

AVALIAÇÃO DE LIPROPROTEINAS RECOMBINANTES DE *Leptospira Interrogans* SOROVAR COPENHAGENI COMO VACINA DE SUBUNIDADE EM HAMSTERS

Danieli Maria Hartmann*, Éverton Fagonde da Silva, Samuel Rodrigues Félix, Fabiana Kommling Seixas, Daiane Hartwig, Gustavo Maia de Cerqueira, Marta Amaral, Odir Antônio Dellagostin

Centro de biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas

* Apresentador

INTRODUÇÃO

A Leptospirose é uma doença bacteriana que afeta os seres humanos e os animais (WHO, 2003; Hotez & Ferris, 2006). O número de casos humanos e em animais no mundo não é bem documentado, considerando-se atualmente a leptospirose como uma doença bacteriana tropical negligenciada (Hotez & Ferris, 2006).

As vacinas atuais disponíveis contra a leptospirose são direcionadas principalmente ao LPS das leptospiras. Entretanto, já foram descritos mais de 230 sorovares, que evidenciam diferenças antigênicas entre si, e limitando assim a proteção cruzada e de longa duração (Bharti et al., 2003). A identificação dos alvos novos expressos durante a infecção é importante para o desenvolvimento de novas estratégias para a imunoproteção (Guerreiro et al., 2001).

Nos últimos anos, proteínas recombinantes demonstraram o seu potencial protetor contra outras doenças em modelos animais (Fikrig et al., 1990; Kyd et al., 1995; Von Specht et al. 1995). Proteínas de membrana externa (OMPs) de leptospiras como OmpL1, LipL41, LipL32, e Leptospiral immunoglobulin-Like proteína A (LigA) foram avaliados como os candidatos vacinais potenciais (Branger et al., 2005; Faisal et al., 2007; Haake et al., 1999; Palaniappan et al., 2006). 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 constituir em estratégias potenciais na intervenção da leptospirose.

Em nosso presente estudo, quatro lipoproteínas recombinantes foram selecionadas e avaliadas de forma preliminar, em um experimento piloto, como candidatas a uma vacina de subunidade contra a leptospirose. Nossos achados revelaram que uma das lipoproteínas recombinantes induziu um nível de proteção significativo em hamsters contra o desafio letal com leptospiras virulentas.

MATERIAL E MÉTODOS

L. interrogans sorovar Copenhageni, cepa Fiocruz L1-130 (Ko et al., 1999) foi cultivada em meio EMJH líquido (Difco Laboratories) à 29 °C. As cepas de *Escherichia coli* TOP10F and BL21(DE3)-RIL foram crescidas em meio Luria-Bertani (LB) à 37 °C. Primers com os nomes arbitrariamente denominados de Lip1 a Lip4 foram desenhados. As sequências codificadoras foram amplificadas por PCR e clonadas no vetor de expressão pQE30 (Invitrogen) ou pAE. Os plasmídeos recombinantes foram usados para transformar cepas de *E. coli* BL21(DE3) através de eletroporação e purificadas através de cromatografia de afinidade usando o sistema ÄKTAPrime chromatography system (Amersham Biosciences, USA). Posteriormente foi realizada a diálise e a quantificação das lipoproteínas através do método de Bradford (1976).

Grupos de 6 fêmeas hamsters com 4 a 5 semanas de idade foram imunizadas através da via intramuscular com as diferentes lipoproteínas com hidróxido de alumínio (15%) no dia 0 e 14. A imunização dos animais foi realizada na dose de 80 µg/40 µg (dose 1/dose 2), com o máximo volume de 250 µL. Um grupo controle negativo de hamsters foi imunizado com a mistura de hidróxido de alumínio e PBS. Soros pré e pós-imune foram coletados através de flebotomia do plexo venoso retro-orbital no dia antes da primeira e da segunda dose, e antes do desafio homólogo com a administração intraperitoneal de 100 leptospiras ($5 \times LD_{50}$) da cepa Fiocruz L1-130 (Silva et al., 2007). Hamsters foram monitorados diariamente quanto ao aparecimento de

sinais clínicos da leptospirose e eutanasiados quando sinais de doença terminal ocorreram.

Hamsters sobreviventes foram eutanasiados no dia 24 após o desafio e o sangue, rins, pulmões, e fígado foram coletados para sorologia, cultura bacteriológica e análise histopatológica. Todos os animais foram mantidos no Centro de Biotecnologia da UFPel, e foram manipulados de acordo com as normas do comitê de ética e uso de animais em experimentação animal da UFPel.

O Teste de Fisher e Log-rank sum test foram usados para determinar as diferenças estatísticas para mortalidade e sobrevivência ($P < 0.05$), respectivamente, entre os grupos imunizados e o grupo controle negativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os produtos de PCR foram clonados com sucesso, expressos em *E. coli* e purificados através do sistema ÄKTAPrime. Todas as quatro lipoproteínas foram expressas em corpos de inclusão. Elas foram solubilizadas e purificadas usando uréia. Após a diálise e a análise por SDS-PAGE, a pureza foi estimada como acima de 95%. O rendimento das lipoproteínas variou de 4 mg/L to 80 mg/L de cultura, dependendo da proteína.

A imunização com proteína recombinante e hidróxido de alumínio conferiu proteção contra desafio com dose letal somente no grupo vacinado com Lip1. A proteção conferida com 80/40 µg de Lip1 foi de 100% ($P < 0.001$), entretanto somente um animal sobreviveu nos grupos com Lip 2 e Lip3. Nenhum animal sobreviveu nos grupos de Lip4 e controle negativo (TABELA 1 e FIGURA 1).

TABELA 1. Proteção conferida pela imunização de hamsters com lipoproteínas recombinantes contra o desafio com dose letal de leptospiras.

Grupo ^a	Dias até a morte	Sobreviventes/total	% Proteção
Lip1	-	6/6	100 ^b
Lip2	11,13,13,13,18	1/6	16.7
Lip3	11,11,11,11,13	1/6	16.7
Lip4	11,11,12,13,14,14	0/6	0
Controle	11,11,12,13,13,14	0/6	0

^a Animais vacinados com 2 doses (80 / 40 µg), em um intervalo de 2 semanas, desafiados com Fiocruz L1-130, 2 semanas após a última dose.

^b Proteção contra desafio estatisticamente significativo ($P < 0.001$).

Os hamsters que sobreviveram ao desafio não demonstraram evidencia clínica da doença durante 24 dias após o desafio. A necropsia dos sobreviventes também não revelou lesões macroscópicas e histológicas comuns da enfermidade e a tentativa de isolamento de leptospiras dos rins não obteve sucesso ao final de 7 semanas de cultivo.

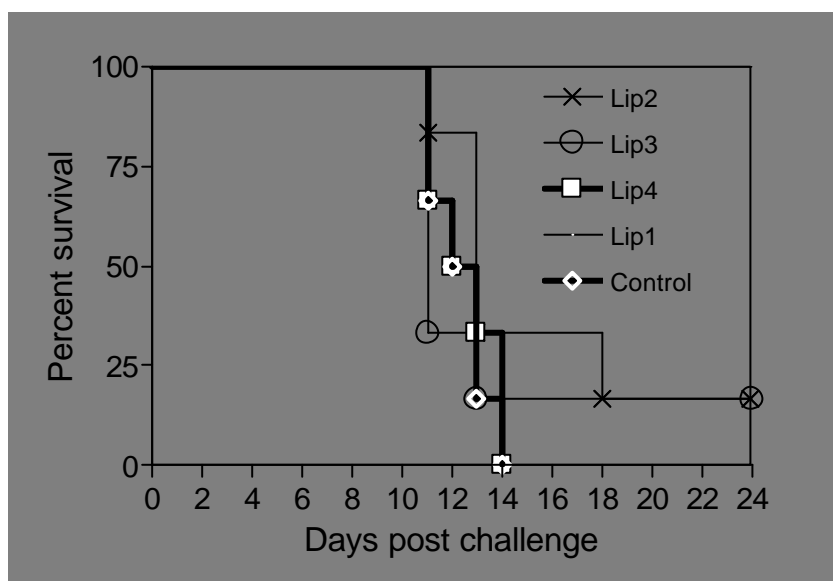


FIGURA 1. Sobrevivência de hamsters imunizados com lipoproteínas recombinantes após o desafio letal com Fiocruz L1-130.

Nossos achados fornecem evidencia que, similar ao obtido com o fragmento de LigA, uma lipoproteína recombinante purificada pode induzir imunidade protetora contra desafio letal em modelo animal de leptospirose. Além

disso, a eficácia desta formulação com Lip1 foi demonstrada em hidróxido de alumínio, um adjuvante aceito para o uso em humano e animal.

Embora nossos resultados sejam promissores, o mecanismo de imunoproteção em leptospirose permanece desconhecido. Existe a necessidade de estudos direcionados para definir qual imunidade resulta da imunização com lipoproteínas recombinantes. Experimentos objetivando a avaliação da proteção passiva estão sendo realizados por nosso grupo, além de estudos com dose-resposta com diferentes doses.

Em nosso estudo, nós identificamos uma lipoproteína que quando administrada com hidróxido de alumínio foi hábil em conferir proteção em hamsters (100%, $p < 0,001$). Futuros experimentos serão realizados para confirmar este resultado e determinar a mínima dose de proteína a ser administrada nos animais, o que pode reduzir consideravelmente o custo por dose, tornando o seu uso acessível para humanos e animais.

REFERÊNCIAS

- BHARTI, A. R., J. E. NALLY, J. N. RICALDI, M. A. MATTHIAS, M. M. DIAZ, M. A. LOVETT, P. N. LEVETT, R. H. GILMAN, M. R. WILLIG, E. GOTUZZO, and J. M. VINETZ. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect. Dis.** 3:757–771
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72:248-254.
- BRANGER, C., B. CHATRENET, A. GAUVRIT, F. AVIAT, A. AUBERT, J. M. BACH, AND G. ANDRE-FONTAINE. 2005. Protection against *Leptospira interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. **Infect. Immun** 73:4062–4069.
- FAISAL, S. M., W. YAN, C. CHEN, R. U. M. PALANIAPPAN, S. P. MCDONOUGH, and Y CHANG. 2007. Evaluation of protective immunity of *Leptospira* immunoglobulin like protein A (LigA) DNA vaccine against challenge in hamsters. **Vaccine.** 26:277-287.

- FIKRIG, E., S. W. BARTHOLD, F. S. KANTOR, AND R. A. FLAVELL. 1990. Protection of mice against the Lyme disease agent by immunizing with recombinant OspA. **Science** 250:553–556.
- GUERREIRO, H., J. CRODA, B. FLANNERY, M. MAZEL, J. MATSUNAGA, M. GALVÃO REIS, P. N. LEVETT, A. I. KO, AND D. A. HAAKE. 2001. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. **Infect Immun.** 69:4958-4968.
- HAAKE, D. A., M. K. MAZEL, A. M. MCCOY, F. MILWARD, G. CHAO, J. MATSUNAGA, and E. A. WAGAR. 1999. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. **Infect. Immun.** 67:6572–6582.
- KYD, J. M., M. L. DUNKLEY, and A. W. CRIPPS. 1995. Enhanced respiratory clearance of nontypeable *Haemophilus influenzae* following mucosal immunization with P6 in a rat model. **Infect. Immun.** 63:2931–2940
- KO, A. I., M. GALVAO REIS, C. M. RIBEIRO DOURADO, W. D. JOHNSON, JR., AND L. W. RILEY. 1999. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **Lancet** 354:820–825.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2003. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. World Health Organization, Malta.
- HOTEZ, P. J., e M. T. FERRIS. 2006. The antipoverty vaccines. **Vaccine.** 24:5787-5799.
- PALANIAPPAN, R. U., S. P. MCDONOUGH, T. J. DIVERS, C. S. CHEN, M. J. PAN, M. MATSUMOTO, AND Y. F. CHANG. 2006. Immunoprotection of recombinant leptospiral immunoglobulin-like protein A against *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection. **Infect Immun.** 74:1745–1750.
- SEIXAS, F. K., E. F. SILVA, D. D. HARTWIG, G. M. CERQUEIRA, M. AMARAL, M. Q. FAGUNDES, R. G. DOSSA, AND O. A. Dellagostin. 2007. Recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. **Vaccine.** 26:88-95.
- SILVA, E. F., M. A. MEDEIROS, A. J. MCBRIDE, J. MATSUNAGA, G. S. ESTEVES, J. G. RAMOS, C. S. SANTOS, J. CRODA, A. HOMMA, O. A. DELLAGOSTIN, D. A. HAAKE, M. G. REIS, and A. I. KO. 2007. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers

protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**. 25:6277-6286.

VON SPECHT B.-U., B. KNAPP, G. MUTH, M. BROKER, K.-D. HUNGERER, K.D. DIEHL, K. MASSARRAT, A. SEEMANN, and H. DOMDEY. 1995. Protection of immunocompromised mice against lethal infection with *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F and outer membrane protein I fusion proteins. **Infect. Immun.** 63:1855–1862.