

## VACINA RECOMBINANTE CONTRA LEPTOSPIROSE INDUZ IMUNIDADE PROTETORA E ESTERILIZANTE EM HAMSTERS

NEIDA LUCIA CONRAD<sup>1</sup>; MARCELLE MOURA SILVEIRA<sup>2</sup>; JÉSSICA DIAS SOUZA<sup>2</sup>;  
MAURÍCIO TAMBORINDEGUY<sup>2</sup>; LIANA NUNES BARBOSA<sup>2</sup>; CAROLINE AMURIM<sup>2</sup>;  
ALAN JOHN ALEXANDER MCBRIDE<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Universidade Federal de Pelotas – neidaconrad@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Universidade Federal de Pelotas – jessi.dias@yahoo.com.br; mauriciotamborindeguy@gmail.com; marcellemsilveira@gmail.com

<sup>3</sup>Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Universidade Federal de Pelotas – alan.mcbride@ufpel.edu.br

### 1. INTRODUÇÃO

A leptospirose, uma zoonose negligenciada de distribuição global, é causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* (FAINE et al., 1999). Mais de 800 mil novos casos de leptospirose em humanos com 49.000 mortes são relatados anualmente (PICARDEAU et. al., 2014). A vacinação é a medida profilática mais promissora para o controle da leptospirose. Entretanto, as vacinas atualmente disponíveis são bacterinas, as quais conferem uma proteção de curta duração e sorovar-específica, além de haver efeitos colaterais (ADLER; DE LA PENA MOCTEUMA, 2010). Logo, 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*), têm sido apontadas como candidatas promissoras para o desenvolvimento de uma vacina, pois localizam-se na membrana externa das leptospiras e são fortemente reconhecidas pelo soro de pacientes diagnosticados com a doença (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 Ensaio de proteção em hamsters:** Todos os procedimentos com animais foram realizados de acordo com normas aprovadas pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPel, sob nº 3782. A vacina, composta pela proteína recombinante LigBrep adsorvida no adjuvante *Alhydrogel*, foi administrada via intramuscular em 10 animais. O grupo controle (n=10) foi inoculado com 0,2 ml de solução tampão de fosfato/salino (PBS) + *Alhydrogel*. Como controle positivo, um grupo de 5 hamsters foi imunizado com a bacterina ( $10^9$  leptospiras inativadas em 0,2 ml de PBS). Os animais foram inoculados nos dias 0 e 14. O soro pré-imune foi coletado do plexo venoso retro-orbital dois dias antes da primeira imunização e o soro imune no dia 26. O desafio foi realizado com 5 vezes a Dose Letal 50% (DL50) de *L. interrogans* sorovar Copenhageni no dia 28, via intraperitoneal. Todos os animais foram observados e pesados

diariamente após o desafio. No momento do óbito ou eutanásia do animal foi coletado sangue para avaliação da imunidade humoral.

**2.2 Avaliação da resposta imune humoral em hamsters:** A indução de anticorpos foi avaliada através de ELISA indireto utilizando a proteína rLigBrep como antígeno. Os soros pré-imune (dia 0), imune (dia 26) e pós-desafio (dia 56) foram avaliados quanto aos níveis de anticorpos IgM, IgG total e isotipos (IgG1, IgG2 e IgG3).

**2.3 Detecção de Leptospiras:** Para avaliar a presença de leptospiras nos tecidos foi realizado o *imprint* dos mesmos, conforme descrito por Chagas-Junior et al., (2009). As impressões foram obtidas, imediatamente após o óbito dos animais, através do contato dos órgãos (rim, fígado e pulmão) em lâminas de vidro, previamente preparadas com poli-L-lisina.

A presença de leptospiras nos rins também foi verificada através de reisolamento de leptospiras em meio EMJH. Brevemente, o rim foi removido assepticamente durante a necropsia e macerado em 4,5 ml de meio EMJH (DIFCO/BD). Os cultivos foram mantidos a 28°C por 12 semanas e observados semanalmente para verificar o crescimento bacteriano.

**2.4 Análise Estatística:** As análises de sobrevivência foram realizadas através do Teste Exato de Fisher e as análises da resposta imune humoral através do 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 leptospiras letais

A avaliação da sobrevivência e mortalidade foi verificada em três experimentos independentes. No experimento I, 100% dos animais vacinados com a proteína sobreviveram ao desafio, seguido de 80 e 90% de sobrevivência nos experimentos II e III (Tabela 1). Estes resultados indicam que a imunização com a proteína gerou imunidade protetora em 90% dos hamsters vacinados (média dos 3 experimentos).

No grupo controle, inoculado com PBS + *Alhydrogel*, nos experimentos I, II e III, vieram a óbito 80%, 100% e 70% dos animais (Tabela 1). Os óbitos ocorreram no intervalo entre os dias 12 – 18. Todos os animais imunizados com a bacterina (Experimentos I e II) sobreviveram ao desafio.

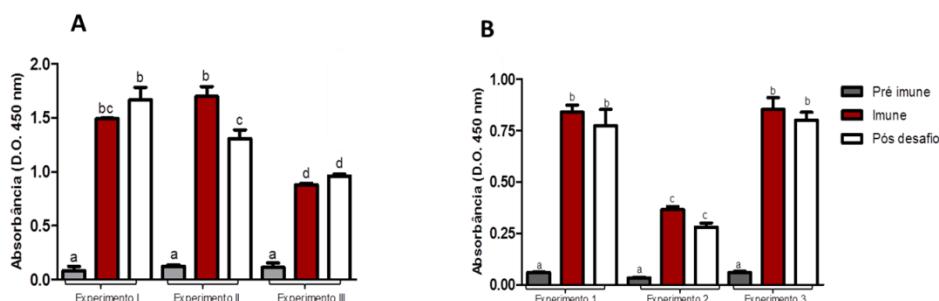
**Tabela 1.** Avaliação da sobrevivência de hamsters após o desafio com leptospiras letais.

Experimento	1ª / 2ª Dose de Imunização (µg)	LigBrep	Bacterina	Controle (PBS)	Valor de P (Teste Exato de Fisher)
		% Proteção (Nº sobrevidentes/total)			
1	40/20	100% (10/10)	100% (5/5)	2/10	0,0007
2	100/100	80% (8/10)	100% (5/5)	0/4	0,015
3	100/100	90 % (9/10)	/	3/10	0,0198

#### 3.2 Avaliação da Resposta Imune Humoral

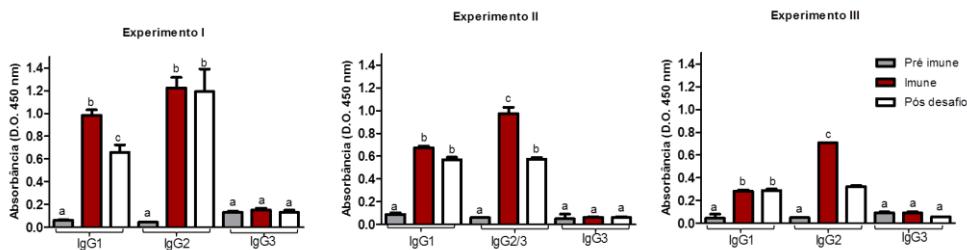
A vacina (rLigBrep + *Alhydrogel*) induziu níveis significantes de anticorpos IgM e IgG. As taxas de IgM foram semelhantes nos experimentos I e II, e inferior no experimento III. No experimento I e III, as taxas de IgM obtidas no soro imune (dia 26) mantiveram-se após o desafio (dia 56), enquanto que no experimento II houve o decréscimo desta imunoglobulina na segunda coleta (Figura 1A).

A avaliação dos anticorpos IgG total, indicou níveis significantes de anticorpos IgG nos três ensaios de proteção. Entretanto, as taxas deste anticorpo nos experimentos I e III foram superiores ao experimento II. Os soros imune e pós-desafio apresentaram quantidade similar de anticorpos (Figura 1B).



**Figura 1. Resposta imune humoral em hamsters imunizados com a proteína rLigBrep.** A) IgM; B) IgG. Avaliação dos soros em pool através de ELISA indireto. As colunas representam a média das triplicatas e as barras o desvio padrão. Letras distintas representam diferença estatística ( $P < 0,05$ ).

A vacinação com a proteína rLigBrep induziu uma resposta predominantemente misto de IgG1 e IgG2 (Figura 2). Estes isotipos caracterizam respostas Th2 e Th1, respectivamente, em humanos. O adjuvante hidróxido de alumínio possui a capacidade de induzir alta resposta Th2 (PETROVSKY e AGUILAR, 2004), sugerindo que a presença de anticorpos Ig1 seja consequência do adjuvante. A ausência de anticorpos do isotipo IgG2 nos animais imunizados com a bacterina corrobora com esta hipótese.



**Figura 2. Isotipagem dos anticorpos.** Avaliação dos anticorpos em pool através de ELISA indireto utilizando rLigBrep como antígeno. As colunas representam a média das triplicatas e as barras o desvio padrão. Letras distintas representam diferença estatística ( $P < 0,05$ ).

### 3.3 Detecção de leptospires

No *imprint*, (Tabela 2) os tecidos dos animais imunizados com a proteína ou com a bacterina não apresentaram leptospires em nenhum dos tecidos avaliados (Dados referentes ao experimento I). No grupo de animais controle, inoculados com PBS, foi observada a presença de leptospires em no mínimo um dos 3 tecidos avaliados.

**Tabela 2.** Presença de leptospires em tecidos de hamsters infectados.

Grupo	Óbito	Imprint		
		Rim	Fígado	Pulmão
Proteína	28	0/10	0/10	0/10
Bacterina	28	0/10	0/10	0/10
PBS	12, 13, 14, 15, 18, 28	5/10	4/10	4/10

Nos experimentos II e III a presença de leptospiras foi avaliada através de isolamento em meio líquido EMJH, a partir de macerado de rim. Todos os animais vacinados com a proteína apresentaram cultivos negativos (exceto os 3 animais que vieram a óbito). Assim, nos 3 ensaios independentes, além de imunidade protetora a vacina também induziu 100% de imunidade esterilizante (Tabela 3). Os hamsters imunizados com a bacterina também apresentaram imunidade esterilizante.

**Tabela 3.** Detecção de leptospiras através de reisolamento em cultivo

	Isolamento em cultura		
	Proteína	Bacterina	Controle PBS
Experimento	Número de positivos / total (% positivos)		
1	/	/	/
2	2/10 (20%)	0/5	4/4 (100%)
3	1/10 (10%)	0/4	7/10 (70%)

#### 4. CONCLUSÕES

A imunização de hamsters com a proteína recombinante LigBrep protegeu em média de 90% dos hamsters imunizados frente ao desafio com leptospiras virulentas. Além de desenvolver imunidade protetora, a vacina também induziu 100% de imunidade esterilizante nos sobreviventes. Logo, a proteína rLigBrep possui potencial para uso no desenvolvimento de uma vacina contra leptospirose.

#### 5. REFERÊNCIAS

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

CHAGAS-JUNIOR, A. D.; MCBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; FIGUEIRA, C. P.; MEDEIROS, M. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. e MCBRIDE, F. W. An imprint method for detecting leptospires in the hamster model of vaccine-mediated immunity for leptospirosis. **J Med Microbiol**, v.58, n. 12, p. 1632-1637. 2009.

CRODA, J.; RAMOS, J. G.; MATSUNAGA, J.; QUEIROZ, A.; HOMMA, A.; RILEY, L. 32 W.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G. e KO, A. I. Leptospira immunoglobulin-like proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis. **J Clin Microbiol**, v.45, n.5, p. 34 1528-34. 2007.

FAINE, S. B.; ADLER, B.; BOLIN, C. e PEROLAT, P. *Leptospira and leptospirosis*. Melbourne: MediSci. 1999.

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.

PETROVSKY, N. e AGUILAR, J. C. Vaccine adjuvants: current state and future trends. **Immunol Cell Biol**, v.82, p.488–96. 2004.

PICARDEAU, M.; BERTHERAT, E.; JANCLÖES, M.; SKOULLOUDIS, A. N.; DURSKI, 38 K.; HARTSKEERL, R. A.; Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: Current tools and 39 emerging technologies. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.78, n.1, p.1-8. 2014.