

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOPROTETORA CONTRA LEPTOSPIROSE INDUZIDA POR ANTÍGENO LigAni ASSOCIADO A DIFERENTES ADJUVANTES

ÉVERTON BETTIN¹; CARLOS EDUARDO POUHEY DA CUNHA²; AMILTON SEIXAS NETO²; CRISTIANE PINHEIRO PESTANA³; MARCO ALBERTO MEDEIROS³; ODIR ANTONIO DELLAGOSTIN⁴

¹ Laboratório de Vacinologia, CDTec, UFPel – tombettin@outlook.com

² Laboratório de Vacinologia, CDTec, UFPel - cpouey@gmail.com; amiltonseixas@gmail.com

³ Bio-manguinhos, Fiocruz, RJ - cristiane.pinheiro@bio.fiocruz.br; medeiros@bio.fiocruz.br

⁴ Laboratório de Vacinologia, CDTec, UFPel – odir@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. Em humanos, a leptospirose pode variar de uma infecção assintomática, até uma grave doença, resultando em falência múltipla dos órgãos e morte (MURRAY et al., 2013). Embora exista a utilização de vacinas contra a leptospirose humana em alguns países, estas são bacterinas, que apresentam efeitos adversos locais e sistêmicos e conferem proteção sorovar específica (KOIZUMI; WATANABE, 2005).

Vários antígenos recombinantes têm sido avaliados em vacinas contra essa zoonose (DELLAGOSTIN et al., 2011). A região não idêntica da proteína LigA (LigAni) apresentou resultados promissores em experimentos de imunoproteção em modelo animal (SILVA et al., 2007, HARTWIG et al., 2014). A expressão desta proteína está associada à virulência, sendo fortemente induzida pelo incremento da osmolaridade do meio aos níveis fisiológicos do hospedeiro, indicando um envolvimento com os estágios iniciais da infecção (COUTINHO et al., 2011). Porém, vacinas compostas por antígenos purificados necessitam da presença de adjuvantes que potencializem a resposta imune, na medida em que não possuem uma diversidade antigênica suficiente para produzir uma atividade imunoestimulatória por si mesmas (MIYAJI et al., 2011).

Sob este panorama, o trabalho buscou avaliar a resposta imunoprotetora induzida pelo antígeno recombinante LigAni de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 associado à três diferentes adjuvantes, contra desafio letal homólogo.

2. METODOLOGIA

2.1 Aspectos éticos

Este estudo teve aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPel, obtendo o parecer favorável (CEEA 6843). O tratamento dos animais foi realizado com base nos princípios éticos da experimentação animal, recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), de acordo com a legislação vigente.

2.2 Formulações vacinais

A formulação das vacinas utilizadas neste trabalho foi realizada pelo Instituto Bio-manguinhos – RJ e disponibilizadas ao nosso grupo de pesquisa para avaliar o melhor adjuvante. Para as formulações, foi utilizado o antígeno LigAni associado ao adjuvante hidróxido de alumínio, e a outros dois adjuvantes comerciais, aqui denominados Adjuvante B e Adjuvante C.

2.2 Imunização e Desafio de Modelo Animal

Foram utilizados 45 hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos, com 6 semanas de idade, divididos em 7 grupos (Tabela 1). Os animais foram imunizados com duas doses, por via intramuscular, em intervalo de 14 dias.

Tabela 1. Distribuição dos animais no ensaio de imunoproteção

Grupos	Tratamento	Número de animais
G1	Al(OH) ₃	6
G2	Adjuvante B	6
G3	Adjuvante C	6
G4	LigAni (30 µg) + Al(OH) ₃	7
G5	LigAni (30 µg) + Adjuvante B	7
G6	LigAni (30 µg) + Adjuvante C	7
G7	Bacterina	6

Foram realizadas coletas de sangue nos dias 0 e 28. Os animais foram desafiados com 10³ *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130, por via intraperitoneal 14 dias após a segunda dose. Após 28 dias do desafio os sobreviventes foram eutanasiados. Rim direito, fígado e pulmão foram armazenados em nitrogênio líquido. O rim esquerdo foi macerado para reisolamento do patógeno.

2.3 Avaliação da resposta imune humoral

A avaliação da resposta humoral foi realizada por ELISA indireto. As placas foram sensibilizadas com 200 ng de LigAni por poço, diluídas em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M (pH 9,6). Soros individuais dos dias 0 e 28 foram utilizados como anticorpos primários em uma diluição de 1:50. Como anticorpo secundário foi utilizado anticorpo anti-hamster conjugado com peroxidase (1:6000). Para revelação utilizou-se o-fenilenediamina diidrocloreto (OPD) e peróxido de hidrogênio. As reações foram interrompidas com ácido sulfúrico 0,1M. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a um comprimento de ondas de 492nm.

Posteriormente foi realizada titulação individual dos soros reagentes. A titulação abrangeu diluições seriadas de base 2, de 1:800 até 1:102.400, mantendo-se a metodologia do ELISA já descrita em todas as demais etapas. O ponto de corte foi considerado como a média das absorbâncias do controle negativo (reação sem anticorpo primário) somados a dois desvios padrões.

Para a análise estatística foi utilizado o *software* GraphPad Prism 5 e os testes One Way ANOVA e Two Way ANOVA seguidos de Bonferroni.

2.4 Avaliação da imunidade esterilizante

Para avaliação da imunidade esterilizante os macerados renais, realizados após eutanásia, foram repicados em meio EMJH (Difco) enriquecido com 10% de suplemento comercial (Difco). As culturas foram analisadas semanalmente por um período de 12 semanas por microscopia de campo escuro.

A quantificação da carga bacteriana dos órgãos coletados foi realizada por PCR em tempo real (RT-PCR), utilizando o gene *lipL32* como alvo. Para isto foram utilizados 20 mg de tecido renal, pulmonar e hepático, sendo o DNA extraído através do kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega). As condições finais da reação de RT-PCR foram de: 300 nmol/L para cada *primer*, 250 nmol/L de sonda marcada com FAM e 6 µL de DNA, em um volume final de 20 µL. O protocolo de amplificação consistiu em 2 min à 50 °C e 10 min à 95 °C, seguido de 40 ciclos de amplificação (95 °C por 15 s e 60 °C por 60 s). A amplificação do gene codificante para a beta-actina foi utilizada como controle interno da reação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os animais dos grupos utilizados como controle (G1-G3), vieram a óbito entre os dias 16 e 21 pós-desafio. Os animais dos três grupos em que houve a administração do antígeno LigAni (G4-G6), bem como os animais do grupo Bacterina (G7) sobreviveram ao experimento.

Os soros do dia 0 não reagiram quando testados em ELISA. Os três grupos imunizados com o antígeno apresentaram diferença estatística nas reações do dia 28 quando comparadas ao dia 0 e entre si. O resultado negativo apresentado pelo grupo Bacterina é atribuído a diversidade antigênica desta formulação, conferindo baixos níveis de anticorpos específicos à LigAni. A titulação dos grupos positivos permitiu uma melhor visualização e comparação da resposta humoral entre eles, evitando-se uma saturação dos complexos antígeno-anticorpo. Foi possível observar um título de 12.800 para o grupo LigAni + Adjuvante B, e de 51.200 para o grupo LigAni + Al(OH)₃. O grupo LigAni + Adjuvante C não atingiu o ponto de corte (0,089) nas diluições realizadas, sendo atribuído título de 102.400. Todos os grupos diferenciaram-se nas diluições de 1:3.200 ($p < 0,001$) e 1:6.400 ($p < 0,05$) (Figura 1).

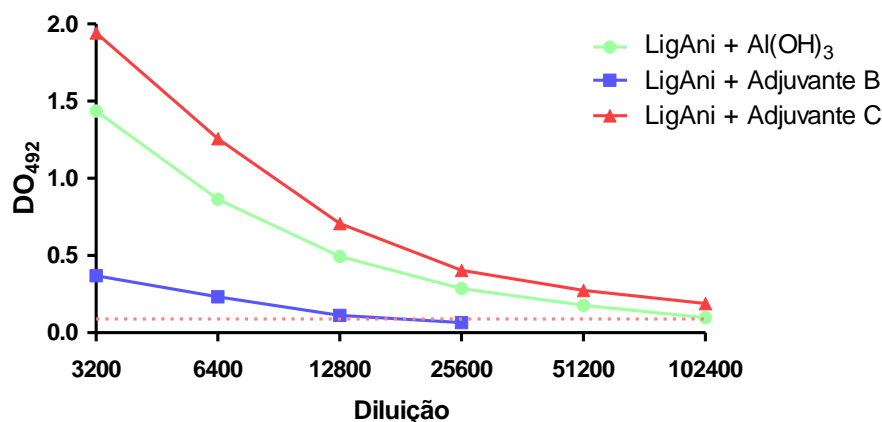


Figura 1. Titulação por ELISA dos soros reagentes. Ponto de corte representado pelo tracejado em vermelho.

As culturas realizadas a partir dos macerados renais dos animais sobreviventes não demonstraram crescimento de leptospiros após o período de 12

semanas. Pela técnica de PCR em tempo real foi possível identificar e quantificar a presença de leptospiros em todas as amostras analisadas, sem obter diferença significativa na carga bacteriana quantificada dos diferentes órgãos e grupos. A diferença dos resultados em relação aos cultivos pode ser atribuída à viabilidade dos patógenos, ou a maior sensibilidade da técnica molecular.

4. CONCLUSÕES

As formulações vacinais contendo o antígeno LigAni associado ao adjuvante Al(OH)₃ e aos dois adjuvantes comerciais testados, conferem proteção contra desafio homólogo em hamsters. Nenhuma das formulações foi capaz de conferir imunidade esterilizante. A proteína LigAni associada ao Adjuvante C tem capacidade de induzir uma resposta humoral específica significativamente maior que quando associada ao hidróxido de alumínio. Novas formulações serão testadas em busca de uma imunidade esterilizante.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COUTINHO, M.; CHOY, H.; KELLEY, M.; MATSUNAGA, J.; BABBITT, J.; LEWIS, M.; ALEIXO, J.A.; HAAKE, D. A LigA Three-Domain Region Protects Hamsters from Lethal Infection by *Leptospira interrogans*. **Neglected Tropical Diseases**, Washington, v.12, n.5, 2011.

DELLAGOSTIN O.A.; GRASSMAN, A.A.; HARTWIG, D.; FÉLIX, S.; SILVA, É.F.; MCBRIDE, A. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Human Vaccines**, Austin, v.11, n.7, p.1215-1224, 2011.

HARTWIG, D.; BACELO, K.; OLIVEIRA, P.; OLIVEIRA, T.; SEIXAS, F.; AMARAL, M.; HARLEBEN, C.; MCBRIDE, A.; DELLAGOSTIN, O.A. Mannosylated LigANI Produced in *Pichia pastoris* Protects Hamsters Against Leptospirosis. **Current Microbiology**, Nova York, v.68, n.4, p.524-530, 2014.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospirosis vaccines: Past, present, and future. **Symposium**, Tokio, v.51, n.3, p210-214, 2005.

MURRAY, G.; LO, M.; BULACH, D.; SRIKAM, A.; SEEMAN, T.; QUINSEY, N.; SERMSWAN, R.; ALLEN, A.; ADLER, B. Evaluation of 238 antigens of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo for protection against kidney colonisation. **Vaccine**, Guildford, v.31, n.1, p. 495-499, 2013.

MYAJI, E.N.; CARVALHO, E.; OLIVEIRA, M.L.S.; RAW, I.; HO, P.L. Trends in adjuvant development for vaccines: DAMPs and PAMPs as potential new adjuvants. **Brazil Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v.44, n.6, p.500-513, 2011.

SILVA, É.F.; MEDEIROS, M.A.; MCBRIDE, A.; MATSUNAGA, J.; ESTEVES, G.; RAMOS, J.; SANTOS, C.; CRODA, J.; HOMMA, A.; DELLAGOSTIN, O.A.; HAKEE, D.; REIS, M.; KO, A. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, Guildford, v.25, n.1, p.6277-6286, 2007.