

# A PROTEÍNA RECOMBINANTE LIGBREP INDUZ PROTEÇÃO CONTRA LEPTOSPIROSE EM HAMSTERS

NEIDA LUCIA CONRAD<sup>1</sup>; JÉSSICA DIAS SOUZA<sup>2</sup>; MAURÍCIO  
TAMBORINDEGUY<sup>2</sup>; MARCELLE MOURA SILVEIRA<sup>2</sup>  
SAMUEL RODRIGUES FÉLIX<sup>3</sup>; ALAN JOHN ALEXANDER MCBRIDE<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Biotecnologia, CDTec, Universidade Federal de Pelotas – [neidaconrad@yahoo.com.br](mailto:neidaconrad@yahoo.com.br)

<sup>2</sup>Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Biotecnologia, CDTec, Universidade Federal de Pelotas – [jessi.dias@yahoo.com.br](mailto:jessi.dias@yahoo.com.br); [mauriciotamborindeguy@gmail.com](mailto:mauriciotamborindeguy@gmail.com); [marcellemsilveira@gmail.com](mailto:marcellemsilveira@gmail.com)

<sup>3</sup>ClinPet, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas – [samuelf@gmail.com](mailto:samuelf@gmail.com)

<sup>4</sup>Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Biotecnologia, CDTec, Universidade Federal de Pelotas – [alan.mcbride@ufpel.edu.br](mailto:alan.mcbride@ufpel.edu.br)

## 1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição global, e as vacinas contra leptospirose disponíveis atualmente são bacterinas, as quais conferem uma proteção de curta duração e sorovar-específica, além de haver efeitos colaterais (ADLER; DE LA PENA MOCTEUMA, 2010). Desta forma, o desenvolvimento de uma vacina eficiente contra leptospirose, com imunoproteção cruzada contra diferentes sorovares, permanece um desafio, e por isso, os esforços para o desenvolvimento de vacinas recombinantes.

As proteínas Lig (*Leptospiral immunoglobulin-like protein*), têm sido apontadas como candidatas promissoras para o desenvolvimento de uma vacina, pois localizam-se na membrana externa das leptospiros e são fortemente reconhecidas pelo soro de pacientes diagnosticados com a doença. (MATSUNAGA et al., 2003; CRODA et al., 2007). 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 (LigBrep). O gene *ligB* é conservado em todas as espécies de *Leptospira* patogênicas (MCBRIDE et al., 2009).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho é avaliar se a proteína recombinante LigBrep induz imunidade protetora em hamsters desafiados com a cepa virulenta *L. interrogans* sorovar Copenhageni.

## 2. METODOLOGIA

**2.1 Imunização:** Um grupo de 10 animais de 3 a 4 semanas de idade foi imunizado com 40 e 20 µg da proteína recombinante LigBrep (rLigBrep), expressa como descrito anteriormente, (CONRAD, et al., 2013) adsorvida em Alhydrogel nos dias 0 e 14, respectivamente. O grupo de controle negativo (10 hamsters), foi inoculado com duas doses de 0,2 mL de PBS estéril adsorvido em Alhydrogel. Como controle positivo um grupo de 5 hamsters foi imunizado com a bacterina (10<sup>9</sup> leptospiros inativadas em 0,2 mL PBS). Os animais foram sangrados do plexo venoso retro-orbital dois dias antes da primeira imunização, dois dias antes do desafio e no momento do óbito ou eutanásia do animal.

**2.2 Desafio:** Os hamsters foram desafiados intraperitonealmente com *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 duas semanas após a última imunização. A dose foi determinada através do experimento de DL-50.

Todos os animais foram observados diariamente e a eutanásia foi feita quando os animais apresentaram os primeiros sinais clínicos da leptospirose.

**2.3 Avaliação da resposta imune humoral em hamsters:** A produção de anticorpos foi avaliada através de ELISA indireto utilizando rLigBrep como antígeno. Foram avaliados os níveis de anticorpos IgG (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2/3</sub> e IgG<sub>3</sub>) e IgM em hamsters. A titulação dos anticorpos IgG foi determinada pela técnica de diluição seriada, partindo da diluição de 1:50 até 1:51.200. O *cut-off* foi determinado 3 vezes o desvio padrão do controle negativo mais concentrado.

**2.4 Imprint.** As impressões foram obtidas através do contato dos órgãos em lâminas de vidro previamente preparadas com poli-L-lisina, imediatamente após o sacrifício dos animais. Em seguida, as lâminas foram deixadas à temperatura ambiente até a secagem das impressões e logo depois fixadas em acetona por 3 min. As áreas das impressões foram delimitadas com caneta hidrofóbica antes de iniciar o procedimento de imunofluorescência. O anticorpo primário anti-*Leptospira* produzido em coelho foi utilizado para marcar as leptospirosas. Para marcação foi utilizado um anticorpo conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) anti-coelho. A visualização foi realizada em microscopia de fluorescência.

**2.5 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

#### 3.1 Avaliação da sobrevivência de hamsters frente ao desafio com leptospirosas letais

Ambos os grupos de animais imunizados com rLigBrep e a bacterina sobreviveram ao desafio com leptospirosas letais. Já 80,0% dos animais do grupo de controle negativo vieram a óbito (Figura 1).

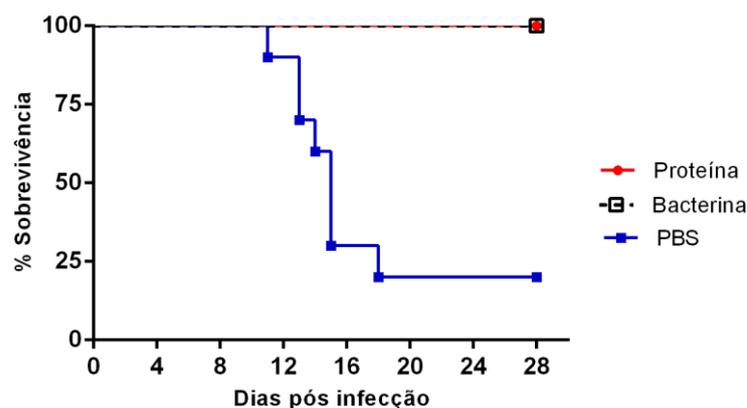


Figura 1. Sobrevivência dos hamsters inoculados com rLigBrep bacterina ou com PBS (grupo controle) e desafiados com *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130. ( $P < 0,0007$ ).

#### 3.2 Avaliação da Resposta Imune Humoral

Os níveis de anticorpos IgG dos animais imunizados com rLigBrep e com a bacterina foram semelhantes. Esse resultado sugere a proteína rLigBrep além de induzir proteção frente ao desafio com leptospirosas letais, poderia superar algumas das limitações da bacterina (ADLER; DE LA PENA MOCTEUMA, 2010).

Entretanto, após o desafio, o grupo da bactéria obteve aumento significativo de anticorpos, enquanto que no grupo da proteína, o nível de anticorpos se manteve.

Em relação aos anticorpos IgM, tanto o grupo imunizado com a proteína como com a bactéria, apresentaram níveis de anticorpos inferiores a IgG total. 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 (MURPHY et al., 2010). O grupo do controle negativo não desenvolveu anticorpos IgG nem IgM em nenhum dos soros (vacinação e vacinação/desafio) avaliados.

Numa análise das subclasses do IgG, o grupo imunizado com rLigBrep induziu a produção de anticorpos IgG1 e IgG2, sendo que a presença de IgG2 foi superior a IgG1 no soro coletado após o desafio. Neste grupo de animais não houve a detecção de anticorpos do isotipo IgG3 (Figura 2).

Os anticorpos dos animais imunizados com a bactéria demonstraram ser somente do isotipo IgG2. As absorbâncias obtidas frente aos outros isotipos não foram significativas neste grupo (Figura 2). Também foram avaliados os soros dos animais do grupo controle (inoculados com PBS), entretanto, não houve presença significativa de anticorpos de nenhum isotipo.

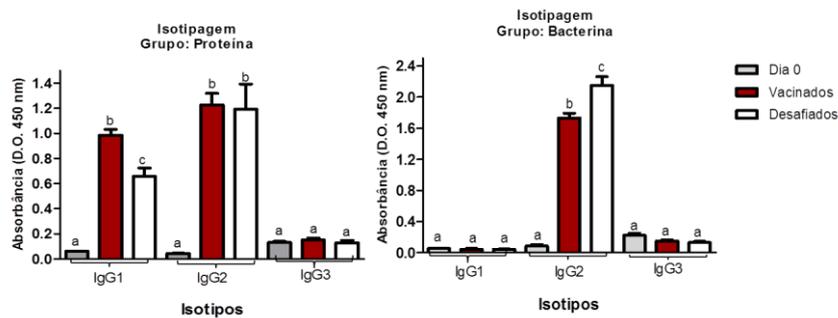


Figura 2. **Isotipagem dos anticorpos.** Avaliação dos soros individuais de cada animal através de ELISA indireto utilizando rLigBrep como antígeno. As colunas representam a média de cada grupo e as barras o desvio padrão,  $P < 0,05$ .

Na titulação dos anticorpos, os soros (vacinados e vacinação/desafio) dos animais imunizados com rLigBrep apresentaram título de 1:1600 (Figure 4). Os soros dos animais imunizados com a bactéria apresentaram o título de 1:800 em ambos os soros (vacinados e desafio) (Figure 3).

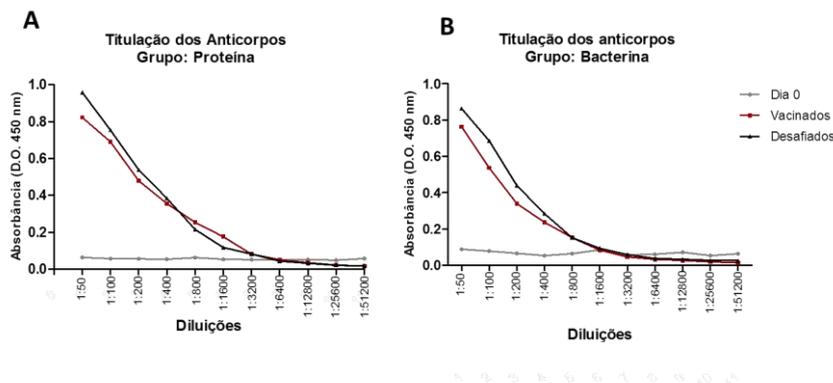


Figura 3. Titulação dos anticorpos utilizando como antígeno rLigBrep. A) Pool de soros dos animais imunizados com a proteína; B) Pool de soros dos animais imunizados com a bactéria.

### 3.3 Avaliação da imunidade esterilizante

No *imprint* não houve a detecção de leptospiras em nenhum dos tecidos avaliados no grupo de animais imunizados com rLigBrep ou a bacterina. Esse resultado sugere que tanto a proteína recombinante como a bacterina, além de proteger os animais, também induziram imunidade esterilizante frente ao desafio homólogo. A avaliação de imunidade esterilizante será confirmada por bacteriologia. No grupo de animais controle, inoculados com PBS, foi observada a presença de leptospiras na maioria dos tecidos. Os primeiros animais que vieram a óbito apresentaram leptospiras nos 3 tecidos avaliados, enquanto que, os animais que vieram a óbito mais tarde possuíam leptospiras em 2 ou menos tecidos.

## 4. CONCLUSÕES

Estes resultados sugere que a proteína recombinante, rLigBrep, seja um alvo promissor para o desenvolvimento de uma vacina contra leptospirose. Bacterina induziu uma resposta Th1, caracterizada pela presença do IgG2, comparado da rLigBrep que induziu uma resposta mista Th1/Th2 caracterizada pela presença de IgG1 e IgG2.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, B.; DE LA PENA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, Londres, v. 140, n. 3-4, p. 287-296, 2010.

CONRAD, N. L.; TAMBORINDEGUY, M.; GONÇALVES, C.; PEREIRA, W.; FABRES, M.; MCBRIDE, A. J. A. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA rLigBrep NA FORMA SOLÚVEL E CARACTERIZAÇÃO COM SORO HUMANO. In: **Encontro de Pós-Graduação UFPEL, 15º**. Pelotas, 2013. Anais. Pelotas: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, 2013.

CRODA, J.; RAMOS, J. G. R.; MATSUNAGA, J.; QUEIROZ, A.; HOMMA, A.; RILEY, L. W.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. *Leptospira* Immunoglobulin-Like Proteins as a Serodiagnostic Marker for Acute Leptospirosis. **J. Clin Microbiol.**, v. 45, n. 5, p. 1528-1534, 2007.

MATSUNAGA, J.; BAROCCHI, M. A.; CRODA, J.; *et al.* Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Molecular Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 929-945, 2003.

MCBRIDE, A. J. A.; CERQUEIRA, G. M.; SUCHARD, M. A. *et al.* Genetic diversity of the *Leptospira* immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic *Leptospira* spp. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 2, p. 196-205, 2009.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunologia de Janeway**. Porto Alegre: Artmed Editora S.A., 2010.