

COADMINISTRAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES OFERECEM PROTEÇÃO PARCIAL CONTRA LEPTOSPIROSE

NAJARA BITTENCOURT¹; AMILTON SEIXAS NETO²; KARINA COLONETTI³; JÉSSICA WALDMAN⁴; MARCO ALBERTO MEDEIROS⁵; ÉVERTON FAGONDE DA SILVA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas - najaracb@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - amiltonseixas@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas - karinacolonettti@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas - jessica.waldman@hotmail.com

⁵Fundação Oswaldo Cruz- medeiros@bio.fiocruz.br

⁶Universidade Federal de Pelotas - fagondee@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose causada por espécies patogênicas do gênero *Leptospira* (LEVETT, 2001). Até o momento, cerca de 300 sorovares patogênicos de *Leptospira* foram identificados (HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011). A transmissão para o hospedeiro suscetível ocorre através do contato direto ou indireto com a urina de animais infectados (ADLER; MOCTEZUMA, 2010). Os roedores são os principais reservatórios e agentes disseminadores da infecção, no entanto, animais silvestres e domésticos também são transmissores. A leptospirose causa grandes prejuízos para a agropecuária, com a alta mortalidade nos rebanhos, abortos, natimortos, infertilidade e redução na produção de leite (BHARTI et al., 2003) e, conseqüentemente, um grande impacto econômico (FAINE et al., 2000).

Atualmente, as vacinas disponíveis contra a leptospirose, são as bacterinas, constituídas de leptospiras 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). Portanto, novas estratégias vacinais vêm sendo desenvolvidas, como o estudo de vacinas com subunidades proteicas (ADLER e MOCTEZUMA, 2010) e vacinas de DNA (CUI, 2005).

A identificação de componentes imunogênicos com potencial para o desenvolvimento de vacinas recombinantes resultou na caracterização de três classes de lipoproteínas expressas na membrana externa durante a infecção. (HAAKE et al., 1993; SHANG et al., 1996; CULLEN et al., 2003). Além destas, uma família de proteínas denominada Lig foi posteriormente descrita (PALANIAPPAN et al., 2002). Dados preliminares indicam seu potencial no desenvolvimento de vacinas recombinantes, pois são proteínas de membrana externa presentes em todos os sorovares de leptospiras patogênicas e a expressão ocorre apenas durante a infecção (MATSUNAGA et al., 2003; KOIZUMI; WATANABE, 2004).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi utilizar fragmentos de proteínas recombinantes de leptospira formuladas individualmente ou combinadas, com o adjuvante Hidróxido de alumínio, a fim de identificar a formulação capaz de induzir uma resposta protetora em modelo animal.

2. METODOLOGIA

As formulações vacinais foram produzidas, purificadas e caracterizadas no Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) em Biomanguinhos (Fiocruz-RJ). Para a construção das vacinas, utilizou-se *Leptospira interrogans* sorovar

Copenhageni cepa Fiocruz L1-130. As formulações vacinais possuem na sua composição as proteínas recombinantes LigA625-1224aa (LigANI), LigB131-649aa (LigBRep) ou LigA131-1224aa (LigAFull), isoladas ou em associação, e adjuvante Hidróxido de alumínio na proporção de 200µg da proteína para 2mg de adjuvante. As doses foram ajustadas para um volume de 250µl. O material foi estocado a 4°C até o momento da inoculação dos animais.

Para os ensaios de imunoproteção foram utilizados 60 hamsters (*Mesocricetus auratus*) com quatro semanas de idade, divididos em grupos de cinco a oito animais. Foram realizados dois experimentos, onde os animais foram inoculados com cada uma das formulações vacinais (Tabela 1 e 2). Os animais do grupo controle negativo receberam uma preparação de PBS com Hidróxido de alumínio (2mg/ml) e o grupo controle positivo, bacterina comercial (Leptofem 5, Pfizer) contendo 10⁸ leptospiras por dose. O desafio dos animais foi realizado 14 dias após a segunda dose, pela via intraperitoneal, com a cepa *L. interrogans* L1-130 sorovar Copenhageni com a dose de 500 leptospiras vivas por mL no experimento 1 e 1000 leptospiras vivas no experimento 2. A eficácia de cada preparação vacinal foi determinada pelo número de animais sobreviventes ao desafio, comparado ao grupo controle.

Tabela 1. Experimento 1 Doses utilizadas por animal, conforme grupo.

Grupo	Nº de animais	1ª dose	2ª dose
1	8	Alumínio	Alumínio
2	8	Bacterina	Bacterina
3	6	LigAFull(40µg)	LigAFull(40µg)
4	6	LigANI(40µg)	LigANI(40µg)
5	6	LigBrep(40µg)	LigBrep(40µg)
6	6	LigANI(40µg)+LigBRep(40µg)	LigANI(40µg)+LigBRep(40µg)

Tabela 2. Experimento 2. Doses utilizadas por animal, conforme grupo.

Grupo	Nº de animais	1ª dose	2ª dose
1	5	Alumínio	Alumínio
2	5	LigANI(60µg)+LigBRep(60µg)	LigANI(60µg)+LigBRep(60µg)
3	5	LigANI(60µg)	LigANI(60µg)
4	5	LigBRep(60µg)	LigBRep(60µg)

Os animais que vieram a óbito tiveram o rim esquerdo coletado para avaliação microbiológica, além disso, no segundo experimento, foi coletado rim, fígado e pulmão para execução da técnica de *imprint*. Os animais sobreviventes tiveram seus órgãos coletados após a eutanásia, 30 dias depois do desafio.

Para obtenção da cultura renal, o rim esquerdo de cada animal foi coletado e macerado em tubos tipo Falcon contendo 5ml de meio EMJH (Difco Laboratories) enriquecido com 10% de suplemento comercial e posteriormente incubado a 30°C por 1h. Após, foi realizado um repique de 500µl em 5ml de meio EMHJ e incubado por 7 dias. Posteriormente se observou as culturas utilizando microscópio de campo escuro a fim de verificar o crescimento.

Para a técnica de *imprint*, rim, fígado e pulmão foram seccionados e pressionados sobre lâminas previamente preparadas com poli-L-lisina e fixadas com acetona. Foram, então, hidratadas três vezes e bloqueadas com solução de BSA 0,4% por 40min. Após lavagem, as lâminas foram cobertas com anticorpo anti-leptospira inteira, produzido em coelhos, e incubadas durante 1h. Lavaram-se as lâminas e adicionou-se anti-coelho conjugado a FIT-C. Após novo período de

incubação, as lâminas foram lavadas e montadas para a leitura em microscópio de campo escuro (Chagas-Júnior et al., 2009).

Todas as análises estatísticas e os gráficos de sobrevivência foram realizados no programa Prisma 4 for Windows versão 4.03. O Fisher's Test foi utilizado para a análise de mortalidade, disponível em: <http://www.langsrud.com/stat/fisher.htm>.

Este projeto está cadastrado no COCEPE/UFPEL e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPEL, cadastro nº CEEA 5238.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A imunização dos hamsters contendo as preparações com LigANI, LigBRep, e LigAFull, conferiram proteções variáveis (0-100%) nos hamsters contra o desafio homólogo com dose letal. Nenhum animal sobreviveu no grupo controle negativo ao desafio tanto com 500 quanto 1000 leptospiras por mL, enquanto que os animais vacinados com a bacterina comercial tiveram 100% de sobrevivência (Figura 1). A formulação vacinal contendo as proteínas LigANI associada com LigBRep resultou em uma proteção significativa quando administrado com o adjuvante hidróxido de alumínio.

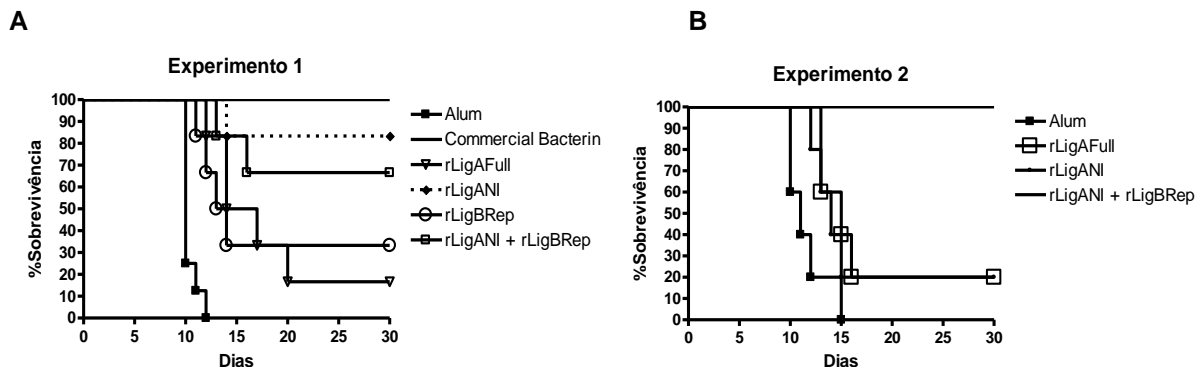


Figura 1- A: Sobrevivência de hamsters machos ao desafio com 1000 leptospiras
B: Sobrevivência de hamsters fêmeas ao desafio com 500 leptospiras

Os dados referentes ao número de sobreviventes, cultura renal e técnica de *imprint*, obtidos nos experimentos 1 e 2, estão representados na Tabela 2. Além disso, na Figura 2 estão representadas imagens obtidas a partir da técnica de *imprint*, evidenciando órgãos de animais positivos e negativos.

Tabela 2. Sobreviventes, cultura renal e técnica de *imprint* para os experimentos 1 e 2.

Exp	Grupo	Sobreviventes (Sobreviventes/total)	Cultura Renal (Positivos/total)	<i>Imprint</i> (Positivos/total)		
				Rim	Fígado	Pulmão
1	1 Alumínio	0/8	7/8	NC	NC	NC
1	2 Bacterina	8/8	2/8	NC	NC	NC
1	3 LigAFull(40µg)	1/6	2/6	NC	NC	NC
1	4 LigANI(40µg)	5/6	1/6	NC	NC	NC
1	5 LigBRep(40µg)	2/6	2/6	NC	NC	NC
1	6 LigANI(40µg)+LigBRep(40µg)	4/6	0/6	NC	NC	NC
2	1 Alumínio	0/5	2/3	2/3	2/3	3/3
2	2 LigANI(60µg)+LigBRep(60µg)	5/5	0/5	1/5	3/5	4/5
2	3 LigANI(60µg)	5/5	0/5	4/5	1/5	2/5
2	4 LigBRep(60µg)	5/5	1/5	0/5	1/5	0/5

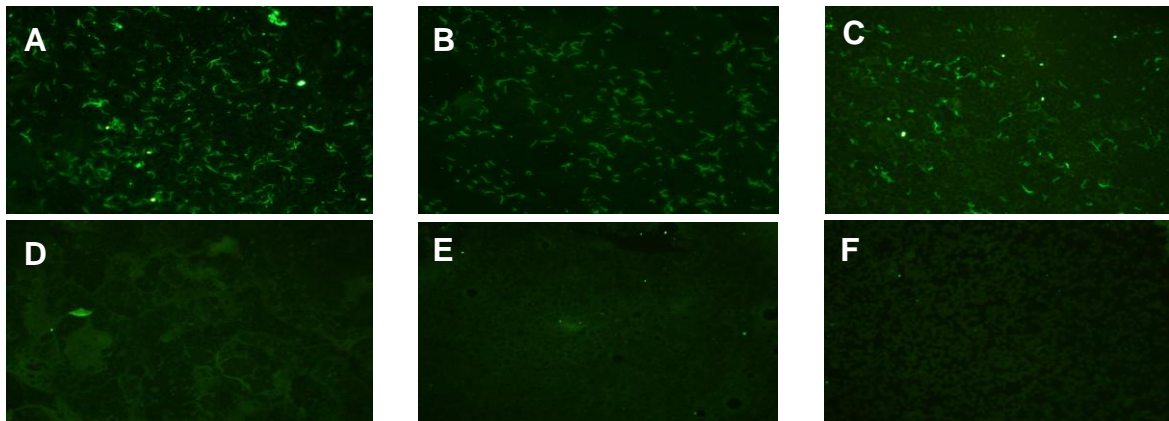


Figura 2 - Imagens representativas da técnica de *imprint*. (A) tecido renal, (B) hepático, (C) pulmonar de animais positivos, e (D) renal, (E) hepático e (F) pulmonar de animais negativos.

4. CONCLUSÕES

A associação entre LigANI e LigBRep confere proteção significativa ($p > 0,05$) ao desafio letal. Dessa forma, recomenda-se que essa formulação seja utilizada em ensaios de imunogenicidade e imunoproteção heteróloga. LigAFull não protege os hamsters da leptospirose letal, porém confere sobrevida aos animais imunizados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, B.; MOCTEZUMA, A.P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v.140, n.3-4, p.287-296, 2010.
- BHARTI, A.R.; NALLY, J.E.; RICARDI, J.N. **Lancet Infectious Diseases**, v.3, p.757-771, 2003.
- CULLEN, P. A.; HAAKE, D.A.; BULACH, D.M.; ZUERNER, R.L.; ADLER, B. **Infection and Immunity**, v.71, p.2414-2421, 2003.
- 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.
- FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. Melbourne, Austrália, 2nd Ed., 2000.
- HARTSKEERL, R.A.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W.A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clinical Microbiology and Infection**, v.17, n.4, p.494-50, 2011.
- KOIZUMI, N.; WATANABE, H. **Vaccine** v.22, p.1545-1552, 2004.
- LEVETT, P.N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n.2, p.296-329, 2001.
- KOIZUMI, N.; WATANABE, H. **Vaccine** v.22, p.1545-1552, 2004.
- MATSUNAGA, J.; BAROCCHI, M.A.; CRODA, J.; YOUNG, T.A.; SANCHEZ, Y.; SIQUEIRA, I.; BOLIN, C.A.; REIS, M.G.; RILEY, L.W.; HAAKE, D.A.; ALBERT, K.I. **Molecular Microbiology**, v.49, p.929-945, 2003.
- PALANIAPPAN, R.U.; CHANG, Y.F.; JUSUF, S.S.; ARTIUSHIN, S.; TIMONEY, J.F.; MCDONOUGH, S.P.; BARR, S.C.; DIVERS, T.J.; SIMPSON, K.W.; MCDONOUGH, P.L.; MOHAMMED, H.O. **Infection and Immunity**, v.70, p.5924-5930, 2002.
- CHAGAS-JUNIOR, A.D.; MCBRIDE, A.J.A.; ATHANAZIO, D.A.; FIGUEIRA, C.P.; MEDEIROS, M.A.; REIS, M.G.; KO, A.I.; MCBRIDE, F.W.C. An imprint method for detecting leptospires in the hamster model of vaccine-mediated immunity for leptospirosis. **Journal of Medical Microbiology**, n.58, p.1632-1637, 2009.