

TRIAGEM DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES COMO CANDIDATOS A UMA VACINA CONTRA A LEPTOSPIROSE BOVINA

JÉSSICA WALDMAN¹; KARINA COLONETTI²; AMILTON SEIXAS NETO³; NAJARA BITTENCOURT⁴; ÉVERTON FAGONDE DA SILVA⁵

¹Universidade Federal de Pelotas, Graduação em Biotecnologia – jessica.waldman@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas, Pós-graduação em Biotecnologia – karinacolonetti@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas, Pós-graduação em Biotecnologia – amiltonseixas@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas, Graduação em Ciências Biológicas – najaracb@gmail.com

⁵ Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Veterinária Preventiva- fagondee@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença infecciosa bacteriana que ocorre em humanos e animais. No mundo, o número de casos de leptospirose em humanos e animais não é bem documentado, sendo considerada uma das doenças tropicais bacterianas negligenciadas (HOTEZ et al , 2006). As bactérias do gênero *Leptospira* são altamente invasivas, sendo capazes de infectar um amplo número de hospedeiros mamíferos, os quais podem apresentar um amplo espectro de manifestações clínicas (BHARTI et al 2003).

Para o controle da leptospirose bovina no mundo, a vacinação é realizada com bacterinas constituídas com sorovares mais prevalentes em bovinos no mundo. Por outro lado, a vacinação apresenta uma série de limitações, como reações adversas, proteção apenas contra os sorovares incluídos na vacinação e a indução de uma resposta imune de curta duração, necessitando de múltiplas doses para manutenção da imunidade. Além disso, existe a necessidade de estudos epidemiológicos continuados para conhecer todos os sorovares endêmicos e incluí-los na vacina (DELLAGOSTIN et al., 2011).

Proteínas recombinantes da membrana externa das leptospirosas tem sido utilizados em imunizações de modelos animais de doenças bacterianas (VON SPECHT et al 1995). Para o estudo da leptospirose, proteínas como OmpL1, LipL41, LipL32 e a *Leptospiral immunoglobulin-like protein A* (LigA) tem sido avaliadas como potenciais candidatos a compor uma vacina recombinante contra a leptospirose (FAISAL et al 2007). Nosso grupo recentemente demonstrou que a vacinação com um fragmento recombinante de LigA conferiu proteção significativa ao desafio letal em modelo hamster (SILVA et al 2007).

Nesse contexto, este estudo teve como objetivo a realização de clonagem, expressão, purificação e caracterização de três lipoproteínas de *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae cepa L1-130, as quais serão utilizadas no estudo para o desenvolvimento de vacinas recombinantes para o controle da leptospirose bovina.

2. METODOLOGIA

- **Cepas, cultivo e extração de DNA:** A cepa utilizada neste estudo foi *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae cepa L1-130. As leptospirosas foram cultivadas em meio EMJH (Difco) enriquecido com 10% de suplemento comercial (Difco) e mantidas a 29°C. Foram realizados repiques semanais da cultura, acompanhados de contagem de células bacterianas em câmara de Petroff-Hausser.

10⁸ células foram centrifugadas e utilizadas para extração de DNA genômico utilizando o kit comercial *illustra™* bacteria genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare).

- **Escolha de LICs e desenho dos primers:** A partir da sequência genômica, disponível no banco de dados GenBank (NCBI) foram selecionadas 3 sequências codificadoras. As sequências foram escolhidas a partir de informações sobre as proteínas correspondentes, obtidas em análises no banco de dados UniProt Knowledgebase (UniProtKB). Os requisitos desejáveis para inclusão de uma sequência codificadora no trabalho foram: proteínas de membrana externa expostas na superfície, prováveis lipoproteínas, cuja função esteja relacionada a algum processo patogênico e que ainda não foram avaliadas quanto à imunoproteção. Uma vez escolhida a sequência, foram desenhados primers com o auxílio do software Vector NTI 11 (Invitrogen). Cada primer adicionou a uma extremidade da sequência alvo um sítio para enzima de restrição que permitiu a clonagem no vetor pAE de expressão em *Escherichia coli*. Quando presente a sequência para o peptídeo sinal não será incluída na porção do gene amplificada.

- **Clonagem e caracterização de clones recombinantes:** A amplificação das sequências alvo foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando como molde o DNA da cepa L1-130. O produto da reação foi purificado com kit comercial (*illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit* - GE) e visualizado por eletroforese em gel de agarose. Em seguida vetor e inserto foram digeridos com as mesmas enzimas de digestão *BamHI* e *HindIII* e ligados. O produto da reação foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli* TOP10 por eletroporação. Após a transformação as células foram cultivadas em meio LB sólido suplementado com ampicilina. As colônias transformantes foram submetidas à extração rápida de DNA por fenol-clorofórmio, e o DNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose para análise do tamanho aparente do plasmídeo presente. As colônias que apresentaram prováveis vetores recombinantes foram selecionadas e expandidas em LB líquido suplementado com ampicilina. O plasmídeo foi purificado pelo kit comercial *illustra™ plasmidPrep Mini Spin kit* e em seguida submetido a confirmação de presença de inserto por PCR com os mesmos primers utilizados na primeira amplificação e digestão com enzimas de restrição.

- **Expressão, purificação das proteínas recombinantes e imunoproteção:** Os vetores recombinantes foram utilizados para transformar *E. coli* BL21 Star™ por choque térmico. Após transformadas, as células foram cultivadas em 25 mL de LB líquido com ampicilina *overnight* e utilizadas como inóculo em 500 mL do mesmo meio. Quando a densidade óptica a 600 nm atingiu 0,6-0,8 a expressão da proteína recombinante foi induzida por 1 mM de IPTG. Após 3 horas de expressão as células foram centrifugadas e lisadas para purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade ao níquel. As alíquotas de proteína foram analisadas quanto à pureza por eletroforese em gel de acrilamida (SDS-PAGE). As proteínas foram quantificadas utilizando o kit comercial *BCA Protein Assay* (Thermo Scientific Pierce). Para os testes de imunoproteção, hamsters (*Mesocricetus auratus*) com 4 semanas de idade foram distribuídos em 3 grupos e inoculados com as proteínas recombinantes LIC10508, LIC10561 e LIC10730, um grupo controle negativo (PBS) e um grupo controle positivo (Lipoprotein1). As doses foram administradas com 14 dias de intervalo, via intramuscular. O desafio dos animais foi realizado com 5x10² leptospiros vivos por animal, via intraperitoneal, 14 dias após a segunda dose. Este projeto está cadastrado no COCEPE/UFPel e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPel, cadastro nº CEEA 5237.

– **Análise estatística:** Os testes *Fisher Exact test and log-rank sum test* foram usados para determinar diferenças estatísticas para mortalidade e sobrevivência, respectivamente, entre os grupos imunizados com as proteínas recombinantes e o grupo controle ($p < 0,05$). *GraphPad Prism 4 software systems (GraphPad Software)* foi utilizado para a confecção de gráficos e análises.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os produtos de PCR foram clonados com sucesso e expressos em *E. coli* com uma fusão *6xHis tag N-terminus*, o qual permitiu a purificação das proteínas por cromatografia de afinidade. Todas as três proteínas foram expressas como corpos de inclusão insolúveis. Elas foram solubilizadas e purificadas usando um tampão com ureia. Após a etapa de diálise e SDS-PAGE, a pureza das proteínas foram estimadas acima de 95%.

A imunização com as três proteínas recombinantes adsorvidas em hidróxido de alumínio não conferiu proteção significativa contra o desafio letal, quando comparado ao grupo controle (Figura 1). Os hamsters que sobreviveram ao desafio com dose letal não apresentaram evidência de infecção durante 24 dias após o desafio. Necropsia foi realizada nos animais sobreviventes e revelou que não havia alterações macroscópicas. Rins, fígado e pulmões foram encaminhados para uma posterior análise histológica e reisolamento do agente.

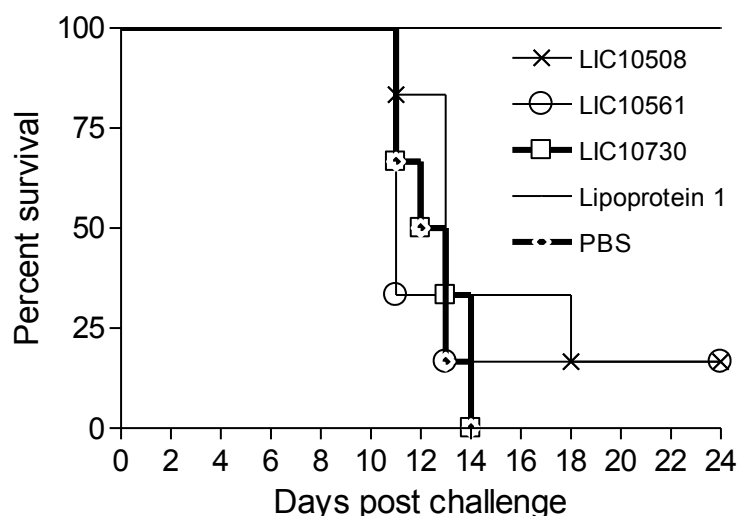


Figura 1. Sobrevivência de hamsters imunizados com as proteínas recombinantes LIC10508, LIC10561 e LIC10730, controles negativo e positivo, após o desafio letal com a cepa virulenta L1-130.

O mecanismo de proteção imune na leptospirose permanece desconhecido. Estudos que determinem a contribuição dos mecanismos de imunidade humoral e imunidade mediada por células para a proteção de modelos animais poderão fornecer a compreensão sobre a resposta imune contra a leptospirose. Esforços para a identificação de antígenos que possam ser utilizados em uma vacina recombinante contra a leptospirose tem sido realizados nos últimos anos (WANG et al 2007).

Lipoproteínas e outras proteínas de membrana externa são considerados como potenciais candidatos a compor uma vacina, entretanto, somente algumas

proteínas de leptospirosas caracterizadas até o momento foram hábeis em conferir proteção quando usadas para imunizar animais suscetíveis a leptospirose. LipL32, a principal proteína de membrana externa encontrada em todas as espécies patogênicas de leptospirosas, foi hábil em conferir proteção parcial somente quando administrada como uma vacina de DNA, quando expressa em adenovírus ou em BCG recombinante (SEIXAS, et al 2007). Nenhuma proteção foi observada quando administrada adsorvida em hidróxido de alumínio.

Em nosso estudo nós identificamos duas proteínas capazes de conferir proteção parcial, porém não significativa, em modelo hamster, após 24 dias de desafio letal. Futuros experimentos serão planejados para avaliar a colonização de órgãos dos animais sobreviventes e o reisolamento do agente na urina e tecido renal. Além disso, novas formas de apresentação dos antígenos serão estudadas.

4. CONCLUSÕES

As lipoproteínas LIC10508, LIC10561 e LIC10730 não são capazes de conferir proteção significativa em modelo animal, quando utilizadas em preparações com hidróxido de alumínio como adjuvante no delineamento experimental deste estudo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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, J. M. VINETZ. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect. Dis.** 3:757–771, 2003
- BRANGER, C., B. CHATRENET, A. GAUVRIT, F. AVIAT, A. AUBERT, J. M. BACH, G. ANDRE-FONTAINE. Protection against *Leptospira interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. **Infect. Immun** 73:4062–4069, 2005.
- DELLAGOSTIN, O. A.; GRASSMANN, A. A.; HARTWIG, D. D.; FÉLIX, S.R.; DA SILVA, É. F.; MCBRIDE, A.J.. Recombinant vaccines against Leptospirosis. **Hum Vaccin**, v. 7, n. 11, p. 1215-24, 2011.
- HOTEZ, P. J., M T. FERRIS. The antipoverty vaccines. **Vaccine**, v.24, p.5787-5799. 2006.
- SEIXAS, F. K., E. F. SILVA, D. D. HARTWIG, G. M. CERQUEIRA, M. AMARAL, M. Q. FAGUNDES, R. G. DOSSA, O. A. DELLAGOSTIN. Recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. **Vaccine**, v.26, p:88-95. 2007
- 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, A. I. KO. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, v. 25, p.6277-6286, 2007.
- VON SPECHT B.-U., B. KNAPP, G. MUTH, M. BROKER, K.-D. HUNGERER, K.-D. DIEHL, K. MASSARRAT, A. SEEMANN, H. DOMDEY. Protection of immunocompromised mice against lethal infection with *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F and outer membrane protein I fusion proteins. **Infect. Immun**, v.63, p.1855–1862. 1995.
- WANG, Z., L. JIN, A. WEGRZYN. Leptospirosis vaccines. **Microb Cell Fact**, v. 6, p, 39, 2007.