

ENSAIO DE IMUNIZAÇÃO PASSIVA DE HAMSTERS COM IgY anti-LipL32

ANDREIA NOBRE ANCIUTI¹; NAJARA CARNEIRO BITTENCOURT²; KARINA COLONETTI³; AMILTON CLAIR PINTO SEIXAS NETO⁴; ÉVERTON FAGONDE DA SILVA⁵

¹ Universidade Federal de Pelotas – andreianciuti@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – najarach@gmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – karinacolonettti@hotmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – amiltonseixas@gmail.com

⁵ Universidade Federal de Pelotas – fagondee@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é um problema de saúde pública de importância mundial. Os mamíferos podem albergar leptospiros patogênicos nos túbulos renais e eliminá-las para o ambiente através da urina, contaminando o solo ou a água. A partir do contato direto ou indireto as espiroquetas penetram na pele e mucosas de humanos e animais suscetíveis, causando a enfermidade. A imunidade em leptospirose é predominantemente mediada por resposta humoral nos humanos e na maioria das espécies animais (ADLER; de la PEÑA MOCTEZUMA, 2009). A utilização de anticorpos tanto para imunização quanto para o uso em diagnóstico é amplamente difundida no estudo de doenças infecciosas e zoonoses. No estudo da leptospirose, os anticorpos policlonais utilizados para imunização passiva são aqueles produzidos contra o lipopolissacarídeo (LPS), o qual é abundante na membrana externa da *Leptospira*. Por outro lado, anticorpos monoclonais contra o LPS produzidos em camundongos foram utilizados no diagnóstico e contra infecção letal em cobaias, hamsters, caninos e primatas não humanos (JOST et al., 1986).

A imunidade mediada por anticorpos anti-LPS é limitada a sorovares homólogos, diferentemente das preparações com proteínas de *Leptospira* a qual demonstra proteção promissora quando usada em ensaios de imunoproteção em animais de laboratório (PALANIAPPAN et al., 2007). Nos últimos anos, a partir do sequenciamento do genoma de leptospiros, algumas proteínas de membrana externa foram descritas como importantes alvos no estudo da patogênese da enfermidade. A lipoproteína LipL32 foi descrita como a principal proteína de membrana externa de leptospiros patogênicos. Por ser expressa em altos níveis durante o cultivo *in vitro* e infecções naturais, ela é considerada altamente imunogênica, com mais de 95% dos pacientes com leptospirose produzindo anticorpos contra LipL32 (GUERREIRO, 2001).

A Imunoglobulina Y (IgY) é o principal anticorpo produzido em galinhas (*Gallus domesticus*), sendo funcionalmente equivalente ao IgG em mamíferos (WARR, 1995). Existe um grande número de vantagens no uso de galinhas tanto como modelo animal para imunização, como na utilização dos ovos como fonte para o isolamento de anticorpos (ZHANG, 2003). As IgY são muito eficientes na neutralização de toxinas provenientes de animais venenosos (ALMEIDA, 2008), e no bloqueio de alguns fatores de virulência expressos por bactérias (ALMEIDA, 2003). Uma das principais vantagens no uso de IgY é o aumento na imunogenicidade contra proteínas conservadas em mamíferos devido a distância filogenética entre essas espécies, sendo necessários bem menos antígenos para desencadear uma resposta imune eficiente (GASSMANN, 1990). Ensaios utilizando IgY são desejáveis, visto que esta molécula é segura, eficiente, estável e de fácil purificação. O objetivo deste estudo foi testar a eficiência dos anticorpos

IgY anti-rLipL32 em ensaios de imunização passiva através de teste de desafio com cepa homóloga e heteróloga em hamsters.

2. METODOLOGIA

Recentemente nosso grupo realizou a produção e caracterização de anticorpos IgY contra a proteína recombinante LipL32 (rLipL32) de *L. interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae cepa L1-130 (ANCIUTI et al., 2012). Neste estudo, foram realizados dois ensaios de imunização passiva, os quais utilizaram hamsters (*Mesocricetus auratus*) como modelo animal. No primeiro teste, vinte hamsters fêmeas, divididas em quatro grupos de cinco fêmeas, com oito a nove semanas de idade foram imunizadas através da via intraperitoneal (IP), com 100, 300 e 500 µg de IgY anti-rLipL32, sendo que um grupo controle foi inoculado apenas com PBS (Tabela 1). Após 24 h, todos os animais foram desafiados com a dose letal da cepa Fiocruz L1-130 através da via IP (SILVA, 2007).

Tabela 1. Delineamento experimental para a imunização passiva em hamsters.

Grupo	Vacina	Dose imunização	Dose desafio
1	IgY anti-rLipL32	500 µg IgY	500 leptospiras
2	IgY anti-rLipL32	300 µg IgY	500 leptospiras
3	IgY anti-rLipL32	100 µg IgY	500 leptospiras
4	PBS	0 µg IgY	500 leptospiras

No segundo experimento 60 hamsters (*Mesocricetus auratus*), 30 fêmeas e 30 machos, com oito a nove semanas de idade foram imunizados através da via intraperitoneal com 1mg de IgY contra rLipL32, sendo que um grupo controle para cada sexo foi inoculado apenas com PBS. Os animais foram divididos em cinco grupos de seis animais de acordo com o sexo. As fêmeas foram imunizadas e 24 horas depois desafiadas com 500 leptospiras da cepa homóloga *L. interrogans* cepa Fiocruz L1-130, e das cepas heterólogas: *L. interrogans* sorogrupo Canicola cepa Kito, *L. noguchii* Autumnalis cepa Bonito e *L. borgpetersenii* Ballum cepa 4E, as quais são cepas isoladas em Pelotas, importantes causadoras de leptospirose humana e animal. Já os machos, foram primeiramente desafiados com as mesmas cepas e após 24 horas foram imunizados com IgY anti-rLipL32 (Tabela 2).

Tabela 2. Delineamento experimental para o segundo experimento de imunização

Grupo	Sexo	Imunógeno	Dose imunização	Cepa desafio
1	Fêmea	IgY anti-rLipL32	1 mg IgY	L1-130
2	Fêmea	IgY anti-rLipL32	1 mg IgY	KITO
3	Fêmea	IgY anti-rLipL32	1 mg IgY	BONITO
4	Fêmea	IgY anti-rLipL32	1 mg IgY	4E
5	Fêmea	PBS	0 mg IgY	L1-130
1	Macho	IgY anti-rLipL32	1 mg IgY	L1-130
2	Macho	IgY anti-rLipL32	1 mg IgY	KITO
3	Macho	IgY anti-rLipL32	1 mg IgY	BONITO
4	Macho	IgY anti-rLipL32	1 mg IgY	4E
5	Macho	PBS	0 mg IgY	L1-130

Todos os animais foram mantidos em condições ideais de bem estar, com água e comida *ad libitum*. Esse estudo foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal (CEEA) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) (processo nº 23110.004657/2010-84).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A imunização dos hamsters com a preparação contendo IgY anti-rLipL32 em diferentes concentrações não conferiu proteção no modelo animal contra o desafio homólogo com dose letal. No experimento dois, no qual foram testadas duas formas diferentes de imunização e realizado o desafio com cepas heterólogas e a homóloga, a IgY produzida demonstraram não conferir proteção. Ao final do experimento dois, foi realizada a necropsia de um animal de cada grupo, podendo-se perceber a presença de lesões hemorrágicas em pulmões, congestão de órgãos e icterícia nas mucosas além de sangramento nasal, típicas da leptospirose.

A imunidade passiva adquirida envolve a obtenção de anticorpos antígeno-específicos de outra fonte administrado para proteger indivíduos susceptíveis. Os anticorpos IgYs têm sido amplamente utilizados para imunização passiva em animais e humanos (KOVACS-NOLAN, 2012) além de substituir os antibióticos, que muitas vezes causam resistência bacteriana, no uso como aditivos alimentares para atingir alvos específicos e aumentar o crescimento dos rebanhos. Além disso, a metodologia proposta em nosso estudo, em comparação com as demais técnicas utilizadas para a obtenção de anticorpos, promove a redução de animais em ensaios biológicos, condição fundamental para os princípios humanitários para a pesquisa com animais.

No presente trabalho, testou-se pela primeira vez a imunoglobulina Y anti-rLipL32 para imunização de hamsters. No delineamento experimental proposto, as preparações não conferem proteção frente ao desafio homólogo e heterólogo. Dessa forma, novos estudos serão realizados visando obter uma preparação capaz de proteger hamsters da leptospirose letal, seja na modificação da dose, seja na via de administração.

4. CONCLUSÕES

A IgY anti-rLipL32 produzida não confere proteção nos hamsters através de imunização passiva nos formatos utilizados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, B.; DE LA PENA MOCTEZUMA. A. *Leptospira* and leptospirosis. **Vet.Microbiol.**, v.140, n.3-4, p.287-296, 2010.
- ANCIUTI, A. N. ; DINIZ, A. D. ; VASCONCELLOS, F. A. ; COLONETTI, K. ; SILVA, É. F. Produção de Imunoglobulina Y contra a proteína recombinante rLipL32 de *Leptospira interrogans*. In: 21^a Congresso de Iniciação Científica - 4^a Mostra Científica - UFPel, 2012, Pelotas. Congresso de iniciação científica, 2012.
- BAXTER D. Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing. **Occupational Medicine**; 57:552–556, 2007
- DE ALMEIDA, C. M.; DA SILVA, C. L.; COUTO, H. P.; ESCOCARD, R. C.; DA ROCHA, D. G.; SENTINELLI, L. P.; KIPNIS, T. L.; DA SILVA, W. D. Development of process to produce polyvalent IgY antibodies anti-African snake venom. **Toxicon**, v.52, n.2, p.293-301, 2008.
- DE ALMEIDA, C. M.; QUINTANA-FLORES, V. M.; MEDINA-ACOSTA, E.; SCHRIEFER, A.; BARRAL-NETTO, M.; DIAS DA, S. W. Egg yolk anti-BfpA

- antibodies as a tool for recognizing and identifying enteropathogenic *Escherichia coli*. **Scand.J.Immunol.**, v.57, n.6, p.573-582, 2003.
- FAINE, S., B. ADLER, C. BOLIN AND P. PEROLAT. **Leptospira and Leptospirosis**. In: Methods, Faine, S. Ed.2 Edn., Med. Sci., Melbourne, pp: 169-184, 1999.
- GASSMANN, M.; THOMMES, P.; WEISER, T.; HUBSCHER, U. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. **FASEB J.**, v.4, n.8, p.2528-2532, 1990.
- GUERREIRO, H.; CRODA, J.; FLANNERY, B.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; GALVAO, R. M.; LEVETT, P. N.; KO, A. I.; HAAKE, D. A. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. **Infect.Immun.**, v.69, n.8, p.4958-4968, 2001.
- JOST, B. H.; ADLER, B.; VINH, T.; FAINE, S. A monoclonal antibody reacting with a determinant on leptospiral lipopolysaccharide protects guinea pigs against leptospirosis. **J.Med.Microbiol.**, v.22, n.3, p.269-275, 1986
- KOVACS-NOLAN, J.; MINE, Y. Egg yolk antibodies for passive immunity. **Annu.Rev.Food Sci.Technol.**, v.3, p.163-182, 2012.
- MASUZAWA, T.; SUZUKI, R.; YANAGIHARA, Y. Protective activity of rabbit polyclonal anti-idiotypic antibody against *Leptospira interrogans* infection in hamsters. **Biol.Pharm.Bull.**, v.19, n.4, p.613-615, 1996.
- PALANIAPPAN, R. U.; RAMANUJAM, S.; CHANG, Y. F. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. **Curr.Opin.Infect.Dis.**, v.20, n.3, p.284-292, 2007.
- PARK, H. S.; PARK, K. I.; NAGAPPAN, A.; LEE, D. H.; KANG, S. R.; KIM, J. A.; KIM, E. H.; HAN, D. Y.; KIM, G. S. Proteomic analysis of effects on natural herb additive containing immunoglobulin Yolksac (IgY) in pigs. **The American Journal of Chinese Medicine** , v.39, n.3, p.477-488, 2011.
- SILVA, E. 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**, v.25, n.33, p.6277-6286, 2007.
- WARR, G. W.; MAGOR, K. E.; HIGGINS, D. A. IgY: clues to the origins of modern antibodies. **Immunol.Today**, v.16, n.8, p.392-398, 1995.
- ZHANG, W. W. The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. **Drug Discov.Today**, v.8, n.8, p.364-371, 2003.