

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM HAMSTERS VACINADOS COM PROTEÍNA RECOMBINANTE LigBrep E DESAFIADOS COM *L. interrogans* SOROVAR COPENHAGENI

LIANA NUNES BARBOSA¹; NEIDA LUCIA CONRAD²; JÉSSICA DIAS SOUZA²; MAURÍCIO TAMBORINDEGUY²; MARCELLE MOURA SILVEIRA²; ALAN JOHN ALEXANDER MCBRIDE³

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

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

jessi.dias@yahoo.com.br; mauriciotamborindeguy@gmail.com; marcellemsilveira@gmail.com

³Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas - alan.mcbride@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição global, causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* (BHARTI et al., 2003). Estima-se que anualmente ocorram 873.000 casos graves de leptospirose em humanos e 49.000 mortes (PICARDEAU et al., 2014). Atualmente, as vacinas compostas por bacterinas são utilizadas contra leptospirose, porém estas conferem uma curta duração da proteção, sendo limitada a sorovares locais, além de haver efeitos colaterais (ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Nesse contexto, torna-se necessário o desenvolvimento de uma vacina eficiente, que determine imunoproteção cruzada contra diversos sorovares patogênicos de leptospirose.

Proteínas de superfície são alvos potenciais para induzir resposta imune durante a infecção, sendo promissores alvos vacinais (DELLAGOSTIN et al., 2011). Dentre as proteínas de membrana externa, temos as proteínas da família das imunoglobulinas (*Leptospiral immunoglobulin-like* (Lig)) (MATSUNAGA et al., 2003). LigA e LigB possuem repetições em tandem de aproximadamente 90 resíduos de aminoácidos. Essas proteínas apresentam 100% de identidade nos domínios repetitivos de suas porções N-terminal (polipeptídio LigBrep). O gene *ligB* é conservado em todas as espécies de leptospirosas patogênicas (MCBRIDE et al., 2009).

O objetivo deste trabalho é avaliar a resposta imune humoral (IgG e IgM) após a imunização dos animais com a proteína recombinante LigBrep (rLigBrep) em hamsters desafiados com a cepa patogênica *L. interrogans* sorovar Copenhageni.

2. METODOLOGIA

2.1 Imunização e desafio dos animais: A proteína recombinante LigBrep (rLigBrep) foi expressa como descrito anteriormente (CONRAD et al., 2013) e, utilizada como antígeno para a imunização dos animais e para a avaliação da resposta imune humoral. Um grupo de animais foi imunizados com rLigBrep adsorvida em Alhydrogel e outro grupo com a bacterina. O grupo controle foi inoculado apenas com PBS também adsorvido em Alhydrogel. Posteriormente os animais foram desafiados com a cepa patogênica de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Foram coletados os soros dos dias 0, após a vacinação e após o desafio. A avaliação da resposta imune humoral foi realizada através de um ELISA indireto, utilizando como antígeno rLigBrep.

2.2 Avaliação da resposta imune humoral: A resposta imune humoral foi determinada através de ELISA indireto utilizando rLigBrep como antígeno. Para isso, placas de poliestireno de 96 cavidades (NUNC) foram sensibilizadas com 50 ng/cavidade de rLigBrep em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 por 18 h à 4°C. Os soros coletados dos animais nos dias 0, após a vacinação e após o desafio. Foram diluídos 1:50 em PBS-T pH 7,4 (Tampão Fosfato-salino contendo 0,05% de Tween 20) e adicionados 50 µL/cavidade, em duplicata. Posteriormente, os anticorpos anti-IgM de hamsters conjugado a peroxidase (1:300) e anti-IgG de hamsters (1:6000) foram adicionados as placas. Após cada etapa as placas foram incubadas por 1 h 37°C e lavadas 4 vezes com 200 µL de PBS-T. A revelação da reação antígeno-anticorpo foi realizada com a adição de o-fenilenodiamina (OPD) acrescida de peróxido de hidrogênio. Após o período de incubação de 15 min, no escuro, a temperatura ambiente, a leitura foi realizada em espectrofotômetro à 450 nm.

2.3 Análise Estatística: As análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism, utilizando o teste de ANOVA, seguido de teste de Tukey (Tukey Significant Difference).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar da falta de conhecimentos específicos dos mecanismos de resposta imune contra leptospirose, diversos grupos de pesquisa corroboram que a resposta imune predominante é humoral (KO et al., 2009).

Os animais imunizados com rLigBrep sobreviveram ao desafio com leptospiras virulentas. Além disso, aumentou significativamente os níveis de IgG nos grupos vacinados comparados ao grupo de controle. Os animais imunizados com a bacterina tiveram um acréscimo significativo no nível de anticorpos IgG após o desafio (Fig. 1). Os níveis de anticorpos dos animais vacinados foram similares entre os grupos imunizados. A resposta imune provocada por vacinas de bacterinas é praticamente toda direcionada contra o LPS, os quais são componentes majoritários da membrana da bactéria, por isso não induzem resposta cruzada, uma vez que os LPS são os determinantes antigênicos dos mais de 250 sorovares (BHARTI et al., 2003) e não induzem memória, sendo necessária revacinação. Esse resultado sugere que o uso da vacina baseada na rLigBrep além de induzir proteção como a bacterina, poderia superar algumas de suas limitações, como imunidade de curta duração ou sorovar específica.

Os animais que receberam somente PBS, levando ao óbito 80% do grupo, não desenvolveram anticorpos IgG (Fig. 1). Esse resultado sugere que a imunização com rLigBrep induz anticorpos IgG.

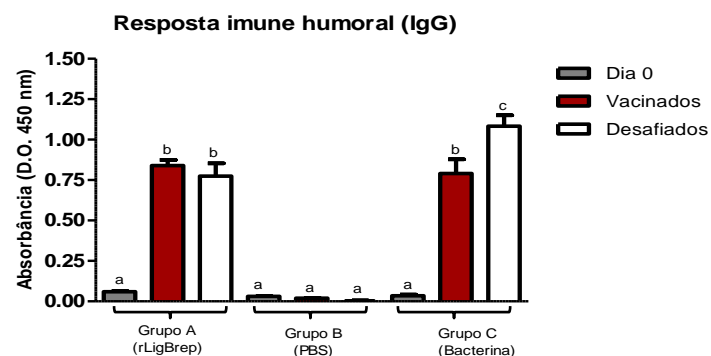


Figura 1. Resposta imune humoral IgG total em hamsters imunizados com a proteína rLigBrep. Avaliação dos soros individuais de cada animal através de

ELISA indireto. As colunas representam a média de IgG de cada grupo (10 animais nos grupos de Proteína e PBS e 5 animais no grupo da Bacterina), $P < 0,05$.

Na figura 2, estão representadas as absorvâncias individuais de anticorpos IgG de cada animal do grupo. Neste gráfico, observam-se as diferentes respostas entre os animais.

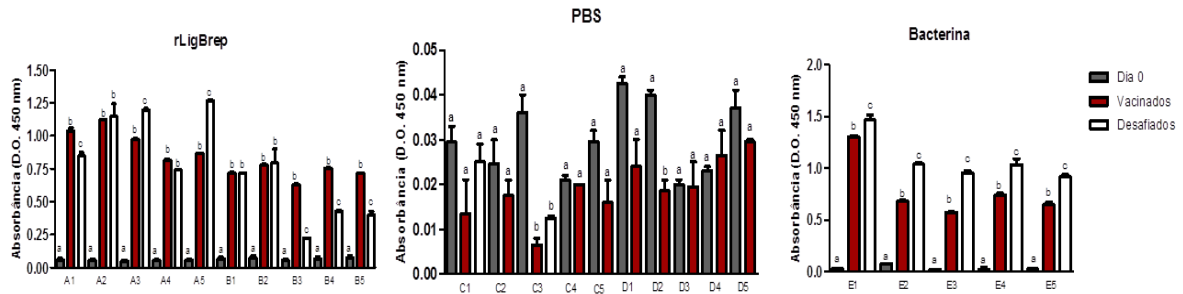


Figura 2. Resposta imune humoral IgG em hamsters imunizados com a proteína rLigBrep. Avaliação dos soros individuais de cada animal através de ELISA indireto. ($P < 0,05$)

No início da infecção são produzidas imunoglobulinas do tipo IgM para o controle da infecção. Após alguns dias, imunoglobulinas do tipo IgG são produzidas e provocam lise das leptospiras circulantes (LEVETT, 2001). A resposta imune relativa a anticorpos IgM, obteve absorvâncias inferiores as obtidas frente a IgG total, tanto no grupo imunizado com a proteína tanto como no grupo da bacterina. Esse resultado era esperado, pois, sabe-se que, anticorpos IgM têm níveis mais altos no início da infecção e estes vão diminuindo a medida em que vão aumentando os níveis de IgG. As coletas de soro foram realizadas 2 semanas após a última dose da vacina e 28 dias após o desafio.

O grupo imunizado com rLigBrep desenvolveu uma resposta IgM significativa após a vacinação e se manteve após o desafio. Enquanto que, no grupo imunizado com a bacterina, a produção de anticorpos IgM ocorreu somente após o desafio. Em ambos os grupos, proteína e bacterina, a resposta IgM após o desafio foi idêntica (Fig. 3).

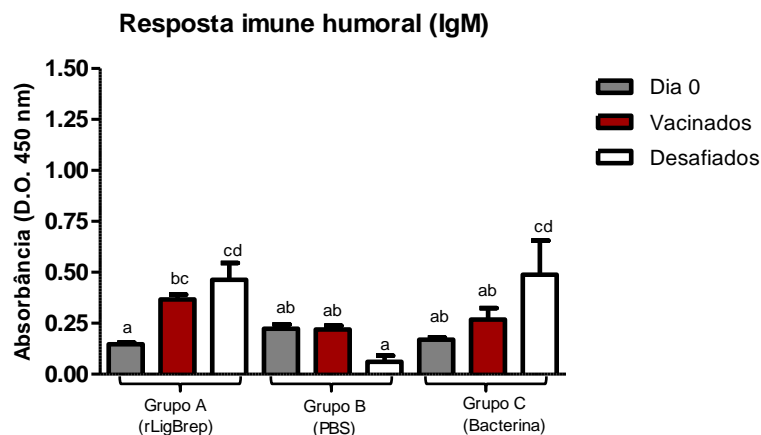


Figura 3. Resposta imune humoral IgM em hamsters imunizados com a proteína rLigBrep. Avaliação dos soros individuais de cada animal através de ELISA indireto. As colunas representam a média de IgM de cada grupo (10 animais nos grupos de Proteína e PBS e 5 animais no grupo da bacterina), $P < 0,05$.

4. CONCLUSÕES

A proteína recombinante LigBrep mostrou-se eficaz na indução de resposta imune humoral nos animais vacinados e desafiados. Desta forma, o aumento de anticorpos presentes no soro desses animais demonstra que esta proteína tem potencial como alvo para o desenvolvimento de vacinas para Leptospirose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICARDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E. e VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect Dis**, v.3, n.12, p. 757-71. 2003.

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.

DELLAGOSTIN, O. A.; GRASSMANN, A. A.; HARTWIG, D. D.; FELIX, S. R.; DA SILVA, E. F. e MCBRIDE, A. J. Recombinant vaccines against Leptospirosis. **Hum Vaccin**, v.7, n.11, p. 1215-24. 2011.

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. **Clin Microbiol Rev**, v.14, n.2, p. 296-326. 2001.

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. **Mol Microbiol**, v.49, n.4, p. 929-45. 2003.

MCBRIDE, A. J.; CERQUEIRA, G. M.; SUCHARD, M. A.; MOREIRA, A. N.; ZUERNER, R. L.; REIS, M. G.; HAAKE, D. A.; KO, A. I. e DELLAGOSTIN, O. A. Genetic diversity of the Leptospiral immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic *Leptospira* spp. **Infect Genet Evol**, v.9, n.2, p. 196-205. 2009.

PICARDEAU, M.; BERTHERAT, E.; JANCLOES, M.; SKOULLOUDIS, A. N.; DURSKI, K. e HARTSKEERL, R. A. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.78, n.1, p. 1-8. 2014.