjuvante. Trinta dias após a primeira dose desafiou-se intraperitonealmente os animais com valor estimado na DL₅₀ de 10² células de *L. interrogans* L1 130 virulenta, como previamente descrito [8]. No primeiro e segundo experimentos utilizaram-se grupos de oito e seis animais, respectivamente e somente rLIC11058 e rLIC13059 foram testadas. No terceiro experimento utilizaram-se oito animais por grupo e todas as proteínas foram testadas. Em todos os experimentos utilizamos controles: somente hidróxido de alumínio 15% (controle negativo) e células inteiras inativadas de *L. interrogans* L1 130 (controle positivo).

Cultura e análises histopatológicas: Os hamsters sobreviventes foram eutanaziados após 30 dias do desafio. Os pulmões foram observados macroscopicamente quanto a presença de evidências teciduais de hemorragia. Os rins foram coletados para cultura e estudos histopatológicos com o intuito de determinar a imunidade esterilizante das vacinas nos animais sobreviventes. Para isso, foram coletados assepticamente de 1 - 2 g de tecido e transferidos para o meio de cultivo EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris), sendo as culturas observadas através de microscopia de campo escuro, durante oito semanas. Para os estudos de histopatologia, amostras de tecidos renal foram fixados em 10% de formalina (pH 7.0) e embebidos em parafina. Seis secções de 5 - 6 µM foram coradas com hematoxilina/eosina e examinadas para identificar lesões histopatológicas que evidenciam nefrite intersticial.

Análises estatísticas: O teste de Fisher e o teste "log-rank sum" foram utilizados para determinar diferenças significativas para as taxas de mortalidade e sobrevivência, respectivamente ($p \leq 0.001$ e $p \leq 0.005$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Clonagem, expressão e purificação das proteínas recombinantes. Foi possível clonar e expressar todas as proteínas alvo em *E. coli* TOP10F utilizando o vetor pQE30, bem como expressá-las e purificá-las. A quantidade obtida na purificação foi suficiente para realizar as imunizações dos hamsters.

Imunoproteção em hamsters: Os resultados dos experimentos desafio podem ser visualizados na Tabela 1. No segundo experimento, a proteína rLIC11058 apresentou níveis de proteção estatisticamente diferentes ($p \leq 0,001$) do grupo controle negativo. Nos demais experimentos não foram observadas diferenças significantes entre os grupos inoculados com as proteínas recombinantes e os grupos controle. Contudo, ainda podemos avaliar estes alvos sob novas formas de apresentação ao sistema imune, como: vacina de DNA e BCG recombinante, pois desta maneira poderemos potencializar a resposta protetora. Isto já foi demonstrado por alguns autores; o antígeno LipL32, não induz resposta imune protetora quando a proteína recombinante é inoculada com adjuvante, mas este antígeno protege como vacina de DNA ou quando expresso em *Mycobacterium bovis* BCG [7]. Já para o

antígeno LigA tanto a proteína recombinante [8] quanto a vacina de DNA [11] demonstram proteção em hamsters.

A porcentagem de sobrevivência dos hamsters desafiados no presente estudo pode ser observada na Figura 1. Dentre todas as proteínas avaliadas somente rLIC11058 (54.5%) demonstrou potencial de imunoproteção ($p \leq 0,001$). As outras proteínas testadas não apresentaram diferenças quando comparadas ao controle negativo.

Tabela 1 Experimentos e efeito protetor das proteínas recombinantes, demonstrado no desafio intraperitoneal com *Leptospira*.

Grupos	No. de sobreviventes/ total de animais			
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Total
rLIC11058	1/6	8/8 ^a	3/8	12/22 ^a
rLIC10054	-	-	1/6	1/6
rLIC20172	-	-	1/8	1/8
rLIC13059	2/6	2/8	0/8	4/22
rLIC11567	-	-	2/8	2/8
rLIC10009	-	-	0/8	0/8
Hidróxido de alumínio	4/4 ^b	4/4 ^b	8/8 ^a	16/16 ^a
<i>L. interrogans</i> inativada	0/6	0/8	0/8	0/22

^a Proteção contra desafio letal foi estatisticamente significativa ($p \leq 0.001$).

^b Proteção contra desafio letal foi estatisticamente significativa ($p \leq 0.002$).

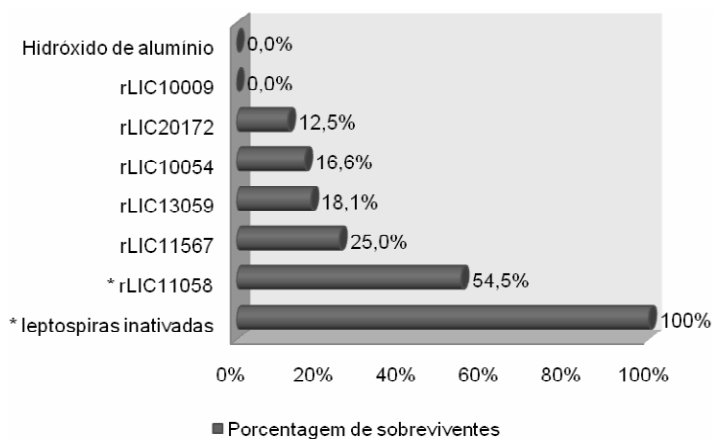


Figura 1 Porcentagem de hamsters sobreviventes ao desafio com *L. interrogans* L1130. Asteriscos demonstram diferença significativa nas taxas de sobrevivência quando comparadas ao grupo controle negativo ($p \leq 0,001$). Dados representam os três experimentos desafio.

Além disso, animais inoculados com rLIC11058 que morreram durante o curso dos experimentos tiveram uma taxa de sobrevivência maior que os do controle negativo (Figura 2). Durante estes experimentos as proteínas também foram testadas em forma de *pool*, mas não foi demonstrado sinergismo na imunoproteção.

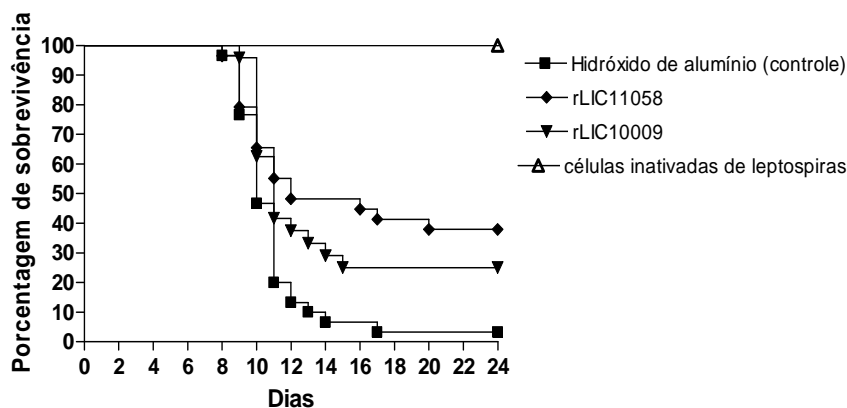


Figura 2 Sobrevida dos hamsters desafiados com *L. interrogans* L1 130. O teste “log-rank sum” foi usado para determinar diferenças significativas nas taxas de sobrevivência entre os grupos imunizados com a proteína rLIC11058, hidróxido de alumínio (controle negativo) e células de *L. interrogans* inativadas (controle positivo) ($p \leq 0.005$). Os dados representam os resultados combinados dos três experimentos.

Cultura de *Leptospira* dos tecidos e histopatologia: Os hamsters imunizados que sobreviveram ao desafio e os animais inoculados com as leptospiros inativadas, não demonstraram evidências clínicas de infecção quando eutanaziados aos 30 dias após o desafio. O isolamento de leptospiros dos tecidos renais dos animais sobreviventes ao desafio foi negativo. Estes resultados indicam que as vacinas foram capazes de conferir imunidade esterilizante.

4. CONCLUSÕES

A proteína recombinante rLIC11058 demonstrou potencial de imunoproteção em hamsters, aumentando a taxa de sobrevivência destes animais. Para as demais proteínas avaliadas não foi observado tal potencial. Todos os animais que sobreviveram aos testes de desafio estavam livres de lesões histopatológicas, apresentando também, imunidade esterilizante, pois estavam livres de leptospiros.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Bharadwaj, R. Leptospirosis – a reemerging disease? **Indian Journal of Medical Research**. 2004, 136-138.
- [2] Bharti, A. R.; Nally, J. E.; Ricaldi, J. N.; et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect Dis**. 2003, 3: 757-71.
- [3] Cullen, P. A.; Haake, D. A.; Bulach, D. M.; Zuerner, R. L.; Adler, B. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. **Infection and Immunity**. 2003, 71, 2414-2421.
- [4] Haake, D. A.; Champion, C. I.; Martinich, C.; Shang, E. S., Blanco, D. R.; Miller, J. N.; Lovett, M. A. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic *Leptospira* spp. **Journal of Bacteriology**. 1993, 175, 4225-4234.
- [5] Haake, D. A.; Mazel, M. K.; McCoy, A. M.; Milward, F.; Chao, G.; Matsunaga, J.; Wagar, E. A. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 e LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. **Infection and Immunity**. 1999, 67, 6572-6582.
- [6] Levett, P. N. Leptospirosis. **Clin. Microbiol. Rev.** 2001, 14, 296-326.

[7] Seixas, F.K; Silva, E. F da; 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**. 2007, 26, 88-95.

[8] Silva, E.F., Medeiros, M.A., McBride, A.J., Matsunaga, J., Esteves, G.S., Ramos, J.G., Santos, C.S., Croda, J., Homma, A., Dellagostin, O.A., Haake, D.A., Reis, M.G., and 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**. 2007.

[9] Shang, E. S.; Exner, M. M.; Summers, T. A.; Martinich, C.; Champion, C. I.; Hancock, R. E.; Haake, D. A. The rare outer membrane protein OmpL1 of pathogenic *Leptospira* species is a heat-modifiable porin. **Infection and Immunity**. 1995, 63, 3174-3181.

[10] Shang, E. S.; Summers, T. A.; Haake, D. A. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. **Infection and Immunity**. 1996, 64, 2322-2330.

[11] Faisal, S.M.; Yan, W.W.; Chen, C.S.; Palaniappan, R.U.M; McDonough, S.P.; Chang, Y.F. Evaluation of protective immunity of *Leptospira* immunoglobulin like protein A (LigA) DNA vaccine against challenge in hamsters. **Vaccine**. 2007.