

XVIII

CIC

XI ENPOS
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:
por uma ciência do devir



IMUNOPROTEÇÃO INDUZIDA POR rLTB-LipL32 CONTRA INFECÇÃO LETAL POR *Leptospira interrogans* EM HAMSTERS

GRASSMANN, André A*; FELIX, Samuel R; SEIXAS NETO, Amilton C P; SEIXAS, Fabiana K; CONCEIÇÃO, Fabricio R; SILVA, Everton F; DELLAGOSTIN, Odir A.

Laboratório de Biologia Molecular – Centro de Biotecnologia - Cenbiot – UFPel
Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900.
*grassmann.aa@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* são responsáveis pela leptospirose, uma zoonose de ampla distribuição mundial. A doença é mantida na natureza pela infecção crônica de animais domésticos e silvestres e é adquirida pelo contato direto ou indireto com a urina ou órgãos destes animais infectados. Existem mais de 260 sorovares identificados de leptospirosas patogênicas, e esta diferença antigênica é atribuída principalmente ao lipopolissacarídeo. Desta forma, as vacinas convencionais, constituídas de células inteiras inativadas (bacterinas) não proporcionam proteção cruzada contra os diferentes sorovares que podem causar a leptospirose (Levett, 2001; Adler & Moctezuma, 2009).

Desta forma, o desenvolvimento de uma vacina de amplo espectro, com imunoproteção cruzada contra diferentes sorovares de leptospirosas, permanece um desafio. A membrana externa leptospiral é dominada pela lipoproteína LipL32, que compreende mais de 50% tanto do subproteoma (Cullen, 2002) quanto do *surfaceoma* (Cullen, 2004; Cullen, 2005). A LipL32 é expressa durante a infecção e induz resposta humoral (Flannery, 2001), liga-se à matriz extracelular de mamíferos (Hauk, 2008; Hoke, 2008) e mais de 95% dos pacientes com leptospirose produzem anticorpos contra LipL32 durante a infecção (Guerreiro, 2001). Imunização de gerbils com adenovírus recombinante (Branger, 2001) e vacina de DNA contendo o gene *lipL32* produziram resposta protetora, porém rLipL32 não foi capaz de proporcionar resposta semelhante (Branger, 2005), e em ambos estudos a significância dos resultados podem ser questionadas, em função da alta sobrevivência dos animais do grupo controle. Respostas mais significativas foram observadas na imunização de hamster com rBCG expressando LipL32 (Seixas, 2007).

As vacinas recombinantes, apesar de serem mais seguras do que as vacinas convencionais são menos imunogênicas. Assim, adjuvantes são componentes essenciais para aperfeiçoar a eficiência destas vacinas (Dzierzbicka & Kołodziejczyk, 2006). Neste estudo nós investigamos a possibilidade da subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB) ser utilizada como imunostimulante da resposta protetora gerada por rLipL32. Esta subunidade não tóxica demonstrou em diversos estudos ter atividade imuno-adjuvante com produção de

resposta imune humoral e celular, tanto co-administrada ou fusionada ao antígeno (Millar, 2001; Lebens, 2003; da Silva Ramos Rocha, 2008; Chen, 2009).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta imune protetora de rLipL32 fusionados ou co-administrada à rLTB, em hamsters frente ao desafio letal com *Leptospira interrogans*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Cepas utilizadas no estudo e cultivo: *E. coli* BL21(DE3) Star foi cultivada em meio LB, a 37 °C. *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 foi crescida em meio EMJH (Difco) enriquecido com 10% de suplemento comercial (Difco).

Obtenção das proteínas recombinantes: os vetores recombinantes pAE//*ltb*, pAE//*lipL32* e pAE//*ltb-LipL32* foram inseridos por eletroporação na cepa de expressão *E. coli* BL21(DE3) Star. Durante o cultivo, a expressão das proteínas recombinantes foi induzida com 0,3 mM de IPTG. As culturas foram centrifugadas e os *pellets* foram tratados com tampão para purificação de proteínas no caso de rLipL32, ou o mesmo tampão contendo 0,2% do agente desnaturante *N-Lauroylsarcosine*, quando rLTB ou rLTB-LipL32. As proteínas recombinantes foram purificadas utilizando cromatografia de afinidade no sistema automatizado ÄKTAPrime (GE Healthcare). A identidade destas proteínas foi checada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e por Western blot (WB) com soro anti-LTB, anti-LipL32 e soro de um paciente positivo para leptospirose.

Imunização dos hamsters: setenta hamsters fêmeas com idade entre 4 e 6 semanas foram divididos em 7 grupos ($n = 10$) e imunizados com rLTB ou rLTB + rLipL32 ou rLTB-LipL32, por via intramuscular (IM) ou via subcutânea (SC). O último grupo foi imunizado com bacterina de *L. interrogans* Copenhageni Fiocruz L1-130, via intramuscular. Duas doses foram administradas, no dia 0 e dia 14, compreendendo 16,5 µg de rLTB, 43,5 µg de rLipL32, 60 µg de rLTB-LipL32 ou 10^8 células (bacterina) cada dose.

Desafio dos hamsters: os animais imunizados com as diferentes vacinas foram desafiados com *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 virulenta, 21 dias após a segunda dose (dia 35). Para tanto, uma suspensão de cerca de 100 leptospiros (aproximadamente 2 vezes a DL_{50}) em 1 mL de PBS foi inoculado, via intra-peritoneal, nos animais imunizados. Os hamsters foram avaliados diariamente para observação da ocorrência de sinais clínicos de leptospirose e os sobreviventes foram eutanaziados 21 dias após a infecção. Os rins foram coletados para a realização de culturas, como testes de avaliação de proteção esterilizante.

Aspectos éticos: este trabalho foi realizado conforme os Princípios Éticos na Experimentação Animal, recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As proteínas recombinantes rLTB, rLipL32 e rLTB-LipL32 foram eficientemente expressas na cepa *E. coli* BL21(DE3) Star. Em SDS-PAGE as proteínas apresentaram massa molecular esperada e o WB realizado demonstrou que a fusão aparentemente conservou epitopos das proteínas originais. Além disso, o soro de paciente humano positivo para leptospirose reconheceu tanto rLipL32 quanto rLTB-

LipL32, fornecendo indícios que a resposta produzida por estas proteínas possam reconhecer a LipL32 nativa da leptospira.

No experimento de imunoproteção, a imunização que induziu maior índice de sobrevivência contra o desafio letal com leptospiras patogênicas foi rLipL32 coadministrada com rLTB, porém, apenas quando inoculado pela via intra-muscular. A proteção induzida por este imunógeno foi de 30%. O mesmo imunógeno na via sub-cutânea não induziu resposta imune protetora, ao passo que a quimera rLTB-LipL32 induziu 10% de proteção, em ambas as vias. Os animais do grupo controle imunizados com bacterina sobreviveram em sua totalidade, ao passo que todos os animais dos grupos inoculados com rLTB, por ambas vias, vieram a óbito (Tabela 1).

Tabela 1. Proteção conferida pelas vacinas testadas.

Antígeno vacinal	Via	Dias para óbito	n° sobreviventes	% sobreviventes
LTB	IM	11, 11, 11, 11, 12, 13, 14, 14, 15, 16	0	0%
LTB + LipL32	IM	12, 13, 14, 14, 15, 16, 20	3	30%
rLTB-LipL32	IM	11, 11, 11, 11, 12, 14, 14, 14, 20	1	10%
LTB	SC	11, 11, 12, 12, 13, 14, 14, 15, 16, 20	0	0%
LTB + LipL32	SC	11, 11, 11, 11, 12, 13, 14, 14, 14, 20	0	0%
rLTB-LipL32	SC	11, 11, 12, 12, 12, 14, 14, 14, 15	1	10%
BACTERINA	IM	-	10	100%

Além de conferir maior proteção, a vacina rLTB + rLipL32 IM também foi a que mais retardou o início de óbitos dos animais. A dose de antígeno (rLipL32) utilizada neste experimento - 43,5 µg – foi relativamente pequena, talvez seu aumento melhore a resposta protetora induzida pelas vacinas testadas.

A proteína LipL32 apresentada ao sistema imune na forma de vacina recombinante de subunidade não apresentou imunoproteção significativa utilizando como adjuvantes Hidróxido de Alumínio ou Adjuvante de Freund (Branger, *et al.*, 2005). Neste trabalho, rLTB aparentemente demonstrou efeito adjuvante para a vacinação com rLipL32.

Os animais sobreviventes foram eutanaziados e os rins foram utilizados para realização do teste de esterilidade, por cultura renal, demonstrando que os animais sobreviventes produziram resposta imune capaz de protegê-los também contra a colonização renal por leptospiras.

4. CONCLUSÃO

Ao final deste estudo, conclui-se que a vacinação com rLipL32 co-administrada com rLTB pela via IM induziu maior proteção contra infecção letal por *L. interrogans* do que fusionadas ou pela via SC. Diante disto, esta estratégia de imunização é promissora. Todavia, novos estudos serão realizados otimizando doses e vias de administração para elucidar o papel imuno-modulador e adjuvante de LTB na imunização com rLipL32. Espera-se uma resposta protetora ainda melhor, não apenas em desafio homólogo, mas também em desafio heterólogo com diferentes sorovares patogênicos de leptospiras.

5. REFERÊNCIAS

Levett, P.N. 2001. Leptospirosis. Clin. Microbiol. Rev. 14: 296-326.

Adler, B., Moctezuma, A. de la Peña. *Leptospira* and leptospirosis. **Vet. Microbiol.** 2009.

Cullen, P.A., Cordwell, S.J., Bulach, D.M., Haake, D.A., and Adler, B. 2002. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. **Infect. Immun.** 70. 2311-2318.

Cullen, P.A., Haake, D.A., Adler, B., 2004. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. **FEMS Microbiology Reviews** 28, 291–318.

Cullen, P.A., Xu, X., Matsunaga, J., Sanchez, Y., Ko, A.I., Haake, D.A., and Adler, B. 2005. Surfaceome of *Leptospira* spp. **Infect. Immun.** 73. 4853-4863.

Flannery, B., Costa, D., Carvalho, F.P., Guerreiro, H., Matsunaga, J., Da Silva, E.D., Ferreira, A.G.P., Riley, L.W., Reis, M.G., Haake, D.A., Ko, A.I., 2001. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology** 39, 3303–3310.

Hauk, P., Macedo, F., Romero, E.C., Vasconcellos, S.A., de Moraes, Z.M., Barbosa, A.S., Ho, P.L., 2008. In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. **Infection and Immunity** 76, 2642–2650.

Hoke, D.E., Egan, S., Cullen, P.A., Adler, B., 2008. LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata*. **Infection and Immunity** 76, 2063–2069.

Guerreiro, H.; Croda, J.; Flannery, B.; Mazel, M.; Matsunaga, J.; Galvao, R. M.; Levett, P. N.; Ko, A.I.; Haake, D. A. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. **Infection and Immunity**, 69, 4958-4968, 2001.

Branger, C., Sonrier, C., Chatrenet, B., Klonjowski, B., Ruvoen-Clouet, N., Aubert, A., Andre-Fontaine, G., Eloit, M., 2001. Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. **Infection and Immunity**. 69, 6831–6838.

Branger, C., Chatrenet, B., Gauvrit, A., Aviat, F., Aubert, A., Bach, J.M., Andre-Fontaine, G., 2005. Protection against *Leptospira interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. **Infection and Immunity**. 73, 4062–4069.

Seixas, F.K., Fernandes, C.H., Hartwig, D.D., Conceição, F.R., Aleixo, J.A.G., Dellagostin, O.A., Evaluation of different ways of presenting LipL32 to the immune system with the aim of developing a recombinant vaccine against leptospirosis. 2007. *Can. J. Microbiol.*; 53: 472-479.

Dzierzbicka, K.; Kołodziejczyk, A. M. Adjuvants--essential components of new generation vaccines. **Postepy Biochem**, 52(2), 204-11, 2006

Millar DG, Hirst TR, Snider DP. 2001. *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit is a more potent mucosal adjuvant than its closely related homologue, the B subunit of cholera toxin. **Infect Immun** 69(5):3476–82.

Lebens M, Sun JB, Sadeghi H, Backstrom M, Olsson I, Mielcarek N, et al. 2003. A mucosally administered recombinant fusion protein vaccine against schistosomiasis protecting against immunopathology and infection. **Vaccine**. 21:514–20.

da Silva Ramos Rocha, A.; Conceição, F. R.; Grassmann, A. A.; Lagranha, V. L.; Dellagostin, O. A. B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as adjuvant of humoral immune response in recombinant BCG vaccination. **Can J Microbiol**, 54(8), 677-86, 2008.

Chen, CG; Lu, YT; Lin, M; Savelyeva, N; Stevenson, FK; Zhu, D. 2009. Amplification of immune responses against a DNA-delivered idiotypic lymphoma antigen by fusion to the B subunit of *E. coli* heat labile toxin. **Vaccine**. 27. 4289–4296.