

AVALIAÇÃO E MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE PARA ESTIMULAR UMA RESPOSTA IMUNE PROTETORA E ESTERILIZANTE CONTRA LEPTOSPIROSE

**MICAELA DOMINGUES¹; ANDRÉ ALEX GRASSMANN²; WALLACE MORAES
 PEREIRA³; RAFAELA GOMES XAVIER⁴; CAROLINE AMURIM DA SILVA
 GONÇALVES⁵; ALAN JOHN ALEXANDER MCBRIDE⁶**

¹*Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Núcleo de Biotecnologia, Centro de
 Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas –
 micaela_domingues@hotmail.com*

²*Department of Medicine, University of Connecticut Health Center, EUA –
 grassmann.aa@gmail.com*

³*Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Núcleo de Biotecnologia, Centro de
 Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – wallpereira@gmail.com*

⁴*University of Modena and Reggio Emilia, Itália – rafaellagxavier@gmail.com*

⁵*Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Núcleo de Biotecnologia, Centro de
 Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – carolamurim@gmail.com*

⁶*Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Núcleo de Biotecnologia, Centro de
 Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – alan.mcbride@ufpel.edu.br*

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença causada por espiroquetas pertencentes ao gênero *Leptospira*, no qual fazem parte 13 espécies patogênicas e 6 saprofíticas. A infecção ocorre através do contato direto com a bactéria ou por meio da urina de algum animal carreador. Os ratos são os principais carreadores, atingindo níveis de 10^7 bactérias por mL de urina, além de serem considerados hospedeiros intermediários (assintomáticos) (LEVETT, 2001; ADLER E DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Em humanos, os sintomas variam de acordo com a virulência da bactéria, podendo ser de uma sintomatologia branda, muitas vezes confundida com gripe, até casos de falha aguda renal e hepática (Síndrome de Weil) e em algumas ocasiões síndrome de hemorragia pulmonar grave, levando o paciente à morte em >50% dos casos (MCBRIDE et al., 2005). Sua ocorrência é maior principalmente nos países em desenvolvimento, onde as condições de saneamento inadequadas associadas a uma aglomeração populacional são fatores determinantes para sua propagação (MCBRIDE et al., 2005; REIS et al, 2008; ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

A medida profilática mais promissora na contenção desta doença, é a vacinação, porém a vacina humana (tipo bacterina) é aprovada somente em cinco países. A vacina para animais domesticados é comercializada principalmente para cães, bovinos e suínos, onde a proteção é parcial, ou seja, protege apenas contra os sorovares presentes em sua formulação. Além do mais, se faz necessário revacinações anuais e a proteção induzida não é esterilizante (ADLER E DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). O tipo de resposta imune envolvido na proteção contra a leptospirose induzida por vacinas ainda não é completamente esclarecido. Na maioria dos casos, a resposta imune protetora está humoral, mas em bovinos têm evidências que precisa estimular uma resposta celular quando o sorovar infectante é Hardjo.

O principal objetivo deste trabalho foi analisar da resposta imune humoral através da isotipagem de anticorpos secretados durante a vacinação com bacterina e o consequente desafio com *L. interrogans* sorovar Copenhageni no modelo experimental hamster dourado sírio (*Mesocricetus auratus*).

2. METODOLOGIA

Cepas, cultivo e preparação da bacterina

A cepa virulenta utilizada neste estudo foi a *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130. Seu crescimento foi feito em meio EMJH enriquecido com 10% de suplemento (Difco) e mantido a 29 °C. Foram realizados repiques semanais da cultura, acompanhado de contagem celular bacteriana em câmara de Petroff-Hausser e microscopia de campo escuro. Para a preparação das bacterinas, alíquotas de leptospiros com 10^8 leptospiros/mL foram inativadas por incubação a 56 °C por 30 minutos e utilizadas para ressuspensão em 300 μ L de PBS estéril.

Animais e coletas de amostras

Quarenta hamsters fêmeas (*Mesocricetus auratus*) de 4 a 6 semanas de idade foram utilizados como modelo animal para os experimentos de desafio e avaliação da resposta imune. As vacinas foram administradas em duas doses, com volume total de 300 μ L cada, no músculo quadríceps nos dias 0 e 14. Amostras de sangue de cerca de 300 μ L foram coletadas através de punção do plexo venoso retro-ocular, onde o soro foi processado e congelado a -20 °C até sua utilização.

Imunização e desafio de hamsters

Quarenta hamsters foram distribuídos em quatro grupos de 10 animais em cada grupo, recebendo os seguintes tratamentos: grupo 1: bacterina, seguido de desafio letal; 2: bacterina, sem desafio; 3: PBS, seguido de desafio letal; 4: PBS, sem desafio. Duas doses de bacterina (10^8 leptospiros) ou PBS foram utilizadas para imunizar os hamsters, nos dias 0 e 14. Após 14 dias da última imunização os grupos 1 e 3 foram desafiados com um dose letal ($5 \times DL_{50}$) de leptospiros de baixa passagem em desafio homólogo. Os animais foram acompanhados diariamente para observação dos sinais da leptospirose e ocorrência de morte. Os animais sobreviventes foram eutanasiados 28 dias após o desafio.

Determinação da resposta humoral

Placas de poliestireno foram sensibilizadas com 100 ng/poço de rLipL32 + rLigBrep em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 para 16 h a 4 °C, lavadas com PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T) e bloqueadas com 5% de leite em pó desnatado. Os soros foram diluídos 1:100 em PBS-T e incubados por 1 h a 37 °C. Após, foi adicionado anticorpo secundário anti-IgG (diluição 1:6000 em PBS-T), anti-IgG1 (diluição 1:6000 em PBS-T), anti-IgG2/3 (diluição 1:6000 em PBS-T), anti-IgG3 (diluição 1:3000 em PBS-T), anti-IgM (diluição 1:3000 em PBS-T), todos conjugado à peroxidase e seguido de incubação a 37 °C por mais 1 h. As reações foram reveladas com o substrato o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) acrescido de peróxido de hidrogênio, por 15 min. no escuro. A leitura da densidade óptica foi feita em espectrofotômetro com filtro ajustado para 450 nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apenas os ELISA contendo anticorpos anti-IgG e anti-IgG2/3 apresentaram resposta positiva (Figura 1). Como não houve detecção do anticorpo isotipo IgG3, toda absorbância gerada pelo anticorpo anti-IgG2/3 foi interpretada como reconhecida pelo isotipo IgG2. É importante salientar que todos os animais apresentaram baixa resposta frente aos anticorpos anti-IgG e anti-IgG2/3 no instante pré-vacina, com níveis de absorbância inferior a 0,05.

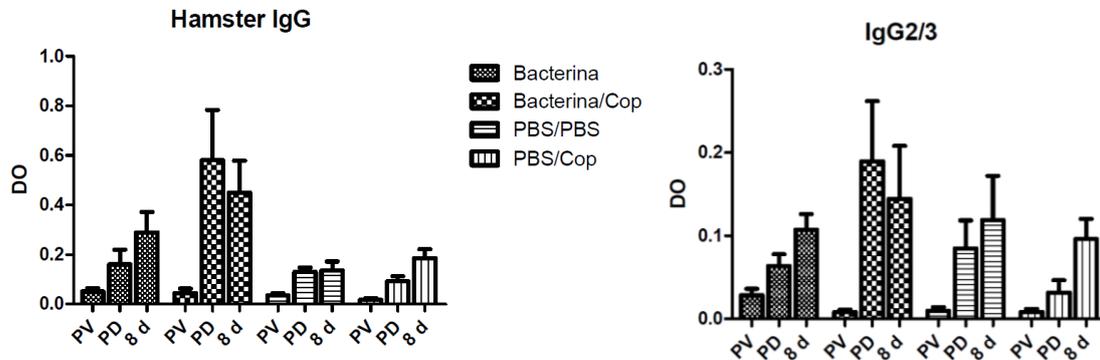


Figura 1. Isotipagem da resposta imune humoral induzida pela bacterina de *L. interrogans* sorovar Copenhageni.

O tipo de resposta imune tanto humoral quanto celular contra leptospirose ainda não é completamente esclarecido. Estudos anteriores já demonstraram a resposta imune gerada por influência de vacinas desafios, porém para os antígenos em questão (FAISAL et al., 2009a, FAISAL et al., 2009b, FAISAL et al., 2009c) os resultados encontrados não foram completamente elucidativos. Quando relacionado a bacterinas, que correspondem às únicas vacinas atuais no mercado, a resposta imune induzida também é pouco conhecida (ZUERNER et al., 2011).

Apesar da falta de conhecimento acerca dos mecanismos específicos de resposta imune, diversos grupos de pesquisa corroboram que a resposta imune predominante é humoral (KO et al., 2009). Os anticorpos produzidos durante a infecção foram demonstrados como do tipo aglutinante, onde IgM e IgG foram predominantemente encontrados em pacientes recuperados de leptospirose em até seis anos após o primeiro contato com a bactéria (LEVETT et al., 2001). O resultado do presente trabalho não obteve sucesso em identificar anticorpos IgM e isso pode ter ocorrido devido aos diferentes tempos de permanência deste anticorpo na corrente sanguínea entre humanos e hamsters.

4. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo indicam que a predominância do isotipo IgG2 na resposta imune humoral está relacionada com a proteção contra leptospirose através de aglutinação. Porém, é necessário estudos mais aprofundados para a confirmação desse resultado e que possa de certa forma, contribuir para a compreensão da resposta imune humoral gerada pela vacinação com bacterinas em modelo experimental.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, B. e DE LA PENA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v.140, n.3-4, p. 287-96. 2010.

EVANGELISTA, K. e KOBURN, J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses, **Future Microbiology**, n. 5, p. 1413-1425, 2010.

FAINE, S. B.; ADLER, B.; BOLIN, C., PEROLAT, P. *Leptospira* and leptospirosis. Melbourne: **MediSci**. 1999.

FAISAL, S.M.; YAN, W., MCDONOUGH, S. P.; CHANG, C. F., PAN, M. J., CHANG, Y. F. Leptosome-entrapped leptospiral antigens conferred significant higher levels of protection than those entrapped with PC-liposomes in a hamster model, **Vaccine**, n. 27, p. 6537-6545, 2009a.

FAISAL, S.M.; YAN, W., MCDONOUGH, S. P.; CHANG, Y. F. *Leptospira* immunoglobulin-like protein A variable region (LigAvar) incorporated in liposomes and PLGA microspheres produces a robust immune response correlating to protective immunity, **Vaccine**, n. 27, p. 378-387, 2009b.

FAISAL, S. M., YAN, W., MCDONOUGH, S. P., MOHAMMED, H. O., DIVERS, T. J., CHANG, Y. F. Immune response and prophylactic efficacy of smegmosomes in a hamster model of leptospirosis, **Vaccine**, n. 27, p. 6129-6136, 2009c.

KO, A.I., GOARANT, C., PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen, **Nature Reviews in Microbiology**, n. 7, p. 736-747, 2009.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n.2, p. 296-326. 2001.

MCBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G. e KO, A. I. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.18, n. 5, p. 376-86. 2005.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, Situação epidemiológica das zoonoses de interesse à saúde pública, **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, n. 1, p. 2-17, 2009.

ZUERNER, R. L., ALT, D. P., PALMER, M. V., THACKER, T. C., OLSEN, S. C. A *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo vaccine induces a Th1 response, activates NK cells, and reduces renal colonization. **Clinical Vaccine Immunology**, n. 18(4), p. 684-691, 2011.