



## VACINA CONTRA LEPTOSPIROSE: TRIAGEM DE CANDIDATOS RECOMBINANTES

**FELIX, Samuel Rodrigues<sup>1,2</sup>; GRASSMANN, André Alex<sup>2</sup>; SEIXAS NETO, Amilton Clair Pinto<sup>2</sup>; SILVA, Everton Fagonde da<sup>2</sup>; DELLAGOSTIN, Odir Antônio<sup>1,2</sup>.**

<sup>1</sup> Programa de Pós Graduação em Veterinária (PPGV)

<sup>2</sup> Centro de Biotecnologia UFPel (CENBIOT)

### INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença infecciosa causada por bactérias do gênero *Leptospira*, esta zoonose possui uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo de forma endêmica em todo o mundo. A doença é atualmente reconhecida como emergente (LEVETT, 2001; McBRIDE et al., 2005). Os prejuízos em termos de saúde pública e as perdas econômicas causadas por tal zoonose justificam o uso de vacinas contra leptospirose em humanos e em animais. Assim o desenvolvimento de novas estratégias para a prevenção da leptospirose se faz necessário (McBRIDE et al., 2005).

Atualmente as vacinas disponíveis têm baixa eficiência, são sorovares específicas, e com mais de 250 sorovares relatados não oferecem proteção adequada. Esforços para a identificação de componentes imunogênicos com potencial para o desenvolvimento de vacinas recombinantes resultou na caracterização de várias proteínas de membrana externa, mas poucas delas foram avaliadas quanto à sua capacidade imunoprotetora real (HAAKE et al., 1993; HAAKE et al., 1999; BRANGER et al., 2005; FAISAL et al., 2007).

Nos últimos anos, proteínas recombinantes de membrana externa (OMPs) de leptospirosas como OmpL1, LipL41, LipL32, e *Leptospiral immunoglobulin-Like protein A* (LigA) foram avaliadas como candidatas potenciais a vacinas em modelos animais suscetíveis para a leptospirose (HAAKE et al., 1999, BRANGER et al., 2005; FAISAL et al., 2007). Recentemente, nosso grupo demonstrou que a imunização de hamsters com um fragmento de LigA (SILVA, et al., 2007) e com BCG expressando LipL32 (SEIXAS, et al., 2007), podem representar estratégias potenciais na proteção contra a leptospirose. Além disso, nós caracterizamos a virulência, em modelo experimental suscetível, de cinco cepas de *Leptospira* isoladas no Brasil, e que são pertencentes a sorogrupos causadores de leptospirose no Brasil e no mundo (SILVA, et al., 2008).

O propósito deste trabalho foi o de obter um ou mais candidatos promissores à vacina recombinante contra leptospirose através da avaliação, quanto à sua capacidade imunoprotetora, de 17 candidatos.

## METODOLOGIA

**Extração de DNA, desenho de oligonucleotídeos e PCR:** *Leptospira interrogans* cepa Fiocruz L1-130 foi cultivada em meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) líquido, à 29 °C. O volume de 1 ml de cultura com 10<sup>8</sup> leptospiros/ml foi utilizado para o procedimento de extração de DNA genômico, que foi usado como DNA molde para os experimentos de PCR. Os oligonucleotídeos foram desenhados com o auxílio do *software* Vector NTI 9.0. No caso das proteínas recombinantes, os oligonucleotídeos foram desenhados para amplificar as regiões solúveis da proteína, sempre que possível, eliminando o peptídeo sinal e incluindo sítios para enzimas de restrição. As PCRs foram executadas em condições particulares, dependendo dos oligonucleotídeos sendo utilizados. As reações foram executadas em um termociclador (Eppendorf), através da ação da enzima *Taq* DNA Polimerase, tampões e dNTPs, conforme o protocolo de Sambrook et al. (2001).

**Clonagem, expressão e purificação das proteínas recombinantes:** Os fragmentos amplificados foram digeridos com as enzimas de restrição, ligados à vetores de expressão (pAE e pQE) e o produto da ligação foi utilizado para transformar cepas de *E. coli* competentes. As bactérias foram crescidas em meio LB, para produção em larga escala. A cultura foi monitorada até atingir uma densidade óptica (DO<sub>600</sub>) de 0,6 a 0,8, quando foi induzida a expressão da proteína recombinante através da adição de 0,3 mM de isopropyl-β-d-thiogalactopyranosideo (IPTG). Após três horas de expressão (sob efeito do IPTG), os cultivos foram centrifugados para produzir o precipitado da massa bacteriana, e o sobrenadante foi descartado. As células foram então lisadas através de ação enzimática e sonicação. As proteínas foram solubilizadas em solução com agente denaturante (uréia), e purificadas por cromatografia de afinidade. As proteínas foram quantificadas pela técnica de Bradford, pelo *kit* BCA<sup>TM</sup> Protein Assay (Pierce) e através de eletroforese.

**Ensaio em modelo animal:** Para os experimentos de imunoproteção foram utilizados como modelo animal hamsters (*Golden syrian*), fêmeas, com 4 a 6 semanas de idade, que foram padronizados previamente (Silva et al. 2008). Grupos de 6 animais foram utilizados para os testes dos candidatos a vacinas, assim como grupos controle positivo (bacterina homóloga) e controle negativo (PBS+Adjuvante), em todos os experimentos. Os desafios foram feitos com leptospiros da cepa Fiocruz L1-130 virulentas, a dose desafio foi de 100 células bacterianas ( ~2 x DL<sub>50</sub>), conforme Silva et al. (2008). Os experimentos com vacinas de subunidade avaliaram o efeito imunoprotetor dos candidatos denominados LIC 12099, LIC12730, LIC10561, LIC10508, LIC10191, LIC10011, LIC11947, LIC12538, produzidas conforme descrito anteriormente. Além disso, testou-se o efeito imunoprotetor dos candidatos LIC10325, LIC11859, LIC12253, LIC13006, LIC13306, LIC10021, LIC10645, LIC11184, LIC10087, LIC12555, produzidos pela Fiocruz/RJ através de um projeto em colaboração. Para estes experimentos, os animais foram imunizados, através da via intramuscular, com

um intervalo de 14 dias entre as doses. Cada animal recebeu duas doses de 60 ug de proteína em mistura homogênea com 15% de hidróxido de alumínio. As proteínas foram concentradas para que nenhuma dose excedesse o volume máximo de 250 uL. O desafio foi conduzido 14 dias após a segunda imunização, e os animais foram monitorados por 25 dias para observação de óbitos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as proteínas foram recuperadas com grau de pureza superior a 85% e caracterizadas com o anticorpo monoclonal anti-histidina. Os resultados dos experimentos de imunoproteção estão listados na tabela 1, abaixo, representado os experimentos com vacinas de subunidade. De forma sintética, a tabela mostra apenas o percentual de sobreviventes, agregando dados de todos os experimentos realizados. Em todos estes, o grupo controle positivo teve uma sobrevivência de 100%, enquanto que em dois (de um total de 8) experimentos 1 animal do grupo controle negativo sobreviveu.

Estes resultados demonstram que, ao menos, dois dos candidatos testados tem potencial imunoprotetor contra leptospirose. Os candidatos LIC12099 e LIC10325 foram capazes de proteger mais de 33% dos animais experimentais contra o desafio letal.

**TABELA 1** – Percentual de sobreviventes em todos os experimentos usando proteínas recombinantes como imunógeno

	Vacina de subunidade	% de sobreviventes
1	LIC12099 <sup>c</sup>	50
2	LIC12730	0
3	LIC10561	16,7
4	LIC10508 <sup>c</sup>	8,4
5	LIC10191	0
6	LIC10011	16,7
7	LIC11947	0
8	LIC12538	16,7
9	LIC10325	33,4
10	LIC12253	16,7
11	LIC13006	16,7
12	LIC13306	16,7
13	LIC10021	0
14	LIC10645	0
15	LIC11184	0
16	LIC10087	0
17	LIC12555	0

<sup>a</sup> Em todos os 8 experimentos 100% dos animais do grupo controle (+) sobreviveram

<sup>b</sup> Em 2 dos 8 experimentos 1 (16,7%) animal sobreviveu

<sup>c</sup> Estes alvos foram incluídos em 2 experimentos

Outros autores que demonstraram resultados positivos nos testes de imunoproteção com vacinas recombinantes (SEIXAS, et al., 2007; SILVA, et al., 2007)

não o fizeram usando hidróxido de alumínio como adjuvante. Possivelmente a baixa capacidade de indução de resposta imune celular do alumínio (GUY, 2007) não esteja favorecendo os testes com vacinas de subunidade.

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que os candidatos LIC12099 e LIC10365 devem ser submetidos a estudos posteriores. Apesar de uma vacina recombinante para uso humano estar em um futuro mais remoto, a possibilidade do uso de outros adjuvantes no mercado veterinário torna este cenário promissor.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRANGER, C.; CHATRENET, B.; GAUVRIT, A.; AVIAT, F.; AUBERT, BACH, J. M. ; ANDRE-FONTAINE, G. Protection against *Leptospira interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. **Infection and Immunity**, 2005, 73, p. 4062–4069.
- FAISAL, S. M.; YAN, W.; CHEN, C.; PALANIAPPAN, R. U. M.; MCDONOUGH, S. P.; CHANG, Y. Evaluation of protective immunity of *Leptospira* immunoglobulin like protein A (LigA) DNA vaccine against challenge in hamsters. **Vaccine**, 2007, 26, p. 277-287.
- GUY, B., The perfect mix: recent progress in adjuvant research **Nature Reviews, Microbiology**, 2007, 5, p. 505-517.
- HAAKE DA, CHAMPION CI, MARTINICH C, et al. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic *Leptospira* spp. **J.Bacteriol.** 1993;175(13):4225-34.
- HAAKE DA, MAZEL MK, MCCOY AM, et al. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. **Infect.Immun.** 1999;67(12):6572-82.
- LEVETT P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, 2001, v.14, p. 296-326.
- McBRIDE, A.J.A., ATHANAZIO, D.A., REIS, M.G., KO, A.I. Leptospirosis. **Current opinion in infectious diseases**, 2005, v.18, p. 376-386.
- SAMBROOK AND RUSSELL (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SEIXAS, F. K.; SILVA, É. 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**, 2007, 26, p. 88-95.
- SILVA, É. 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.; 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, 25, p. 6277-6286.
- SILVA, É. F.; SANTOS, C. S.; ATHANAZIO, D. A.; SEYFFERT, N.; SEIXAS, F. K.; CERQUEIRA, G. M.; FAGUNDES, M. Q.; BROD, C. S.; REIS, M. G.; DELLAGOSTIN, O. A.; KO, A. I. Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in a hamster model. **Vaccine**. 2008, 26, p. 3892-3896.