

## RESPOSTA IMUNE HUMORAL E CELULAR INDUZIDA POR OMP137 EM DIFERENTES ESTRATÉGIAS VACINAIS CONTRA LEPTOSPIROSE

THAÍS LARRÉ OLIVEIRA<sup>1\*</sup>; ANDRÉ ALEX GRASSMANN<sup>2</sup>; DAIANE DRAWANZ HARTWIG<sup>3</sup>; ALAN JOHN ALEXANDER MCBRIDE<sup>2</sup>; ODIR ANTÔNIO DELLAGOSTIN<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Vacinologia - Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, UFPEL ([thais.larreoliveira@gmail.com](mailto:thais.larreoliveira@gmail.com) \* - [odir@ufpel.edu.br](mailto:odir@ufpel.edu.br) \*\*)

<sup>2</sup> Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas - Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, UFPEL

<sup>3</sup> Departamento de Microbiologia e Parasitologia - Instituto de Biologia - UFPEL

### 1. INTRODUÇÃO

*Leptospira interrogans* é o principal agente etiológico da leptospirose humana, uma zoonose negligenciada de distribuição global [1]. A necessidade do desenvolvimento de novas vacinas contra esta doença se justifica pela variação antigênica da bactéria, que é até o momento, o maior obstáculo na obtenção de uma vacina universal eficaz [2].

Omp137 é uma proteína de membrana externa - presente em diversos sorovares patogênicos da espiroqueta - a qual é reconhecida por soro humano e animal na fase convalescente da doença e possui propriedade de ligação aos componentes da matriz extracelular. Diante disso, acredita-se que esta proteína possa desempenhar um papel importante na patogênese desta bactéria e representar, assim, um promissor alvo vacinal [3].

A estratégia de vacinação baseada em *prime-boost*, que consiste em imunizações de DNA seguidas de uma dose reforço de proteína, já foi descrita em estudos vacinais contra leptospirose, demonstrando um aumento na imunogenicidade quando comparado com outras estratégias vacinais. A dose de vacina de subunidade parece fortalecer a resposta previamente induzida pela vacina de DNA [4].

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta imune induzida por Omp137 sob diferentes estratégias vacinais em hamsters.

### 2. METODOLOGIA

O gene *omp137* foi amplificado por PCR e clonado no vetor pAE de expressão em procaríoto e no vetor pTarget de expressão em células mamíferas, os quais foram caracterizados através de *Western blotting* (WB) e imunofluorescência indireta de células CHO-K1 transfectadas *in vitro*, respectivamente, conforme já descrito [5]. Grupos de 6 hamsters foram imunizados com duas doses obedecendo o intervalo de 21 dias, da seguinte forma: rOmp137-Alhydrogel (2 x 100 µg), pTarget-*omp137* (2 x 100 µg), prime-boost pTarget-*omp137* (100 µg) e rOmp137 (100 µg), pTarget (2 x 100 µg) e PBS-Alhydrogel. Dois experimentos independentes foram conduzidos. Os níveis de anticorpos IgG foram avaliados através de ELISA indireto utilizando rOmp137 como antígeno.

O perfil de expressão das citocinas IFN-γ, TNF-α, IL1-α e TGF-β foi analisado através de PCR quantitativo em tempo real usando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Amostras de sangue agrupadas por tratamento, coletadas nos dias 0, 21 e 42, foram processadas para o isolamento de RNA

utilizando o kit *Ribo-Pure Blood* (Ambion). A síntese de cDNA foi realizada usando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). A quantificação da expressão foi analisada através do método de  $C_T$  relativo ( $\Delta\Delta C_T$ ). O  $C_T$  de cada gene alvo foi determinado nos *pools* de sangue total de cada grupo e então, normalizados em relação ao  $C_T$  do gene  $\beta$ -actina ( $\Delta CT$ ). Posteriormente, este valor foi comparado com o mesmo gene normalizado no respectivo grupo controle (calibrador) [6].

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proteína rOmpL37 induziu níveis mais elevados de anticorpos IgG comparado aos grupos pTarget/*ompL37* e PBS, tanto no dia 21 quanto no dia 42 em ambos os experimentos ( $P < 0.005$ ). Não foi observada diferença estatística entre pTarget/*ompL37* e os controles negativos (Fig. 1).

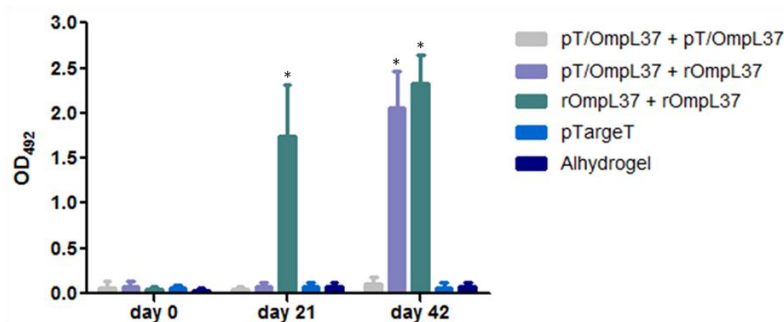


Figura 1: Níveis de anticorpos sistêmicos em hamsters inoculados com diferentes formulações vacinais. A média foi calculada a partir das amostras de soro em triplicata. Os resultados são expressos como a absorvância média  $\pm$  desvio padrão.  $OD_{492}$ , densidade óptica à 492 nm. Diferenças significativas ( $P = 0.001$ ) em relação ao grupo controle são mostradas com asterisco.

Quanto aos resultados de PCR quantitativo em tempo real, considerou-se que os genes foram *up* ou *down*-regulados quando um *fold* de 2x (acima de 2,0 ou abaixo de 0,5) era observado nos níveis de mRNA, conforme descrito na literatura [7]. Sendo assim, TNF- $\alpha$  foi induzido por rOmpL37 no dia 42 (2.84) e por pTarget/*ompL37* nos dias 21 e 42 ( $> 5$ ). Por outro lado, IFN- $\gamma$  foi *down*-regulado no grupo *prime-boost* no dia 42 (0.41). Da mesma forma, IL1- $\alpha$  também foi *down*-regulada no dia 42 tanto no grupo pTarget/*ompL37* (0.28) quanto no *prime-boost* (0.19). TGF- $\beta$  foi expresso em níveis basais em todos os grupos.

### 4. CONCLUSÕES

A proteína rOmpL37 é imunogênica, capaz de induzir anticorpos IgG específicos nos animais vacinados, diferentemente da vacina de DNA, pTarget/*ompL37*. Por outro lado, ambas demonstram capacidade de estimular uma resposta pró-inflamatória, caracterizada pela indução de TNF- $\alpha$ . A imunização baseada em *prime-boost*, nestas condições de análise, não apresenta potencial de indução de citocinas do tipo Th1 e pró-inflamatórias.

### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] ADLER B, DE LA PENA MOCTEZUMA A. Leptospira and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, 140(3-4): 287-296, 2010.

- [2] DELLAGOSTIN OA, GRASSMANN AA, HARTWIG DD, FÉLIX SR, DA SILVA ÉF, MCBRIDE AJ. Recombinant vaccines against Leptospirosis. **Human Vaccines**, 7(11):1215-24, 2011.
- [3] PINNE M *et al.* The OmpL37 surface-exposed protein is expressed by pathogenic *Leptospira* during infection and binds skin and vascular elastin. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 4(9): e815, 2010.
- [4] HARTWIG DD *et al.* A prime-boost strategy using the novel vaccine candidate, LemA, protected hamsters against leptospirosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, 20(5):747-752, 2013.
- [5] OLIVEIRA TL, GRASSMANN AA, MENDONÇA M, HARTWIG DD, DELLAGOSTIN AO. Construção e caracterização de vacinas recombinantes de DNA e de subunidade contra leptospirose utilizando o antígeno OmpL37. In: **21º CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, Pelotas, 2012.
- [6] LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, 25: 402-408, 2001.
- [7] VERNEL-PAUILLAC F, GOARANT C. Differential cytokine gene expression according to outcome in a hamster model of leptospirosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 4(1): e582, 2010.