

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL CONTRA A LEPTOSPIROSE ATRAVÉS DE TESTE IMUNOENZIMÁTICO

MAURÍCIO TAVARES TAMBORINDEGUY¹; CAROLINE AMURIM DA SILVA GONÇALVES²; NEIDA LUCIA CONRAD²; KARLA SEQUEIRA MENDONÇA²; ALAN JOHN ALEXANDER MCBRIDE³

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

²Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – carolamurim@gmail.com; neidaconrad@yahoo.com.br; karlasmend@gmail.com;

³Laboratório 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 causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). É uma das zoonoses de maior distribuição global, com incidência média de 873.000 casos graves e 49.000 mortes por ano (PICARDEAU et al., 2014). A infecção ocorre através do contato direto com a bactéria ou por meio da urina de algum animal portador do micro-organismo. Os ratos são os principais carreadores, atingindo níveis de 10^7 bactérias por mL de urina, além de serem considerados hospedeiros assintomáticos (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Os sintomas da leptospirose em humanos, podem variar de acordo com o sorovar infectante, a idade, saúde e o estado imunológico do paciente. A infecção varia de uma doença semelhante a gripe à casos mais severos como falha renal e hepática, insuficiência pulmonar e morte (MCBRIDE et al., 2005).

Estudos tem focado no desenvolvimento de candidatos à vacinas de subunidade, mais especificamente para identificar proteínas de superfície, que são conservadas entre os sorovares, e consideradas bons alvos para induzir a resposta imune bactericida (KO et al., 2009). As proteínas Lig (*Leptospiral immunoglobulin-like proteins*), são promissoras candidatas para o desenvolvimento de vacinas, pois se localizam na membrana externa das leptospirosas e são fortemente reconhecidas pelo soro de pacientes diagnosticados com a doença (MATSUNAGA et al., 2003; CRODA et al., 2007). Portanto, o estabelecimento do perfil da resposta imune anti-*Leptospira* é de fundamental importância para a obtenção de uma vacina eficaz contra a leptospirose, e também para melhorar o entendimento dos mecanismos de patogênese gerados pela infecção natural ou induzida. Contudo, os mecanismos da patogenia da bactéria e a resposta imune permanecem ainda pouco entendidos (MCBRIDE et al., 2005) sendo, a resposta imune humoral considerada o mecanismo primário de defesa do sistema imune contra a *Leptospira* spp. (KO et al., 2009).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a modulação da resposta imune humoral contra a leptospirose em animais vacinados com a proteína recombinante LigBrep (rLigBrep) e desafiados com cepa patogênica de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, através de teste de ELISA.

2. METODOLOGIA

Amostra dos soros: Foram analisadas amostras do soro de hamsters sírios dourados (*Mesocricetus auratus*). No experimento, um grupo de animais foi imunizado com a rLigBrep, e outro com bacterina, além disso, havia um grupo controle inoculado com PBS. Amostras foram coletadas no dia zero do experimento, após a vacinação com rLigBrep, e após o desafio com *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130. As amostras coletadas foram processadas através de centrifugação (5000 g, 4 minutos), e o soro obtido armazenado a -20°C.

Produção da proteína recombinante LigBrep: A clonagem e expressão da rLigBrep seguiu o protocolo descrito por (CONRAD et al., 2013).

Caracterização da resposta imune humoral: Placas de poliestireno de 96 cavidades (PolySorb, NUNC) foram sensibilizadas a 4°C, 16 h, com 50 ng/poço da proteína recombinante LigBrep, diluída em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6). Ensaio prévios, tipo *checkerboard*, foram realizados para determinar as diferentes diluições dos soros para cada anticorpo e isotipo testados. Os soros foram diluídos 1:25 (isotipos IgG1 e IgG2/3), 1:50 (anticorpo IgM) e 1:100 (anticorpo IgG total e isotipo IgG3), e incubados durante 1 h a 37°C. Em seguida, foram adicionados os anticorpos conjugados com peroxidase, o anti-IgG (1:6000), os isotipos anti-IgG1, anti-IgG2/3 e anti-IgG3 (1:500) e o anti-IgM (1:1000), seguido de incubação a 37°C durante 1 h. As reações foram reveladas com o substrato o-fenilendiamina (OPD), acrescido de peróxido de hidrogênio, e a placa mantida no escuro durante 15 minutos. A absorbância foi medida a 450 nm utilizando um leitor de placas de ELISA. Entre cada etapa, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T (Tampão Fosfato-salino adicionado com 0,05% de Tween 20).

Análise estatística: Para a avaliação dos resultados, a média das absorbâncias (OD_{450}) do ELISA foi calculada com os soros analisados em duplicata. O teste ANOVA seguido de Tukey foi utilizado para determinar diferenças significativas ($P < 0,0001$) entre os diferentes grupos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tipo de resposta imune tanto humoral quanto celular contra a leptospirose, ainda não é bem elucidado. Apesar da falta de conhecimento acerca dos mecanismos específicos de resposta imune, diversos grupos de pesquisa concordam que a resposta imune predominante é humoral (KO et al., 2009). Sendo assim, antes de padronizar o ELISA para a avaliação da resposta imune, diferentes concentrações de antígeno, anticorpo primário e secundário foram testadas, a fim de que se pudesse obter a maior diferença entre a absorbância dos soros dos animais vacinados e desafiados. Foram obtidas as melhores absorbâncias em ELISA, para os anticorpos IgG e IgM, quando utilizada a concentração de 50 ng da rLigBrep sensibilizada na placa (Figura 1). Os valores de absorbâncias (DO_{450}) obtidas para o isotipo IgG do grupo vacinado, foi $1,49 \pm 0,08$, comparado com o grupo vacinado/desafiado que foi $1,59 \pm 0,03$. Já para o anticorpo IgM, a DO_{450} do grupo vacinado foi $1,64 \pm 0,04$, e $0,87 \pm 0,01$ para o grupo vacinado/desafiado.

Os níveis de IgG total dos animais de ambos os grupos (vacinado e vacinado/desafiado) aumentaram significativamente comparado com os níveis do dia

0 (Figura 1). Os níveis do IgG total do grupo vacinado/desafiado foram maiores que os do grupo vacinado, mas não significativamente. Supreendentemente, os animais vacinados apresentaram um nível maior significativo de IgM comparando o grupo de animais vacinados com o grupo vacinado e desafiado. Uma possível explicação é o fato que LigB representa uma fração pequena das proteínas presentes no desafio e então não estimulou uma resposta imune forte. Os níveis do IgG também não foram significativamente elevados depois o desafio, possivelmente para os mesmos motivos.

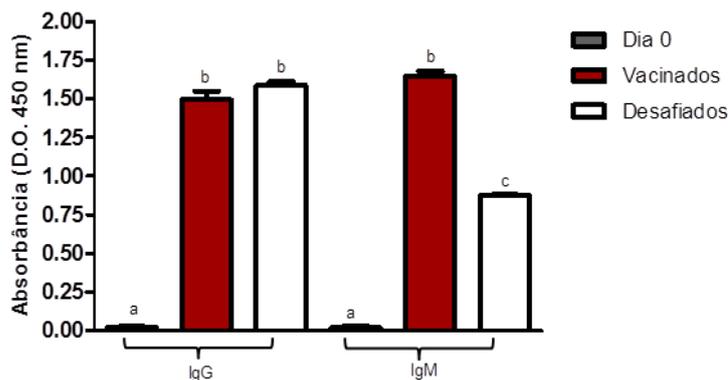


Figura 1. Avaliação da resposta de anticorpos IgG e IgM por ELISA indireto do soro do grupo vacinado com rLigBrep, e o grupo vacinado e desafiado com a cepa virulenta *L. interrogans* L1-130.

Numa análise das subclasses de IgG produzidos nos grupos vacinados e vacinados/desafiados foi possível observar, que os níveis de IgG1, tanto para os soros de animais vacinados quanto de animais vacinados e desafiados, foram superiores ao IgG2/3. O IgG1 está relacionado à produção timo dependente dominante contra antígenos proteicos (JANEWAY et al., 2010), sendo esta, uma possível explicação da predominância desse isotipo na resposta imune, uma vez que a vacina avaliada é constituída de uma proteína recombinante. Outra função desse isotipo e do IgG2 é a ativação do sistema complemento pela via clássica. Como não houve detecção do anticorpo isotipo IgG3, toda absorbância gerada pelo anticorpo anti-IgG2/3 foi interpretada como reconhecida pelo isotipo IgG2 (Figura 2).

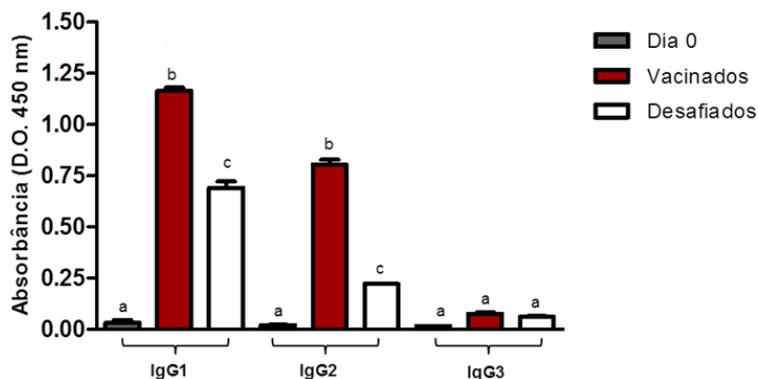


Figura 2. Avaliação dos isotipos IgG1, IgG2/3 e IgG3 por ELISA indireto do soro de animais vacinados com rLigBrep, e desafiados com cepa virulenta da *L. interrogans* L1-130.

4. CONCLUSÕES

Foi possível verificar um aumento significativo na produção dos anticorpos IgG e IgM nos grupos de animais vacinados com a proteína rLigBrep, e vacinados e desafiados com a cepa patogênica de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. E que as subclasses de IgG foram predominantemente IgG1 e IgG2. Entretanto, outros ensaios ainda são necessários, para que se possa compreender a resposta imune gerada pela vacinação, utilizando a proteína rLigBrep em modelo experimental, frente a infecção por *Leptospira* spp.

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.

CONRAD, N.; TAMBORINDEGUY, M.; GONÇALVES, C.; PEREIRA, W.; FABRES, M. e MCBRIDE, A. J. Expressão da proteína rLigBrep na forma solúvel e caracterização com soro humano. Encontro de Pós-graduação da UFPel, XV. Pelotas: Pró-reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, UFPel, 2013. p.

CRODA, J.; RAMOS, J. G.; MATSUNAGA, J.; QUEIROZ, A.; HOMMA, A.; RILEY, L. W.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G. e KO, A. I. *Leptospira* immunoglobulin-like proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.5, p. 1528-34. 2007.

JANEWAY, C.A; MURPHY, K; TRAVERS, P; WALPORT, M. **Imunobiologia.**, Artmed, 2010.

KO, A. I.; GOARANT, C. e PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Review of Microbiology**, v.7, n.10, p. 736-47. 2009.

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. e KO, A. I. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Molecular Microbiology**, v.49, n.4, p. 929-45. 2003.

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

PICARDEAU, M.; BERTHERAT, E.; JANCLOES, M.; SKOULOUDIS, A. N.; DURSKI, K. e HARTSKEERL, R. A. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**, v.78, n.1, p. 1-8. 2014.