

AVALIAÇÃO DE VACINAS RECOMBINANTES CONTRA LEPTOSPIROSE CONTENDO OS ANTÍGENOS LigBrep E LigBni ASSOCIADOS A UM ADJUVANTE A BASE DE SAPONINA

**ÉVERTON BETTIN¹; CARLOS EDUARDO POUEY DA CUNHA²;AMILTON
SEIXAS NETO²; 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 - medeiros@bio.fiocruz.br

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

1. INTRODUÇÃO

A Leptospirose é uma enfermidade de caráter zoonótico causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. Estima-se a ocorrência de 873.000 casos de leptospirose por ano em todo o mundo, levando a aproximadamente 49.000 mortes (PICARDEAU et al., 2014). 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 apenas contra os sorovares que compõem a vacina (KOIZUMI, WATANABE, 2005).

Buscando sanar as deficiências apresentadas pelas bacterinas, vários antígenos recombinantes têm sido avaliados em vacinas contra essa zoonose, focando principalmente em fatores de virulência (DELLAGOSTIN et al., 2011). Já se demonstrou um interesse na utilização das proteínas Lig (Leptospiral immunoglobulin-like) em formulações vacinais, devido ao seu envolvimento com mecanismos patogênicos (FORSTER et al., 2013). Além disto, a proteína LigB é conservada em todas as espécies patogênicas do gênero (McBRIDE et al., 2009). Esta proteína apresenta uma porção idêntica (LigBrep) e outra não idêntica (LigBni) à proteína LigA (MATSUNAGA et al., 2003).

Porém, vacinas compostas por antígenos recombinantes purificados estão relacionadas com baixa imunogenicidade, necessitando 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). Os efeitos da utilização de saponinas como adjuvante são conhecidos por décadas, sendo estes, caracterizados por uma potencialização tanto na produção de anticorpos, como na resposta imune celular (BENGSSON, MOREIN, OSTERHAUS, 2011).

Neste cenário, este estudo buscou avaliar a resposta imunoprotetora induzida pelos antígenos recombinantes LigBrep e LigBni de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 associado a um adjuvante comercial a base de saponina contra desafio letal homólogo.

2. METODOLOGIA

2.1 Aspectos éticos

Este estudo obteve parecer favorável da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPel (permissão número 6843). O tratamento dos animais foi realizado com base nas diretrizes do Conselho de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), de acordo com a legislação vigente.

2.2 Formulações vacinais

A formulação das vacinas utilizadas neste trabalho foi realizada pelo Instituto Bio-manguinhos/Fiocruz – RJ e disponibilizadas ao nosso grupo de pesquisa para avaliação. Para as formulações, foram utilizados 30 µg por dose dos antígenos LigBrep e LigBni associados a um adjuvante comercial a base de saponina.

2.3 Imunização e Desafio de Modelo Animal

Dezoito hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos, com 6 semanas de idade foram alocados em 3 grupos para este experimento, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Distribuição dos animais no ensaio de imunoproteção.

	Tratamento	Número de animais
G1	Adjuvante (controle)	6
G2	LigBrep + Adjuvante	6
G3	LigBni + Adjuvante	6

Os animais foram imunizados por via intramuscular com duas doses vacinais nos dias 0 e 14. Coletas de sangue foram realizadas nos dias 0 e 28 do experimento. Para o desafio, 10^3 *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 foram inoculadas por via intraperitoneal 14 dias após a segunda dose. Após 28 dias do desafio, os sobreviventes foram eutanasiados, tendo o rim esquerdo macerado com a finalidade de reisolamento do patógeno.

2.4 Avaliação da resposta imune humoral

ELISA indireto foi realizado para avaliação da resposta imune humoral. As placas foram sensibilizadas com 100 ng da respectiva proteína por poço, diluídas em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M (pH 9,6). Soros individuais dos dias 0 e 28 foram utilizados na diluição de 1:100 em PBST em triplicata. Anticorpos anti-hamster conjugados com peroxidase foram utilizados como anticorpos secundários em uma diluição de 1:8000 em PBST. Para revelação utilizou-se o-fenilienodiamina 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. A etapa de sensibilização foi feita a 4 °C por 18 h e as demais a 37 °C por 1 h. Entre cada passo, foram realizadas 5 lavagens com PBST.

Posteriormente, foi realizada titulação individual dos soros reagentes. A titulação abrangeu diluições seriadas de base 2, de 1:200 até 1:102.400, mantendo-se a metodologia do ELISA já descrita na etapa anterior. O ponto de corte foi considerado como a média das absorbâncias do controle negativo (reação sem anticorpo primário) somada a dois desvios padrões.

2.5 Análise Estatística

Para a análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism 5. O teste exato de Fischer permitiu identificar uma diferença significativa quanto a sobrevivência dos animais pós desafio. Para análise dos resultados do ELISA e da titulação, foram realizados os testes One Way ANOVA seguido do teste de Tukey.

2.6 Avaliação da imunidade esterilizante

Para avaliação da imunidade esterilizante, os macerados renais dos animais eutanasiados foram repicados em meio EMJH (Difco) enriquecido com 10% de suplemento comercial (Difco). As culturas foram analisadas semanalmente quanto ao crescimento de leptospires em microscopia de campo escuro.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os animais do grupo controle (G1) vieram a óbito entre os dias 8 e 13 pós-desafio, enquanto o grupo inoculado com a proteína LigBrep (G2) apresentou apenas um óbito ($p<0,05$). No grupo três, vieram a óbito quatro animais, não se obtendo uma diferença significativa comparando-se ao grupo controle.

Os soros do dia 0 não reagiram quando testados em ELISA. Apenas os grupos imunizados com os抗ígenos apresentaram diferença estatística nas reações do dia 28 quando comparadas ao dia 0 ($p<0,001$). A titulação dos grupos positivos permitiu melhor visualização e comparação da resposta humoral entre eles, evitando uma saturação dos complexos抗ígeno-anticorpo. Foi possível observar um título de 51.200 para ambos os grupos, não se evidenciando diferença significativa (Figura 1). Todos os cultivos realizados a partir dos macerados renais dos animais sobreviventes apresentaram crescimento de leptospires após 14 dias.

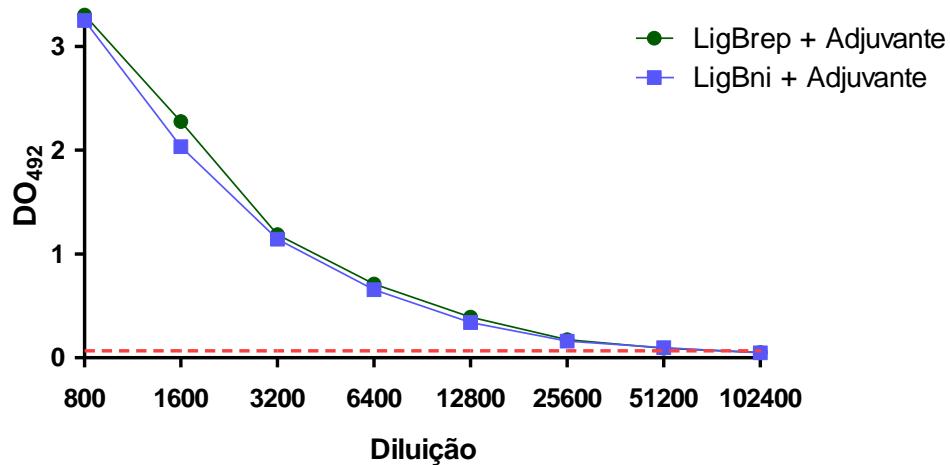


Figura 1. Titulação por ELISA dos soros reagentes. Ponto de corte representado pelo tracejado em vermelho.

4. CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu identificar a capacidade imunoprotetora do抗ígeno LigBrep quando associado a um adjuvante a base de saponina. Por outro lado, o抗ígeno LigBni, na formulação utilizada, é ineficaz em sua capacidade de proteção. Embora ambas as formulações promovam um alto título de anticorpos, este fato não garante os mesmos níveis de proteção entre elas. A ocorrência de óbitos em todos os grupos e a incapacidade das formulações em conferir uma imunidade esterilizante, demonstram a necessidade de serem avaliadas novas formulações. Novos抗ígenos e adjuvantes serão buscados e testados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENGTSSON, K.L.; MOREIN, B.; OSTERHAUS, A. ISCOM technology-based Matrix M™ adjuvante: success in future vaccines relies on formulation. **Expert Reviews of Vaccines**, London, v.10, n.4, p401-403, 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.
- FORSTER, K.M.; HARTWIG, D.D.; SEIXAS, F.K.; BACELO, K.L.; AMARAL, M.; HARTLEBEN, C.P.; 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. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v.20, n.5, p. 725-731, 2013.
- KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospirosis vaccines: Past, present, and future. **Symposium**, Tokio, v.51, n.3, p210-214, 2005.
- 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.; KO, A. I. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Molecular Microbiology**, Hoboken, v.49, n.4, p929-945, 2003.
- MCBRIDE, A. J. A.; CERQUEIRA, G. M.; SUCHARD, M.; MOREIRA, A.; ZUERNER, R.; REIS, M. HAAKE, D.; KO, A.; DELLAGOSTIN, O. A. Genetic diversity of the Leptospiral immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic *Leptospira* spp. **Infection, Genetic and Evolution**, Irvine, v.9, n.2, p196-205, 2009
- 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.
- PICARDEU, M.; BERTHERAT, E.; JANCLOES, M.; SKOLOUDIS, A.N.; DURSKI, K.; HARTSKEERL, R.A. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: Current tools and emerging technologies. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, Stanford, v.78, n.1, 2014.