



Form
pt, Ne

AVALIAÇÃO DA LIPOPROTEÍNA RECOMBINANTE LipL53 DE *Leptospira interrogans* COMO VACINA DE SUBUNIDADE CONTRA LEPTOSPIROSE EM HAMSTERS

HARTMANN, Danieli Maria; SILVA, Éverton Fagonde da; FÉLIX, Samuel Rodrigues; SEIXAS, Fabiana Kommling; HARTWIG, Daiane Drawans; CERQUEIRA, Gustavo Maia de; AMARAL, Marta Gonçalves; DELLAGOSTIN, Odir Antônio.

Centro de Biotecnologia – CENBIOT/UFPEI
Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900. danihvet@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença bacteriana que afeta os seres humanos e os animais (WHO, 2003). O número de casos da doença em humanos e animais no mundo não é bem documentado, sendo considerada por isso, como uma doença bacteriana tropical negligenciada (Hotez & Ferris, 2006). Atualmente, as vacinas disponíveis para o uso contra a leptospirose são bacterinas, as quais são amplamente utilizadas em animais, e humanos em alguns países como Cuba, China e Rússia (WHO, 2003).

A resposta imune gerada por estas vacinas é direcionada principalmente contra o lipopolissacarídeo (LPS), uma vez que este é o antígeno imunodominante da membrana externa das leptospiros (Faine et al., 1999). Entretanto, mais de 230 sorovares já foram descritos, com base em diferenças antigênicas, limitando assim a proteção cruzada e de longa duração (Bharti et al., 2003). Por este motivo, a identificação de antígenos protéicos expressos durante a infecção em humanos e animais torna-se importante para o desenvolvimento de novas estratégias para a imunoproteção.

Nos últimos anos, proteínas recombinantes de membrana externa (OMPs) de leptospiros como OmpL1, LipL41, LipL32, e Leptospiral immunoglobulin-Like proteína A (LigA) foram avaliadas como candidatas vacinais potenciais em modelos animais suscetíveis para a leptospirose (Haake et al., 1999; Branger et al., 2005; Faisal et al., 2007). 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 representar estratégias potenciais na proteção contra a leptospirose. Além disso, nós caracterizamos a virulência em modelo experimental suscetível de cinco cepas de *Leptospira*, isoladas no Brasil, e que são pertencentes a sorogrupos causadores de leptospirose no Brasil e no mundo (Silva et al., 2008).

Neste trabalho, relatamos a avaliação preliminar da lipoproteína recombinante LipL53 (rLipL53) de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (LIC), na forma de vacina de subunidade em hamsters, utilizando o hidróxido de alumínio como adjuvante.

Nossos achados revelaram que rLipL53 induziu um nível de proteção significativo em hamsters ($p > 0,001$) contra o desafio homólogo letal com leptospiros patogênicos, quando comparado com o grupo controle imunizado apenas com o adjuvante.

2. MATERIAL E MÉTODOS

L. interrogans sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 foi cultivada em meio EMJH líquido (Difco Laboratories) à 29 °C (WHO, 2003). As cepas TOP10F e BL21(DE3)-RIL de *E. coli* foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) à 37°C.

A partir da análise do genoma de Fiocruz L1-130, primers foram desenhados e a sequência codificadora de LipL53 foi amplificada por PCR e o produto da amplificação foi clonado no vetor de expressão pQE30 (Invitrogen). O plasmídeo recombinante foi usado para transformar cepas de *E. coli* TOP10F através de eletroporação e a lipoproteína recombinante foi purificada através de cromatografia de afinidade usando o sistema de cromatografia líquida ÄKTAPrime (GE Healthscience). Posteriormente foi realizada a diálise e a quantificação da lipoproteína através do método de Bradford (1976).

Grupos de seis hamsters fêmeas com 4 a 5 semanas de idade foram imunizados através da via intramuscular com a mistura da lipoproteína com hidróxido de alumínio (15%). A imunização dos animais foi realizada com duas doses de 80 µg da proteína, com o volume máximo de 250 µL por dose, nos dias 0 e 14. Um grupo controle negativo de hamsters foi imunizado com a mistura de hidróxido de alumínio (15%) e PBS estéril. Os soros pré e pós-imunização foram coletados através de flebotomia do plexo venoso retro-orbital, nos dias 0 e 28, respectivamente.

O desafio homólogo foi realizado com a administração intraperitoneal de 100 leptospiros (2 vezes a dose letal 50%, DL₅₀) da cepa Fiocruz L1-130 (Silva et al., 2008). Após o desafio, os hamsters foram mantidos sob condições controladas e monitorados diariamente quanto ao aparecimento de sinais clínicos da leptospirose.

Os hamsters sobreviventes ao desafio letal foram eutanasiados no dia 24 após o desafio e o sangue, rins, pulmões, e fígado foram coletados para testes sorológicos, cultura bacteriológica e análise histopatológica. O Teste de Fisher e Log-rank *sum test* foram usados para determinar as diferenças estatísticas para mortalidade e sobrevivência, respectivamente, entre o grupo imunizado e o grupo controle.

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, e sob condições de biossegurança (CQB nº 0081/98, de 22/12/98).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O produto da PCR foi clonado no vetor pQE30, expresso em *E. coli* e purificado através do sistema ÄKTAPrime. rLipL53 foi expressa de forma insolúvel, sendo assim solubilizada e purificada usando 8 M de uréia. Após a diálise e a análise por SDS-PAGE, a pureza foi estimada em mais de 90% (Figura 1).

A imunização de hamsters com a mistura contendo a rLipL53 e hidróxido de alumínio conferiu proteção contra o desafio com dose letal. A proteção conferida com duas doses de 80 µg de foi de 100% ($P < 0,001$). Nenhum animal sobreviveu no grupo do controle negativo (Tabela 1).

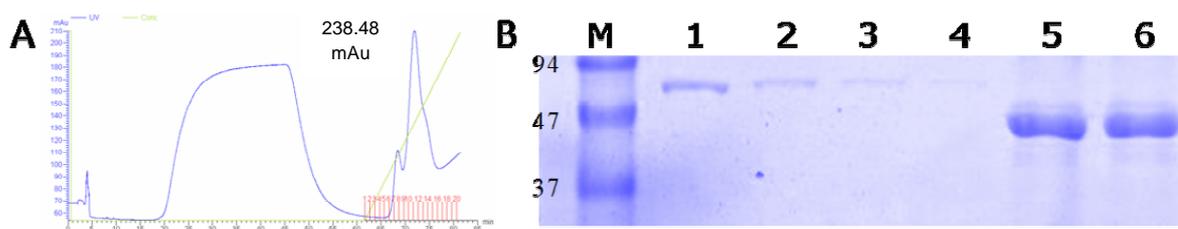


Figura 1. A. Gráfico da purificação de LipL53 através do sistema ÄKTAPrime. B. Eletroforese da proteína purificada em gel de poliacrilamida. M- marcador; 1- BSA 1 µg; 2- BSA 0,5 µg; 3- BSA 0,25 µg; 4- BSA 0,125 µg; 5-6, LipL53.

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

Tabela 1. Proteção conferida pela imunização de hamsters com rLipL53 contra o desafio letal de leptospiros.

Grupo ^a	Dias até a morte	Sobreviventes/total	Proteção (%)
rLipL53	-	6/6	100 ^b
Controle	11,11,12,13,13,14	0/6	0

^a Animais vacinados com duas doses (intervalo de 14 dias) e desafiados com *L. interrogans* Fiocruz L1-130 após 14 dias da última dose.

^b Proteção contra desafio estatisticamente significativo ($P < 0,001$).

Nossos achados fornecem evidência que, similar ao obtido com o fragmento de LigA como vacina de subunidade (Silva et al., 2007), a lipoproteína recombinante purificada LipL53 pode induzir imunidade protetora contra o desafio letal em hamster. Além disso, a eficácia desta formulação com rLipL53 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. É necessário realizar estudos direcionados para conhecer o tipo de resposta imune que resulta em imunidade protetora em modelo animal.

Futuros experimentos serão realizados utilizando a mesma estratégia aqui descrita, para confirmar este resultado e para a triagem de outros alvos candidatos. Além disso, ensaios serão realizados com o objetivo de determinar a dose mínima de rLipL53 a ser administrada em animais que reproduza o mesmo efeito protetor aqui descrito, o que pode reduzir consideravelmente o custo por dose, tornando o seu uso acessível para humanos e animais.

4. CONCLUSÃO

A proteína recombinante LipL53 de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni, quando administrada como vacina de subunidade é capaz de conferir proteção em hamsters contra o desafio letal com *Leptospira* patogênica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICARDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Diseases**, 2003, 3, p. 757–771.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Annals of Biochemistry**. 1976, 72, p. 248-254.
- BRANGER, C.; CHATRENET, B.; GAUVRIT, A.; AVIAT, F.; AUBERT, BACH, J. M. ; ANDRE-FONTAINE, G. Protection against *Leptospira interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. **Infection and Immunity**, 2005, 73, p. 4062–4069.
- FAINE, S; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**, 2nd ed. MediSci, Melbourne, Australia. 1999.
- FAISAL, S. M.; YAN, W.; CHEN, C.; PALANIAPPAN, R. U. M.; MCDONOUGH, S. P.; CHANG, Y. Evaluation of protective immunity of *Leptospira* immunoglobulin like protein A (LigA) DNA vaccine against challenge in hamsters. **Vaccine**, 2007, 26, p. 277-287.
- HAAKE, D. A.; MAZEL, M. K.; MCCOY, A. M.; MILWARD, F.; CHAO, G.; MATSUNAGA, J.; WAGAR, E. A. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. **Infection and Immunity**, 1999, 67, p. 6572–6582.
- HOTEZ, P. J.; FERRIS, M. T. The antipoverty vaccines. **Vaccine**, 2006, 24, p. 5787-5799.
- SEIXAS, F. K.; SILVA, É. F.; HARTWIG, D. D.; CERQUEIRA, G. M.; AMARAL, M.; FAGUNDES, M. Q.; DOSSA, R. G.; DELLAGOSTIN, O. A. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. **Vaccine**, 2007, 26, p. 88-95.
- SILVA, É. F.; MEDEIROS, M. A.; MCBRIDE, A. J. MATSUNAGA, J.; ESTEVES, G. S.; RAMOS, J. G.; SANTOS, C. S.; CRODA, J.; HOMMA, A.; DELLAGOSTIN, O. A.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, 2007, 25, p. 6277-6286.
- SILVA, É. F.; SANTOS, C. S.; ATHANAZIO, D. A.; SEYFFERT, N.; SEIXAS, F. K.; CERQUEIRA, G. M.; FAGUNDES, M. Q.; BROD, C. S.; REIS, M. G.; DELLAGOSTIN, O. A.; KO, A. I. Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in a hamster model. **Vaccine**. 2008, 26, p. 3892-3896.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control**. World Health Organization, Malta. 2003.