



AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE DUAS VACINAS CONSTITUÍDAS POR PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE MEMBRANA EXTERNA DE *Leptospira* SPP. EM MODELO ANIMAL DE INFECÇÃO AGUDA

**ELIAS EDUARDO BARBOSA DA ROSA¹; LIANA NUNES BARBOSA²;
CAROLINA RODRIGUES FÉLIX³; GUILHERME AUGUSTO ROSA⁴; ALICE
LEMONS DE ÁVILA⁵; ALAN JOHN ALEXANDER MCBRIDE⁶**

^{1,2,3,4,5,6}Laboratório de Pesquisas em Doenças Infecciosas, Núcleo de Biotecnologia, CDTec, UFPel –

¹eliaseduardobarbosa@gmail.com;

²liana.tlo@gmail.com;

³carolinarodriguesfelix@gmail.com;

⁴guiguilherme.rosa@gmail.com;

⁵alicedeavila2015@gmail.com;

⁶alan.mcbride@ufpel.edu.br.

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é considerada uma zoonose de expressivo alcance e interesse global (ADLER, 2015). O número de novos casos da doença ultrapassa 1 milhão de indivíduos e aproximadamente 59.000 mortes ao ano. Devido à falta de medidas efetivas no que concerne à prevenção, é considerada uma enfermidade de grande impacto na saúde pública em nações subdesenvolvidas (COSTA et al., 2015). Além disso, a sintomatologia em humanos é facilmente confundida com outras doenças como a gripe sazonal ou ainda dengue e malária, que, aliada à subnotificação, potencializam a constância da doença em países tropicais (MCBRIDE et al., 2005). No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, em 2019, houve 3.389 casos confirmados e 280 óbitos (SAÚDE, 2020).

Tendo em vista a magnitude da doença, o desenvolvimento de uma vacina eficiente e universal é imprescindível. Todavia, as vacinas clássicas disponíveis atualmente são elaboradas com a bactéria inativada que induzem proteção de curta duração e desencadeiam resposta imune somente contra os sorovares presentes na composição vacinal. Sendo assim, uma abordagem promissora é o desenvolvimento de vacinas recombinantes que utilizem como antígeno proteínas da membrana externa do patógeno visto que estas estruturas estão em contato direto com o organismo hospedeiro (GRASSMAN et al., 2017).

Dessa forma, este trabalho teve por objetivo testar em modelo animal duas vacinas constituídas por regiões expostas de proteínas da membrana externa de leptospiros com potencial imunoprotetor. Ambas as proteínas, nomeadas como CSIP06+CSIP08 e CSIP13, foram anteriormente identificadas por ferramentas de vacinologia reversa e estrutural e imunoproteômica.

2. METODOLOGIA

2.1 Expressão e caracterização das proteínas: A expressão dos antígenos alvos foi realizada utilizando sistema de expressão padrão em *Escherichia coli*. Os plasmídeos sintéticos foram construídos através de ferramentas de bioinformática com as sequências para cada proteína com gene de resistência ao antibiótico ampicilina. Os plasmídeos foram inseridos através de transformação por choque térmico em células competentes de *E. coli* cepas BL21 (DE3) Star. Posteriormente, inóculos bacterianos foram realizados a partir de colônias transformadas crescidas em meio Luria Bertani (LB) acrescido do antibiótico seletivo ampicilina (100 µg/ml) a



37 °C. A expressão em larga escala foi realizada em meio LB acrescido de ampicilina até atingir densidade óptica de 0.4-0.8 e então, as expressões das proteínas foram induzidas com IPTG (isopropil β-D-1-tiogalatopiranosídeo) 0.5-1M (concentração final 1mM) por 3 a 4h. As proteínas expressas obtidas foram purificadas utilizando cromatografia de afinidade ao níquel em sistema ÄKTA. Em seguida, foram realizadas diálises em tampão PBS (*phosphate buffered saline*) ou Tris (tris-hidroximetil-aminometano) 50mM 1x das proteínas a fim de reduzir a concentração de ureia nas amostras, bem como, a quantificação das proteínas por kit de BCA (Pierce, Thermo Scientific). Além disso, foi realizado *Western blot* das proteínas para avaliar se eram recombinantes. Para isso, a membrana foi encubada a 4 °C por 16h com solução BSA (albumina do soro bovino) 1% em PBS-T 1x. Após isso, a membrana ficou em contato por 1h com anticorpo anti-polyhistidina conjugado com peroxidase diluído 1:5000 (Sigma-Aldrich). Por fim, a reação foi revelada por quimioluminescência utilizando substrato ECL (Pierce, Thermo Scientific) no equipamento C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biosciences).

2.2 Imunização e desafio dos animais: As formulações vacinais foram preparadas com as proteínas recombinantes e PBS 1x conjugadas em adjuvante de hidróxido de alumínio (Alhydrogel, InvivoGen) 2% por 16h a 4 °C sob leve agitação. Para o controle negativo, foi feito o mesmo processo e fórmula, mas sem as proteínas. No Experimento I foi testada a proteína CSIP06+CSIP08 e no Experimento II a proteína CSIP13 sendo ministradas duas doses contendo 50 µg de antígeno (150 µl/dose) nos dias 0 e 14. Os testes foram feitos em modelo animal hamster da espécie *Mesocricetus auratus* com ambos os sexos de 4-9 semanas (N=9 ou 10 animais). Todos possuíam peso máximo de 150 g no dia da primeira dose da imunização. No dia 29, foram desafiados via intraperitoneal utilizando uma dose letal de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 na concentração de 50 leptospiros/ml (10x DL₅₀). Após isso, os animais foram avaliados diariamente por 28 dias e eutanasiados mediante apresentação de sinais de leptospirose baseados na avaliação de score clínico. Foram coletados os órgãos rim, baço, pulmão e fígado de todos os animais imunizados e desafiados para posteriores análises de histopatologia. Ademais, foram feitas quatro coletas de sangue nos dias 0 (pré-imunização), 14 (2 semanas pós 1ª dose), 28 (pré-desafio) e no dia das eutanásias para futura determinação do título de anticorpos. Por último, com o objetivo de reisolar as bactérias, foi feita a maceração de um dos rins em meio EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris/Difco) líquido para cultivos *in vitro*. Cabe salientar que os experimentos foram realizados de acordo com todas as normativas de bem-estar aplicadas pelos órgãos responsáveis pela ética e experimentação animal. Da mesma forma, esse projeto foi submetido, e aprovado, pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), sob o número de registro CEEA 59050-2018.

2.3 Análise estatística: As análises estatísticas e gráficos dos experimentos foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 7.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obteve-se sucesso nas transformações por choque térmico bem como na expressão, solubilização e purificação das proteínas. O *Western blot* confirmou que as proteínas eram recombinantes e tinham o tamanho esperado de 22,4 kDa e 29,6

kDa para as proteínas CSIP06+CSIP08 e CSIP13, respectivamente. Quanto à quantificação, CSIP13 apresentou 2,24 mg/ml, evidenciando alta concentração e ótimo rendimento resultante da expressão em larga escala, o que pode ser confirmado com base no tamanho da banda na Figura 1. Já a proteína CSIP06+CSIP08 possuía 0,39 mg/ml, rendimento menor quando comparado a proteína CSIP13, mas ainda assim satisfatório para a finalidade proposta para essa proteína.

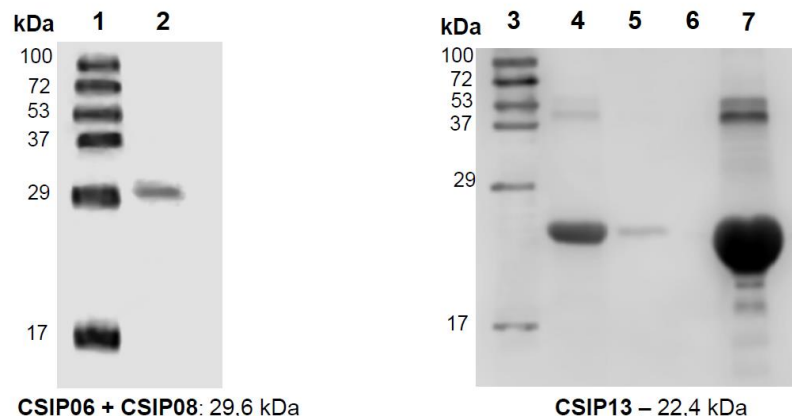


Figura 1. Western blot das proteínas expressas. Poços: 1) e 3) Marcador de massa molecular (Ludwig); 2) Proteína CSIP06+CSIP08 – 29,6 kDa; 4) Proteína CSIP13 diluída 1:10 – 22,4 kDa; 5) CSIP13 diluída 1:100; 6) Ausência de amostra; 7) CSIP13 sem ser diluída. As proteínas foram corridas com 20 µl e o marcador com 15 µl por poço.

Em relação à eficácia das vacinas, nenhuma das duas vacinas foi capaz de conferir proteção significativa aos animais desafiados com leptospiros patogênicos, conforme mostra a Figura 2. Para a proteína CSIP06+CSIP08 nenhum animal sobreviveu ao desafio letal [0/9, 0% proteção, ($P = 0,1576$)], enquanto 1 animal sobreviveu para a CSIP13 [1/10, 10% de proteção, ($P = 0,4029$)]. Além disso, no grupo controle negativo imunizado com PBS do Experimento I, 1 animal sobreviveu. Já no Experimento II não houve sobreviventes neste grupo. Quando comparados ao controle negativo, tais proteínas não foram capazes de gerar uma proteção significativa contra o desafio.

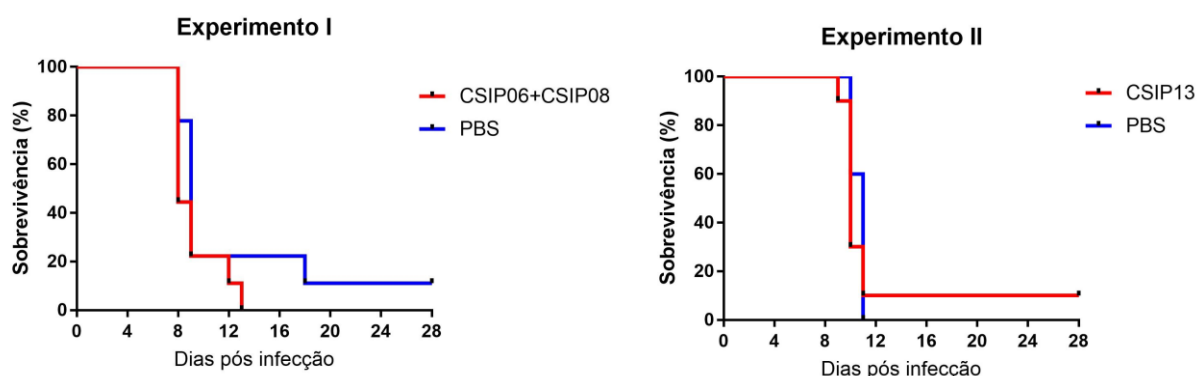


Figura 2. Sobrevivência dos animais imunizados nos Experimentos I e II utilizando as proteínas recombinantes CSIP06+CSIP08 e CSIP13. No experimento I, o N foi de 9 animais, enquanto no experimento II, o N foi de 10 animais por grupo. Os animais imunizados com as vacinas constituídas pelas proteínas recombinantes (em vermelho) e controle PBS (em azul) foram desafiados com inóculo letal de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130.



Com relação à sintomatologia pode-se destacar: perda de peso maior ou igual a 10%, visíveis alterações de comportamento como falta de resposta aos estímulos, lentidão nos movimentos e isolamento nos cantos das caixas. Da mesma forma, todos os animais que desenvolveram leptospirose e que foi possível a coleta de órgãos foram cultura positiva. Já os animais que sobreviveram ao desafio letal nos experimentos, resultaram cultura negativa para presença de leptospirosas.

4. CONCLUSÕES

Deste trabalho, conclui-se que houve sucesso no protocolo utilizado para a transformação e expressão das proteínas recombinantes, todavia ambas as candidatas a vacina não apresentaram eficácia frente ao desafio. Essa é uma grande problemática no desenvolvimento de vacinas contra leptospirose, pois mesmo quando as análises dos alvos vacinais *in silico* são promissoras outros aspectos ainda são limitantes e amplamente discutidos na literatura, tais como: a de falta consenso sobre o modelo animal ideal, cepa e a dose de desafio; baixa reprodutibilidade entre os experimentos; e a ausência de correlatos de imunidade para leptospirose. Motivos elencados como os maiores obstáculos para o avanço dos testes para além da fase pré-clínica (FÉLIX et al., 2019).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, B. **Leptospira and Leptospirosis**. Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer-Verlag Berlin/Heidelberg, 2015

COSTA, F., et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Negl Trop Dis**, University of Tennessee, United States, v.9, n.9, p. 1-19. 2015.

FELIX, C. R., SIEDLER, B. S., BARBOSA, L. N., TIMM, G. R., MCFADDEN, J., & MCBRIDE, A. J. A. (2019). An overview of human leptospirosis vaccine design and future perspectives. **Expert Opinion on Drug Discovery**, 1–10. doi:10.1080/17460441.2020.1694508

GRASSMANN, A.A., SOUZA, J.D. & MCBRIDE, A.J.A. A Universal Vaccine against Leptospirosis: Are We Going in the Right Direction? **Frontiers in Immunology**, Lausanne, Switzerland. v.8, p.1-8, 2017

MCBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G.; KO, AI. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Disease**. 18, 376-386, 2005.

PORTAL DO MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Situação Epidemiológica da Leptospirose**, Brasil, 04 de set. 2020. Acessado em 04 de set. de 2020. Online. Disponível em: <https://saude.gov.br/saude-de-a-z/leptospirose>