

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO DE ANTICORPOS MONOCLONais FRENTE AO CRESCIMENTO DE *Leptospira interrogans* IN VITRO

**VIOLETTA DIAS PACCE¹; CHARLES KLAZER GOMES¹; NATASHA
RODRIGUES DE OLIVEIRA¹; SÉRGIO JORGE¹; ODIR ANTONIO
DELLAGOSTIN¹.**

¹ Laboratório de Vacinologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – violettapacce@gmail.com; charleskazer@hotmail.com; oliveira_natalha@hotmail.com; sergiojorgevet@hotmail.com; odirad@terra.com.br

1. INTRODUÇÃO

As espécies patogênicas do gênero *Leptospira* são os agentes etiológicos da leptospirose (NASCIMENTO, 2016). Roedores em geral são os principais hospedeiros, porém outros mamíferos podem carregar e transmitir a doença como hospedeiros secundários (VERMA; KHANNA; CHAWLA, 2013). As leptospires colonizam os túbulos renais de animais carreadores e são disseminadas pela urina (GRASSMANN et al., 2012). Humanos que entram em contato direto com animais infectados ou com ambiente contaminado, principalmente a água, estão em risco de desenvolver infecção (DELLAGOSTIN et al., 2011). Essa doença pode afetar tanto humanos como animais; portanto, apresenta grande importância para a saúde pública e para a produção de animais (MARTINS; LILENBAUM, 2013). Devido a esses fatores, medidas profiláticas são extremamente necessárias.

A vacinação é uma das medidas mais eficazes, porém as vacinas disponíveis atualmente são suspensões celulares mono ou polivalentes, inativadas por agentes químicos ou físicos (VERMA; KHANNA; CHAWLA, 2013). Essas vacinas produzem apenas imunidade de curta duração e apresentam reações adversas. Além disso, a proteção induzida é sorovar específica, com limitada ou nenhuma proteção cruzada diante dos mais de 260 sorovares de *Leptospira* registrados (GRASSMANN et al., 2012). A vacina ideal deveria induzir imunidade de longa duração, proteção cruzada e imunidade esterilizante (FORSTER et al., 2013). Tendo isso em vista, pesquisas no desenvolvimento de vacinas contra leptospirose estão atualmente focadas em um melhor entendimento da membrana externa da leptospira (LEVETT, 2015). Proteínas de superfície expostas na membrana externa (OMPs) são atrativos para uso vacinal, pois são relativamente bem conservadas e constituem alvos para interação com mediadores de resposta imune do hospedeiro (FORSTER et al., 2013).

A LipL32, uma lipoproteína localizada na membrana externa da bactéria (MURRAY, 2015), assim como as proteínas Lig, são bastante estudadas na vacinologia. A porção N-terminal da LigA e LigB são idênticas (LigBrep) e as outras regiões variáveis. Foi demonstrado em um estudo prévio que a LigBrep usada como vacina de DNA é um potencial candidato vacinal, induzindo proteção parcial contra desafio heterólogo (FORSTER et al., 2015). Anticorpos contra estas proteínas podem ter atividade inibitória do crescimento da bactéria, e eventualmente poderão vir a ser utilizados em tratamentos com imunização passiva.

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial inibitório de anticorpos monoclonais (mAbs) anti-LipL32 e anti-LigBrep, previamente

produzidos por nosso grupo, frente ao crescimento de *Leptospira interrogans* *in vitro*.

2. METODOLOGIA

2.1 Cultivo de Leptospiros. A cepa utilizada para realização do experimento foi a *Leptospira interrogans* cepa Fiocruz L1-130. Esta foi cultivada em meio de cultivo EMJH (Difco) enriquecido com 10% de suplemento comercial (Difco) e mantido em estufa à 28°C.

2.2 Purificação de anticorpos. Foram utilizados 3 diferentes anticorpos, mAb3 e 1D9 (anti-LipL32) e LigBrep (anti-LigBrep). O fluído ascítico obtido em camundongos foi coletado e filtrado em filtro 0,45µm (Millipore). Após filtragem, a ascite foi purificada por cromatografia líquida de afinidade utilizando coluna de proteína A (HiTrap™ GE Healthcare). Os anticorpos foram quantificados em espectrofotômetro utilizando absorbância ultravioleta em 280 nm. Posteriormente, foi realizada eletroforese em gel de SDS-PAGE 12%.

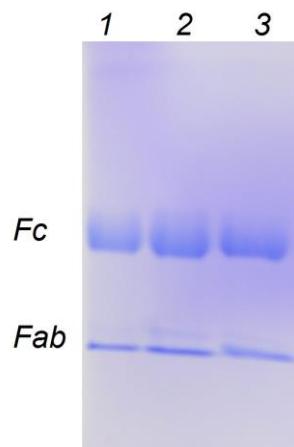


Figura 1. Eletroforese em gel SDS-PAGE 12% dos anticorpos monoclonais purificados. 1, mAb3; 2, 1D9; 3, LigBrep; Fc – cadeia pesada; Fab – cadeia leve.

2.3 Ensaio de inibição *in vitro*. Os anticorpos monoclonais foram diluídos em meio de cultivo EMJH em diluição seriada até 10^{-4} , partindo da concentração inicial de 500µg/ml para mAb3 e 1D9, e 250µg/ml para LigBrep. Juntamente aos anticorpos foi adicionada a *Leptospira interrogans* cepa Fiocruz L1-130 na concentração de 10^3 células. Para análise do crescimento bacteriano, foram feitas três contagens nos dias 0, 5 e 10, utilizando a câmara de Petroff-Hausser.

2.4 Análise estatística. Para medir a significância estatística foi utilizado o teste ANOVA e quando necessário, aplicado o teste de Turkey. Os valores foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a realização do teste de inibição, foi possível observar que na amostra não diluída (concentração mais alta de anticorpo) foi obtido uma significativa atividade inibitória dos 3 anticorpos monoclonais frente ao controle ($p < 0,05$).

Conforme a diluição foi aumentando, o crescimento bacteriano aumentou proporcionalmente, apresentando uma correlação direta entre essas duas variáveis (Fig. 2). O anticorpo monoclonal anti-LipL32 (mAb3) mostrou uma capacidade inibitória superior aos demais anticorpos, mesmo quando diluído em concentração de 250 μ g/ml (Fig. 3). Todos os demais anticorpos, quando diluídos, não demonstraram um significativo potencial inibitório ao final do experimento.

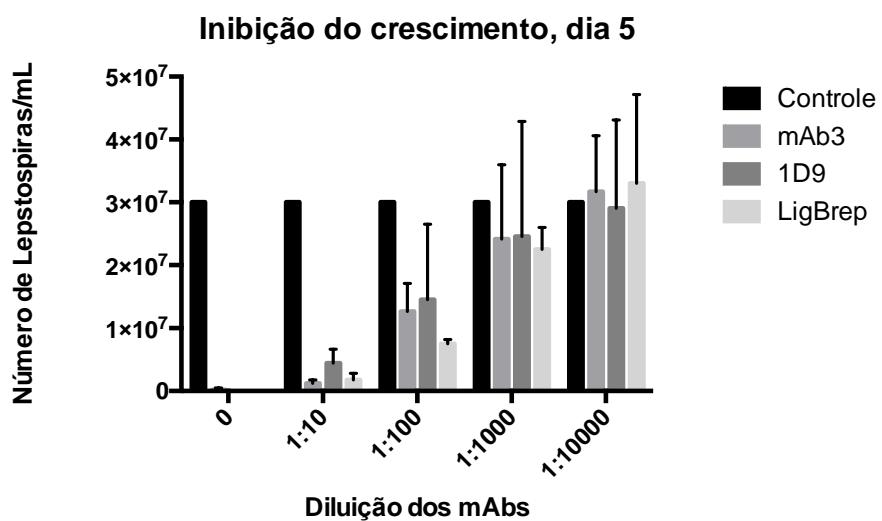


Figura 2. Inibição do crescimento de *Leptospira interrogans* *in vitro*, 5 dias após o início do teste.

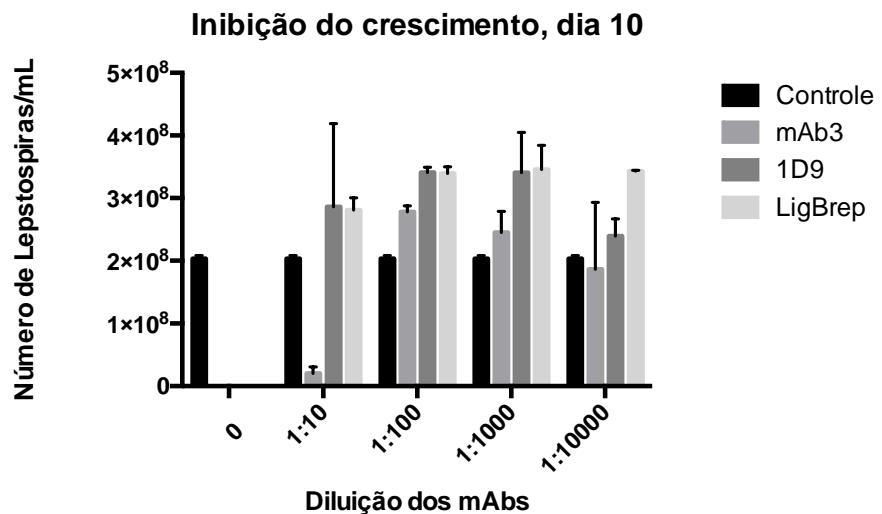


Figura 3. Inibição do crescimento de *Leptospira interrogans* *in vitro*, 10 dias após o início do teste.

4. CONCLUSÕES

O ensaio de inibição *in vitro* revelou que os anticorpos monoclonais conseguem inibir o crescimento das bactérias quando adicionados sem diluição, ou em diluição 1:10. Além disso, o anticorpo mAb3 consegue inibir o crescimento de forma mais efetiva e por mais tempo que os demais anticorpos, quando utilizado em concentração de 250 μ g/ml.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DELLAGOSTIN, O. A. et al. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Human vaccines**, v. 7, n. 11, p. 1215–24, 2011.

FORSTER, K. M. et al. 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**, v. 20, n. 5, p. 725–731, 2013.

FORSTER, K. M. et al. DNA prime-protein boost based vaccination with a conserved region of leptospiral immunoglobulin-like A and B proteins enhances protection against leptospirosis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 8, p. 989–995, 2015.

GRASSMANN, A. A. et al. Protection against lethal leptospirosis after vaccination with LipL32 coupled or coadministered with the b subunit of escherichia coli heat-labile enterotoxin. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 5, p. 740–745, 2012.

LEVETT, D. A. H. AND P. N. Leptospirosis in Humans. In: ADLER, B. (Ed.). . **Leptospira and Leptospirosis**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2015. v. 387p. 65–97.

MARTINS, G.; LILENBAUM, W. The panorama of animal leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil, regarding the seroepidemiology of the infection in tropical regions. **BMC veterinary research**, v. 9, p. 237, 2013.

MURRAY, G. L. The Molecular Basis of Leptospiral Pathogenesis. In: ADLER, B. (Ed.). . **Leptospira and Leptospirosis**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2015. p. 139–185.

NASCIMENTO, A. L. Original Article “Mammalian cell entry (Mce) protein of *Leptospira interrogans* binds extracellular matrix components, plasminogen and β 2 integrin”. **Microbiology and Immunology**, p. 1–40, 2016.

VERMA, R.; KHANNA, P.; CHAWLA, S. Whole-cell inactivated Leptospirosis vaccine: Future prospects. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 9, n. 4, p. 763–765, 2013.