

ADDAVAX UM NOVO ADJUVANTE EM VACINAS PARA LEPTOSPIROSE

MARCELLE MOURA SILVEIRA¹; NEIDA LUCIA CONRAD¹; JÉSSICA DIAS SOUZA¹; ANDRÉ ALEX GRASSMANN¹; GREGORI REINHARDT¹; ALAN JOHN ALEXANDER MCBRIDE¹

¹ Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológica, Universidade Federal de Pelotas – marcellemsilveira@gmail.com

¹ Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológica, Universidade Federal de Pelotas – neidaconrad@yahoo.com.br

¹ Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológica, Universidade Federal de Pelotas – jessi.dias@yahoo.com.br

¹ Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológica, Universidade Federal de Pelotas – grassmann.aa@gmail.com

¹ Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológica, Universidade Federal de Pelotas – gregorinr@hotmail.com

¹ Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológica, Universidade Federal de Pelotas – alan.mcbride@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença de distribuição mundial causada por espiroquetas do gênero *Leptospira*. Estima-se que anualmente ocorram mais de 873 mil casos de leptospirose no mundo. Apenas no Brasil, são notificados durante as epidemias aproximadamente 10.000 casos de leptospirose nesse mesmo período (REIS et al., 2008). Humanos podem infectar-se através do contato direto ou indireto com a urina de animais portadores de leptospiras patogênicas (BHARTI et al., 2003; KOIZUMI e WATANABE, 2005). Os sintomas vão desde um estado febril moderado, vômitos, dores de cabeça, musculares e abdominais podendo evoluir para uma forma mais grave da doença com uma taxa de mortalidade em torno de 10-15% (MCBRIDE et al., 2005) sendo, atualmente a síndrome hemorrágica pulmonar severa (SHPS) a principal causa de morte durante epidemias no Brasil (GOUVEIA et al., 2008).

A falta de controle eficaz somado ao fato de que as ferramentas laboratoriais disponíveis para o diagnóstico da leptospirose são inadequadas, têm dificultado respostas efetivas à nível de saúde pública (MCBRIDE et al., 2007; REIS et al., 2008) sendo dessa forma o uso de vacinas imprescindíveis para a prevenção e controle da doença. As vacinas disponíveis baseiam-se na célula inteira inativada (bacterina) que exigem imunizações anuais de reforço e não conferem proteção cruzada (DELLAGOSTIN et al., 2011). Além disso, essas vacinas estão relacionadas a diversos efeitos colaterais (FAINE, 1999) Uma alternativa para o desenvolvimento de novas vacinas são as vacinas de subunidade que não apresentam as limitações encontradas nas imunizações com bacterinas (BACELO et al., 2014). Entretanto, vacinas de subunidade não têm padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e a capacidade para ativar o sistema imune de uma maneira adequada é prejudicada, sendo necessário o uso de adjuvantes (BACELO et al., 2014).

As proteínas da família Lig (*Leptospiral immunoglobulin-like*), dentre elas a LigB, são proteínas expostas na superfície de *Leptospira* spp. patogênicas, são altamente conservadas, tem sua expressão aumentadas durante o processo de invasão e estão envolvidas no mecanismo de patogenicidade desta bactéria. Um

fragmento da LigB, (LigBrep) está envolvida na indução de proteção Neida Conrad (Comunicação pessoal) e tem conferido imunidade esterilizante na maioria dos hamsters sendo, portanto, um promissor alvo vacinal (CERQUEIRA et al., 2009; DELLAGOSTIN et al., 2011; YE et al., 2014). Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial adjuvante do AddaVax em uma vacina para leptospirose utilizando como antígeno a LigBrep.

2. METODOLOGIA

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as regulamentações, políticas e princípios do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel. Hamsters sírio dourado com 4-5 semanas de idade saudáveis (Biotério Central, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil) foram utilizados neste trabalho. Os animais foram divididos em 2 grupos: O grupo 1 (G1) foi composto por 7 animais que foram vacinados com 50 µg da proteína recombinante LigBrep (rLigBrep) administrada com 50 µl de AddaVax e o grupo 2 (G2) foi composto por 8 animais vacinados com salina tamponada fosfatada (PBS) estéril administrado com AddaVax. Os Hamsters receberam duas imunizações nos dias 0 e 14 via intramuscular. Três dias antes da primeira imunização e 14 dias depois da segunda imunização foram coletadas amostras de sangue do plexo venoso retro-orbital. Os hamsters foram desafiados intraperitonealmente duas semanas após a última imunização com uma dose equivalente de 5xDL50 (100 leptospiras) de *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae sorovar Copenhageni, Fiocruz L1-130).

A resposta imune humoral induzida pela vacinação utilizando AddaVax como adjuvante e a rLigBrep como antígeno foi avaliada através de ELISA indireto. Microplacas de poliestireno de 96 cavidades (CralPlast) foram sensibilizadas com rLigBrep (100 ng por cavidade) diluída em tampão carbonato-bicarbonato (0,05 M, pH 9,6). Em seguida foram adicionados os soros de cada animal diluídos 1:100 em PBS-T (tampão fosfato salino, 0,05% de Tween 20). Anticorpo anti-hamster conjugado a peroxidase diluído em PBS-T (1:4000) foi adicionado às placas. Todas as reações ocorreram por 1h a 37 °C, os reagentes foram utilizados a um volume de 50 µL/cavidade e após todas as etapas de incubação (exceto após a adição do conjugado), as placas foram lavadas três vezes com 200 µL/cavidade de PBS-T. Após a remoção de excesso de conjugado através de 5 lavagens com PBS-T, as reações foram reveladas através da adição do cromógeno ortofenilenodiamina (OPD) diluído em tampão fosfato-citrato pH 4,0 (0,2 M com 0,01% de H₂O₂). As placas foram mantidas no escuro por 15 min a temperatura ambiente e a leitura da DO450 nm foi realizada em espectrofotômetro para microplacas Thermo Plate. A avaliação dos soros de cada animal foi realizada em duplicata. Como controles negativo e positivo das reações, foram utilizados soros do dia 0 e um *pool* de soros de animais imunizados com a rLigBrep associada com Hidróxido de alumínio como adjuvante, respectivamente.

O teste *t* de Student foi utilizado para determinar diferenças significativas ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso de vacinas recombinantes de subunidade tem se mostrado como uma alternativa para o controle de diversas doenças. Entretanto, uma limitação encontrada nesse tipo de vacina é sua baixa imunogenicidade. Neste estudo, foi demonstrado que o AddaVax foi capaz de potencializar a resposta imune humoral de uma vacina que utilizou a LigBrep como antígeno.

Os níveis de anticorpos gerados pela vacina foram significativamente maiores em relação ao grupo controle (PBS), Figura 1. Essa proteína foi escolhida como imunógeno por ter demonstrado capacidade de aumentar a resposta imune e proteção em diferentes estudos, tanto em vacinas de DNA, como nas de subunidade (DELLAGOSTIN et al., 2011; FORSTER et al., 2013). Além disso, os níveis de anticorpos gerados pela vacina que utilizou o AddaVax como adjuvante foram significativamente maiores do que os encontrados em uma vacina que conferiu 90% de proteção em hamsters utilizando o mesmo antígeno e hidróxido de alumínio como adjuvante, Neida Conrad (Comunicação pessoal). .

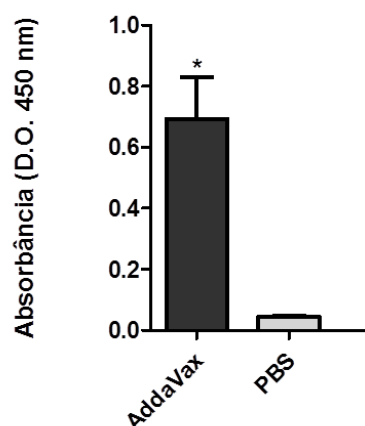


Figura 1. Avaliação da resposta imune humoral induzida pela vacina utilizando como adjuvante AddaVax e como antígeno a proteína LigBrep. A avaliação dos soros de cada animal foi realizada em duplicata. (*) representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$). As barras de erro representam desvios padrão.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos representam uma contribuição importante no campo de desenvolvimento de vacinas. Este foi o primeiro trabalho a demonstrar que o uso do AddaVax como adjuvante é capaz de induzir resposta imune humoral.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BACELO, K. L.; HARTWIG, D. D.; SEIXAS, F. K.; SCHUCH, R.; MOREIRA ADA, S.; AMARAL, M.; COLLARES, T.; VENDRUSCULO, C. T.; MCBRIDE, A. J. e DELLAGOSTIN, O. A. Xanthan gum as an adjuvant in a subunit vaccine preparation against leptospirosis. **Biomed Res Int**, v.2014, p. 636491. 2014.

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.

CERQUEIRA, G. M.; MCBRIDE, A. J.; PICARDEAU, M.; RIBEIRO, S. G.; MOREIRA, A. N.; MOREL, V.; REIS, M. G.; KO, A. I. e DELLAGOSTIN, O. A. Distribution of the leptospiral immunoglobulin-like (lig) genes in pathogenic *Leptospira* species and application of ligB to typing leptospiral isolates. **J Med Microbiol**, v.58, n.Pt 9, p. 1173-81. 2009.

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.

FAINE, S. B. A., B.; BOLIN, C. E PEROLAT, P. *Leptospira* and leptospirosis. **Melbourne, Australia: MediSci**, p. 1999.

FORSTER, K. M.; HARTWIG, D. D.; SEIXAS, F. K.; BACELO, K. L.; AMARAL, M.; HARTLEBEN, C. P. e DELLAGOSTIN, O. A. A conserved region of leptospiral immunoglobulin-like A and B proteins as a DNA vaccine elicits a prophylactic immune response against leptospirosis. **Clin Vaccine Immunol**, v.20, n.5, p. 725-31. 2013.

GOUVEIA, E. L.; METCALFE, J.; DE CARVALHO, A. L.; AIRES, T. S.; VILLASBOAS-BISNETO, J. C.; QUEIROZ, A.; SANTOS, A. C.; SALGADO, K.; REIS, M. G. e KO, A. I. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v.14, n.3, p. 505-8. 2008.

KOIZUMI, N. e WATANABE, H. Leptospirosis vaccines: past, present, and future. **J Postgrad Med**, v.51, n.3, p. 210-4. 2005.

MCBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G. e KO, A. I. Leptospirosis. **Curr Opin Infect Dis**, v.18, n.5, p. 376-86. 2005.

MCBRIDE, A. J.; SANTOS, B. L.; QUEIROZ, A.; SANTOS, A. C.; HARTSKEERL, R. A.; REIS, M. G. e KO, A. I. Evaluation of four whole-cell *Leptospira*-based serological tests for diagnosis of urban leptospirosis. **Clin Vaccine Immunol**, v.14, n.9, p. 1245-8. 2007.

REIS, R. B.; RIBEIRO, G. S.; FELZEMBURGH, R. D.; SANTANA, F. S.; MOHR, S.; MELENDEZ, A. X.; QUEIROZ, A.; SANTOS, A. C.; RAVINES, R. R.; TASSINARI, W. S.; CARVALHO, M. S.; REIS, M. G. e KO, A. I. Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. **PLoS Negl Trop Dis**, v.2, n.4, p. e228. 2008.

YE, C.; YAN, W.; XIANG, H.; HE, H.; YANG, M.; IJAZ, M.; USEH, N.; HSIEH, C. L.; MCDONOUGH, P. L.; MCDONOUGH, S. P.; MOHAMED, H.; YANG, Z. e CHANG, Y. F. Recombinant antigens rLipL21, rLoa22, rLipL32 and rLigACon4-8 for serological diagnosis of leptospirosis by enzyme-linked immunosorbent assays in dogs. **PLoS One**, v.9, n.12, p. e111367. 2014.