

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROTETOR DE LigA E LipL32 APRESENTADAS COMO VACINAS DE DNA EM ESTRATÉGIA DE “PRIME- BOOST” HOMÓLOGO E HETERÓLOGO

COLONETTI, Karina¹; FAGUNDES, Michel Quevedo²; SEIXAS NETO, Amilton Clair Pinto³; MEDEIROS, Marco Alberto⁴; SILVA, Éverton Fagonde⁵

¹Universidade Federal de Pelotas, Graduação em Biotecnologia; ²Universidade Federal do Rio Grande; ³Universidade Federal de Pelotas, Pós-graduação em Biotecnologia; ⁴BioManguinhos, FIOCRUZ/RJ; ⁵Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Veterinária Preventiva.
kcolonetti@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma das zoonoses mais disseminadas e de maior impacto econômico e social no mundo, principalmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, com clima tropical e subtropical (KO et al., 2009). Ela pode ser causada por qualquer um dos mais de 260 sorovares patogênicos das espiroquetas do gênero *Leptospira* spp (CERQUEIRA e PICARDEAU, 2009). A transmissão é realizada através do contato direto ou indireto com a urina dos animais infectados (ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

A vacinação é uma medida empregada para diminuir o número de casos da doença em animais. No entanto, a vacina disponível é uma bacterina, ou seja, uma preparação de leptospiros inativadas e adjuvante (FAINE et al., 1999). Suas principais limitações residem no fato de induzirem proteção de curta duração apenas contra os sorovares presentes na formulação e apresentarem reações adversas após a administração (LEVETT, 2001). Tendo em vista estas limitações, novas estratégias vêm sendo desenvolvidas para a leptospirose e outras enfermidades, como o estudo de vacinas com subunidades proteicas (ADLER e MOCTEZUMA, 2010) e vacinas de DNA (CUI, 2005). O princípio “prime-boost” é baseado em imunizações múltiplas, sejam elas homólogas, onde o ‘prime’ é semelhante ao ‘boost’ ou heterólogas, onde o ‘boost’ difere do ‘prime’ (LU, 2009). Aplicado à leptospirose, ainda existem poucos estudos nesta área.

Dessa forma, o presente trabalho visou avaliar o potencial protetor de duas sequências gênicas altamente conservadas entre os sorovares patogênicos de *Leptospira* (genes *lipL32* e *ligA*), as quais codificam para proteínas de fácil acesso ao sistema imune, quando administradas isoladamente (*prime-boost* homólogo) ou coadministradas com seu produto proteico (*prime-boost* heterólogo).

2 METODOLOGIA

A cepa utilizada para a extração de DNA e o ensaio de desafio homólogo em modelo animal, foi *Leptospira interrogans* FIOCRUZ L1-130, a qual foi cultivada em meio líquido EMJH a 30°C. Para a expressão da proteína recombinante LipL32, utilizou-se o plasmídeo *pAE/lipL32* (SEIXAS et al 2007). Tanto as vacinas de DNA com LipL32 (sequência inteira) e LigA (131-1224), quanto a proteína rLigA (131-1224aa) foram obtidas através de colaboração com o Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER), Biomanguinhos (BM-FIOCRUZ/RJ).

A expressão das proteínas recombinantes foi confirmada através de *Western blotting* (WB), utilizando soros de animais convalescentes e anticorpo

monoclonal anti-cauda poli-histidina conjugado com peroxidase (Sigma) na diluição 1:3.000, conforme instruções do fabricante, e revelação com DAB/H₂O₂. Para a caracterização dos plasmídeos de DNA, células HEK293 foram transfectadas com os plasmídeos *pVAX/LipL32* e *pVAX/LigA* em uma placa de seis cavidades utilizando Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, USA) de acordo com o protocolo do fabricante. Transcorridas 48 horas depois da transfecção, as células foram lavadas duas vezes com PBS mantido em banho de gelo e lisadas com tampão de lise contendo SDS por 10 min no gelo. Os lisados celulares foram fervidos e centrifugados a 12.000 x g a 4°C por 10 min. As soluções do sobrenadante foram coletadas e analisadas por *WB*, nas mesmas condições utilizadas para a avaliação das proteínas recombinantes.

Para os experimentos *in vivo*, 48 hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos, com quatro semanas de idade, foram divididos em oito grupos vacinais, quatro para LigA e quatro para LipL32. As imunizações ocorreram por via intramuscular nos dias 0 e 21, conforme Tab. 1 e Tab. 2. Duas amostras de sangue (dias 0 e 42) foram coletadas por punção do plexo venoso retro-orbital no dia anterior à primeira imunização e antes do desafio.

Tabela 1: Imunizações com vacina de DNA e subunidade com LigA

Grupo vacinal	Primeira dose	Segunda dose
pVaxLigA	100ng pVaxLigA	100ng pVaxLigA
pVaxLigA + rLigA + Al(OH)₃	100ng pVaxLigA	40µg LigA + Al(OH) ₃
pVax	100ng pVax	100ng pVax
pVax + Al (OH)₃	100ng pVax	Al(OH) ₃

O desafio dos animais foi realizado através da via intraperitoneal, 14 dias após a segunda dose. A dose de desafio utilizada foi de 10³ leptospiras por animal, ajustada por contagem em câmara de Petroff-Hauser e diluição em PBS.

Tabela 2: Imunizações com vacina de DNA e subunidade com LipL32

Grupo vacinal	Primeira dose	Segunda dose
pVaxLipL32	100 ng pVaxLipL32	100ng pVaxLipL32
pVaxLipL32 + rLpL32 + Al(OH)₃	100ng pVaxLipL32	40µg LipL32+ Al(OH) ₃
pVax	100ng pVax	100ng pVax
pVax + Al (OH)₃	100ng pVax	Al(OH) ₃

Para a análise da resposta imune humoral, realizou-se o ensaio de imunoenzimático de absorção, o ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*. Após o *checkerboard titration*, as placas de poliestireno foram sensibilizadas com 100ng de proteína LipL32 ou 50ng de LigANI purificadas, lavadas com PBS-T e bloqueadas com leite em pó 1%. Após nova lavagem, colocou-se os soros diluídos 1:3200 (LipL32) ou 1:6400 (LigANI) em PBS-T e incubou-se a 37°C por 1 hora. A seguir foram feitas três lavagens com PBS-T e adicionado o soro anti-imunoglobulina de hamster conjugado com peroxidase na diluição de 1:6000 (Dako, USA), seguido por uma incubação a 37°C por 1 hora. Após cinco novas lavagens com PBS-T adicionou-se o substrato ELISA-OPD Peroxidase (Sigma, USA) o qual foi mantido por 15 minutos a temperatura ambiente em local escuro. A leitura da densidade óptica (D.O.) foi realizada a 450nm.

Todas as análises estatísticas e os gráficos de sobrevivência foram realizados no programa *Prisma 4 for Windows* versão 4.03. O teste de Fisher foi utilizado para a análise de mortalidade e o *LogRank Test* foi utilizado para a análise de sobrevivência. O Teste *T de Student* foi utilizado para a análise do ELISA. Este projeto está cadastrado no COCEPE/UFPel sob o número 5.00.00.019 e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPel, processo nº 23110.004657/2010-84, cadastro nº CEEA 4657, financiado pela FAPERGS (Processo 11/1832-3).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises realizadas com WB para a caracterização das construções plasmidiais apresentaram as massas moleculares esperadas para LigA e LipL32, tanto no extrato celular quanto no sobrenadante. Nenhuma banda foi verificada nos controles (pVax e HEK). Resultados positivos também foram observados na caracterização das proteínas, tanto por WB ou SDS-PAGE. Estes resultados confirmaram a expressão celular das vacinas de DNA, bem como no reconhecimento das proteínas recombinantes pelos soros convalescentes e anti-cauda de histidina.

O experimento realizado com LigA (Tab.1) revelou um único animal sobrevivente (16,7%, n=6), o qual pertencia ao grupo vacinado com pVaxLigA+rLigA+Al(OH)₃. Os demais animais foram a óbito entre os dias 9 e 11 pós-desafio. Já o experimento com a vacina de DNA expressando a proteína LipL32 (Tab.2) revelou que o grupo que recebeu duas doses de pVaxLipL32 houve uma proteção de 100%, enquanto o grupo que recebeu pVaxLipL32+rLipL32+Al(OH)₃ apresentou uma proteção de 50% dos animais. É importante ressaltar que nenhum animal sobreviveu nos grupos pVax e Al(OH)₃, considerados como controles negativos. Os óbitos ocorreram entre os dias 8 e 15 pós-desafio (Fig.1).

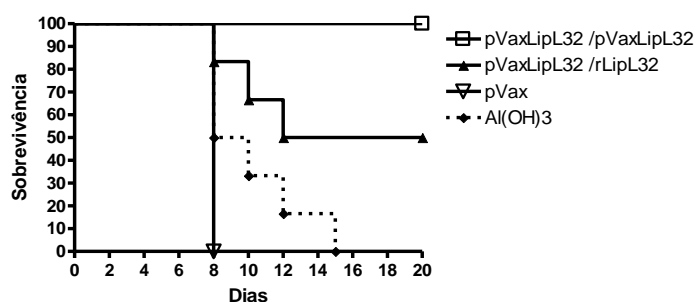


Figura 1 – Curva de sobrevivência dos animais imunizados com vacina de DNA expressando LipL32.

Ao realizar a análise da mortalidade usando o *Fisher's test*, comparando-se os tratamentos com os grupos controle negativo, a proteção conferida com significância estatística foi obtida apenas aos animais imunizados com pVaxLipL32 (p=0,002). Entretanto, quando a análise de sobrevivência através do *Logrank test* foi realizada, tanto o grupo pVaxLipL32 (p=0,009) quanto pVaxLipL32+rLipL32+Al(OH)₃ (p=0,005) conferiram proteção com significativa quando comparados com os respectivos grupos controle.

Em relação a análise dos ELISA realizados com os soros dos animais vacinados com pVax expressando LigA, nenhum grupo apresentou diferença estatística significativa. Já o resultado dos ELISA realizados com os animais imunizados com as vacinas de DNA expressando LipL32 exibiu uma diferença estatística significativa quando comparou-se as absorbâncias entre os grupos imunizados com pVaxLipL32 e o grupo controle pVax ($p < 0,001$). Observou-se diferença também, quando se comparou pVaxLipL32 ($p = 0,006$) com pVaxLigA/rLigAfull + Al(OH)₃ e pVaxLigA/rLigAfull + Al(OH)₃ ($p < 0,001$) e Al(OH)₃ (fig.2).

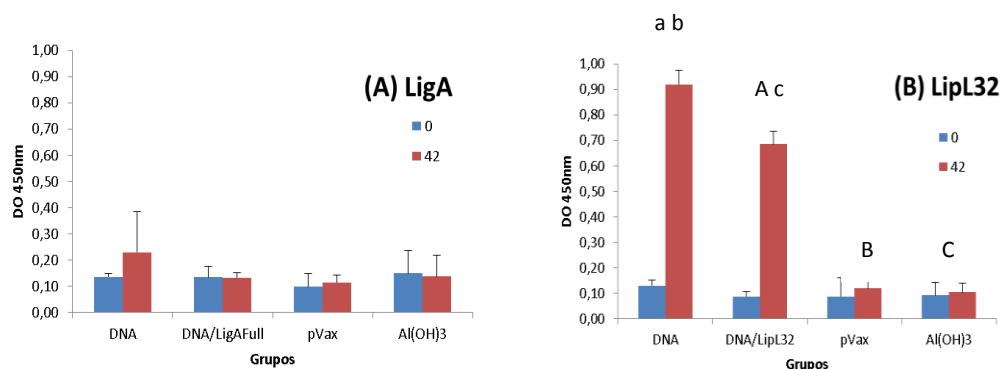


Figura 2 - Imunogenicidade das vacinas de DNA em ELISA indireto.

4 CONCLUSÃO

A vacina de DNA pVAX/LipL32 é um candidato promissor para o desenvolvimento de uma vacina recombinante contra a leptospirose. O próximo passo será testar a capacidade da vacina em proteger hamsters perante um desafio letal com cepa heteróloga.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, B., MOCTEZUMA, A. P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 287-296, 2010.
- CERQUEIRA, G.M.; PICARDEAU, M. A century of *Leptospira* strain typing. **Infection and Genetic Evolution**, v.9, n.5, p.760-768, 2009.
- CUI, Z. DNA vaccine. **Advanced Genetics**, v.54, p.257-289, 2005.
- FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C. A.; PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis**, Austrália, p. 272, 1999.
- FAISAL, S. M.; YAN, W.; CHEN, C. S.; PALANIAPPAN, R. U.; CHANG, Y. F. Evaluation of protective immunity of *Leptospira* immunoglobulin like protein A (LigA) DNA vaccine. **Vaccine**, v.26, n.2, p.277-287, 2008.
- KO, A. I., GOARANT, C., PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 736-747, 2009.
- LEVETT, P. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, p. 296-326, 2001.
- LU, S. heterologous prime-boost vaccination. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, p. 346-351, 2009.
- SEIXAS, F. K.; FERNANDES, C. H.; HARTWIG, D. D.; CONCEIÇÃO, F. R.; ALEIXO, J. A.; DELLAGOSTIN, O. A. Evaluation of different ways of presenting LipL32 to the immune system with the aim of developing a recombinant vaccine against leptospirosis. **Canadian Journal of Microbiology**, v.53, n.4, p.472-479, 2007.