

VACINA DE SUBUNIDADE RECOMBINANTE CONTENDO ANTÍGENO DE MEMBRANA CONFERE PROTEÇÃO CONTRA LEPTOSPIROSE

TIFFANY THUROW BUNDE¹; NATASHA RODRIGUES DE OLIVEIRA²; MARA ANDRADE COLARES MAIA³; ANA CAROLINA KURZ PEDRA⁴; ALAN JOHN ALEXANDER MCBRIDE⁵; ODIR ANTÔNIO DELLAGOSTIN⁶

¹Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – tiffany_bia@hotmail.com

²Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – oliveira_natasha@hotmail.com

³Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – maracamaia@hotmail.com

⁴Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – caarolpedra@hotmail.com

⁵Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – alanmcb@gmail.com

⁶Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – odir@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença infecciosa causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, sendo a principal zoonose em termos de mortalidade e morbidade em todo o mundo (COSTA et al., 2015). No Brasil, a leptospirose é uma doença endêmica, tornando-se epidêmica em períodos chuvosos devido às enchentes associadas, à aglomeração populacional de baixa renda, às condições inadequadas de saneamento e à alta infestação de roedores infectados nas imediações urbanas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

A medida de controle mais eficaz contra a leptospirose é a vacinação através da utilização de bacterinas, as quais são amplamente aplicadas em animais, porém licenciadas para uso em humanos em um número reduzido de países (DELLAGOSTIN et al. 2011). Estas formulações apresentam efeitos adversos, conferem proteção apenas contra os sorovares que compõem a vacina e induzem uma proteção de curta duração, sendo necessário reforços anuais (KOIZUMI e WATANABE, 2005). Considerando essas limitações, diversos estudos têm focado no desenvolvimento de vacinas recombinantes contra a leptospirose. Essa abordagem permite selecionar proteínas conservadas em espécies patogênicas e expostas na membrana externa, com potencial de estimular uma resposta de memória imunológica e reduzir os efeitos colaterais devido ao seu elevado grau de pureza (DELLAGOSTIN et al., 2011; GRASSMAN et al., 2017).

Dessa forma, nosso grupo de pesquisa identificou novos potenciais alvos vacinais, utilizando uma abordagem de vacinologia reversa e estrutural, foram apontadas diversas proteínas preditas como barril- β -transmembrana (β b-OMP) presentes na superfície da bactéria (GRASSMAN et al., 2017). Essas proteínas são conservadas em algumas espécies patogênicas, possuindo funções associadas ao transporte de moléculas essenciais ao metabolismo celular. Dentre estas, destacou-se uma proteína β b-OMP, que contém um domínio de transportador de alginato, uma molécula presente na composição de biofilmes, podendo estar envolvida na patogênese e colonização renal do hospedeiro. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade imunoprotetora de uma construção recombinante contendo regiões expostas de um dos

antígenos de membrana externa (β b-OMP), em modelo animal. A identidade da proteína não será revelada por razões de proteção da propriedade intelectual.

2. METODOLOGIA

2.1 Produção e caracterização da proteína recombinante: o gene que codifica para a proteína em estudo foi sintetizado quimicamente, contendo apenas os fragmentos expostos na membrana externa de *Leptospira* sp. e clonado no vetor pAE. Posteriormente o plasmídeo pAE/r **β b-omp** foi utilizado para transformar *Escherichia coli* BL21(DE3) Star por choque térmico. A indução da expressão da proteína recombinante foi realizada com 0,5 M de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Após a indução a cultura foi centrifugada e as células foram lisadas por sonicação, as proteínas recombinantes foram solubilizadas em tampão contendo 8 M de ureia como agente desnaturante. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade utilizando coluna de Níquel-Sepharose. As alíquotas contendo a proteína purificada foram dialisadas com tampão contendo concentrações sucessivamente decrescentes de ureia. A caracterização da r **β b-OMP** foi feita através de SDS-PAGE 12%, seguido de *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-6xHis e *pool* de soros humanos e bovinos positivos para leptospirose.

2.2 Avaliação da capacidade imunoprotetora da proteína recombinante: hamsters fêmeas de quatro a cinco semanas de idade foram utilizados para avaliar a capacidade imunoprotetora. Dez animais foram inoculados com a proteína recombinante e dez animais foram inoculados com uma solução salina (PBS) (controle negativo). Cada dose da vacina conteve 50 μ g do antígeno associado ao adjuvante hidróxido de alumínio, Alhydrogel® adjuvant 2% (InvivoGen), assim como o controle negativo. Foram realizadas duas imunizações com 14 de intervalo e três coletas de sangue nos dias 0, 14 e 28. O desafio foi realizado 14 dias após a última imunização, utilizando 10 x a ED₅₀ de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130. Após o desafio, os animais foram acompanhados durante 28 dias, ao fim do experimento os animais sobreviventes foram eutanasiados, seguido da coleta do rim, pulmão e fígado para análise histopatológica. Para o reisolamento do patógeno, foi realizada a coleta de um dos rins, maceração e cultivo em meio líquido EMJH por até 12 semanas. Foram realizados dois experimentos independentes.

2.3 Avaliação da resposta humoral: Para avaliar a resposta humoral dos animais imunizados, foi realizado ELISA indireto conforme descrito previamente (CONRAD et al., 2017). Para a sensibilização foi utilizada 50 ng de r **β b-OMP** por cavidade. A placa foi bloqueada com leite em pó desnatado 5% a 37 °C, posteriormente foi incubada com soro dos animais imunizados a uma diluição de 1:50. Anti-IgG de hamster conjugado com peroxidase (1:5000) foi utilizado como anticorpo secundário. A reação foi desenvolvida pela adição de peróxido de hidrogênio e diaminobenzidina (DAB). Todas as amostras foram avaliadas em triplicata e a absorbância foi determinada a 492 nm.

2.4 Análise estatística: A análise estatística dos resultados dos grupos foi realizada por ANOVA. Para determinar diferença significativa nas taxas de mortalidade foi utilizado o Teste de Fisher.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão da proteína recombinante, assim como a sua solubilização em ureia e purificação por cromatografia foi eficiente. O *Western blot* com anti-histidina confirmou a identidade da proteína recombinante com o tamanho esperado de ~36 kDa. A proteína foi reconhecida pelos soros humanos e bovinos positivos para leptospirose, comprovando a sua antigenicidade e expressão durante a infecção (dados não apresentados).

Todos os animais imunizados com a proteína recombinante apresentaram 100% de proteção frente ao desafio letal com a cepa de *L. interrogans* (Figura 1). Todos os animais do grupo controle apresentaram sinais clínicos característicos de leptospirose e critérios para eutanásia entre os dias 10 e 13 pós-infecção, no primeiro experimento, e entre os dias 15 e 16 no segundo experimento. Este número de sobreviventes constitui uma proteção estatisticamente significativa ($p > 0,0001$). Não houve reisolamento de leptospiros dos rins dos animais sobreviventes, indicando uma possível indução de imunidade esterilizante. A análise histopatológica dos órgãos encontra-se em andamento.

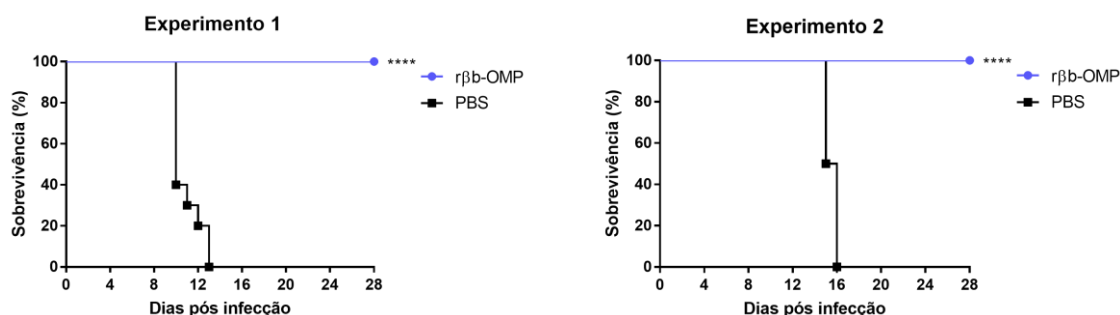


Figura 1. Gráfico de sobrevivência dos animais imunizados com a proteína recombinante, desafiados com inoculo letal de *L. interrogans*. Os gráficos são representativos dos dois experimentos realizados. **** $P < 0,0001$ indica diferença estatisticamente significativa entre o grupo dos imunizados e o controle (PBS) pelo teste de Fisher.

O ELISA indireto demonstrou que todos os animais imunizados com a proteína recombinante apresentaram níveis significativos de imunoglobulinas ($P > 0,05$) quando comparados ao grupo controle no dia 28, em ambos os experimentos. Entretanto, no segundo experimento os níveis de anticorpos foram maiores que no primeiro experimento. De acordo com ANOVA, no primeiro experimento houve produção de anticorpos anti-rβb-OMP no dia 14 com diferença estatisticamente significativa em relação ao dia 28 (Figura 2).

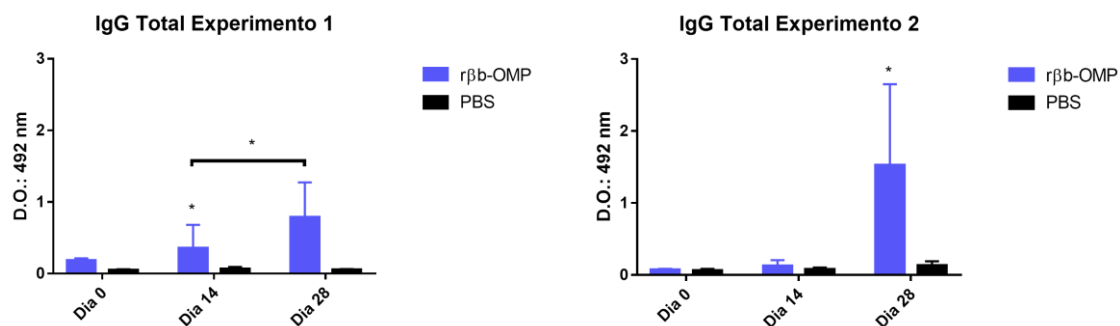


Figura 2. Resposta imune humoral dos animais imunizados com a proteína recombinante, amostras foram realizadas em triplicata. Os gráficos são representativos dos dois experimentos realizados.

representativos dos dois experimentos. As barras representam o desvio padrão. *indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos. $P < 0,0001$.

4. CONCLUSÕES

A proteína recombinante estudada é imunoprotetora, já que houve uma proteção de 100% nos animais imunizados, assim como também induziu uma possível imunidade esterilizante, estes dados ainda serão confirmados por análises moleculares. Além disso, a proteína recombinante foi capaz de induzir uma resposta imune humoral. Futuramente, realizaremos desafios heterólogos para avaliar a capacidade de imunoproteção bem como testes com diferentes doses e adjuvantes, buscando desenvolver uma vacina mais eficaz em uma estratégia inovadora nesta área.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. DE LA P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary microbiology**, v. 140, p. 287–296, 2010.

CONRAD, N. L. et al. LigB subunit vaccine confers sterile immunity against challenge in the hamster model of leptospirosis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 3, p. 1–20, 2017.

COSTA, F. et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. e0003898, 2015.

DELLAGOSTIN, O. A. et al. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Human vaccines**, v. 7, n. 11, p. 1215–24, 2011.

GRASSMANN, A. A. et al. Discovery of Novel Leptospirosis Vaccine Candidates Using Reverse and Structural Vaccinology. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 463, 2017.

HAAKE, D. A.; LEVETT, P. N. Leptospirosis in humans. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 387, p. 65–97, 2015.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. **Vaccine**, v. 22, n. 11–12, p. 1545–1552, 2004.

MCBRIDE, A. J. A. et al. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 18, n. 5, p. 376–386, 2005.