

## ISOTIPAGEM DE ANTICORPOS SECRETADOS DURANTE A VACINAÇÃO E DESAFIO DE HAMSTERS COM *Leptospira interrogans* SOROVAR Copenhageni

**PEREIRA, Wallace Moraes<sup>1,3</sup>; GRASSMANN, André Alex<sup>2</sup>; DOMINGUES, Micaela<sup>1,3</sup>; XAVIER, Rafaela Gomes<sup>1,3</sup>; MCBRIDE, Alan John Alexander<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas/Curso de graduação em Biotecnologia; <sup>2</sup>Laboratório de Vacinologia; <sup>3</sup>Laboratório de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.  
wallpereira@gmail.com

### 1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença de grande importância para a saúde pública devido a sua incidência e letalidade. A doença é causada por espiroquetas pertencentes ao gênero *Leptospira*, no qual fazem parte treze espécies patogênicas e seis saprofíticas. A infecção ocorre através do contato direto com a bactéria através da urina de algum animal carreador ou através da água contaminada com esta urina. Quase qualquer mamífero pode ser um carreador de leptospirose, porém ratos se destacam como seus maiores carreadores, atingindo níveis de  $10^7$  bactérias por mL de urina, além de serem considerados hospedeiros intermediários (assintomáticos) (LEVETT, 2001; ADLER E DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Nos hospedeiros definitivos, os sintomas variam de acordo com a virulência da bactéria, podendo ser de uma sintomatologia branda, muitas vezes confundida com gripe (Síndrome de Weil), até casos de falha aguda renal e hepática e em algumas ocasiões hemorragia pulmonar, levando o paciente à morte na maioria dos casos (EVANGELISTA e COBURN, 2010).

Sua ocorrência é maior principalmente nos países em desenvolvimento, onde as condições de saneamento inadequadas associadas a uma aglomeração populacional são fatores determinantes para sua propagação (MCBRIDE et al., 2005; REIS et al, 2008; ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). No ano de 2007 foi identificado no Brasil mais de 14.001 casos, sendo 3.292 confirmados e dentre estes 351 óbitos, representando uma letalidade de 10,7% (SVS, 2009). A vacinação é descrita como a medida profilática mais promissora na contenção desta doença, porém em humanos só é utilizada em poucos países nos períodos de surto. A vacina é comercializada para algumas espécies de mamíferos, como cães, bovinos e suínos, onde a proteção é apenas parcial, ou seja, protege apenas contra os sorovares presentes em sua formulação. Além do mais, se faz necessário revacinações anuais e sua proteção não é esterilizante (LEVETT, 2001; ADLER E DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

O tipo de resposta imune envolvido na proteção contra a leptospirose induzida por vacinas ainda não é completamente elucidado. Apesar da utilização, o padrão de resposta celular e humoral não é satisfatoriamente descrito na literatura e acredita-se que a elucidação do tipo de resposta imune induzido pela vacinação pode ser um fator contribuinte para o desenvolvimento de uma vacina racional contra leptospirose, bem como na escolha de um adjuvante que venha a contribuir para a modulação desta resposta (FAISAL et al., 2009; ZUERNER et al., 2011).

Tendo em vista esta problemática, o objetivo do presente trabalho foi analisar a resposta imune humoral através da isotipagem de anticorpos secretados

durante a vacinação com bacterina e o conseqüente desafio com *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni utilizando o modelo experimental hamster (*Mesocricetus auratus*).

## 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

### 2.1 Cepas, cultivo e preparação da bacterina

A cepa virulenta utilizada neste estudo foi a *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130. Seu crescimento foi feito em meio EMJH (Difco) enriquecido com 10% de suplemento comercial e mantido a 29°C. Foram realizados repiques semanais da cultura, acompanhado de contagem celular bacteriana em câmara de Petroff-Hausser. Para a preparação das bacterinas, alíquotas de leptospiros com 10<sup>8</sup> células/mL foram inativadas por incubação a 56 °C por 30 minutos e utilizadas para ressuspensão em 300 µL de PBS estéril.

### 2.2 Animais e coletas de amostras

Hamsters fêmeas (*Mesocricetus auratus*) de 4 a 6 semanas de idade foram utilizados como modelo animal para os experimentos de desafio e avaliação da resposta imune. As vacinas foram administradas em duas doses, com volume total de 300 µL cada, no músculo quadríceps nos dias 0 e 14. Amostras de sangue de cerca de 300 µL foram coletadas através de punção do plexo venoso retro-ocular, onde o soro foi processado e congelado a -20 °C até sua utilização.

### 2.3 Imunização e desafio

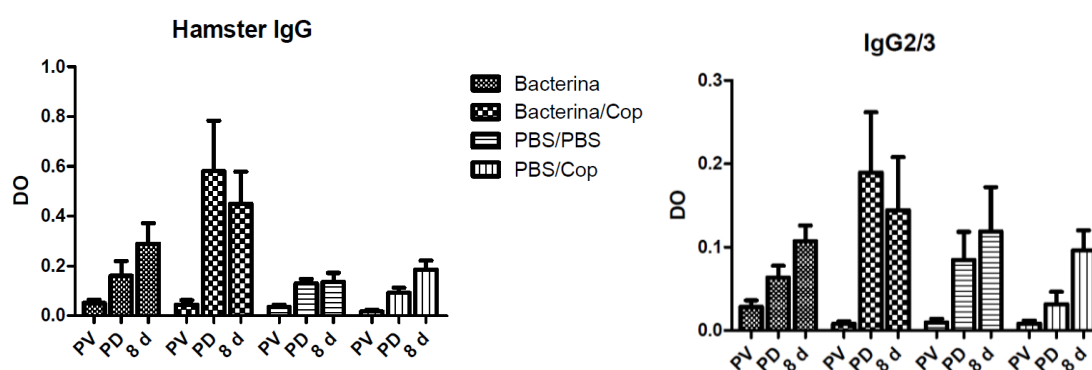
Quarenta hamsters foram distribuídos em quatro grupos de igual número, recebendo os seguintes tratamentos: 1- bacterina, sem desafio; 2- bacterina, seguido de desafio letal; 3- PBS, sem desafio; 4- PBS, seguido de desafio letal. Duas doses de bacterina (10<sup>8</sup> leptospiros) ou PBS foram utilizadas para imunizar os hamsters, nos dias 0 e 14. Após 14 dias da última imunização os grupos 2 e 4 foram inoculados com dose letal de leptospiros de baixa passagem em desafio homólogo. Os animais foram acompanhados diariamente para observação dos sinais da leptospirose e ocorrência de morte. Os animais sobreviventes foram eutanasiados 21 dias após o desafio.

### 2.4 Determinação da resposta humoral

Placas de poliestireno foram sensibilizadas com 100 ng/poço de rLipL32 + rLigBrep em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 *overnight* a 4 °C, lavadas com PBS-Tween 20 0,05 % (PBS-T) e bloqueadas com 5% de leite em pó desnatado. Os soros foram diluídos 1:100 em PBS-T e incubados por 1 h a 37 °C. Após, foi adicionado anticorpo secundário anti-IgG (diluição 1:6000 em PBS-T), anti-IgG1 (diluição 1:6000 em PBS-T), anti-IgG2/3 (diluição 1:6000 em PBS-T), anti-IgG3 (diluição 1:3000 em PBS-T), anti-IgM (diluição 1:3000 em PBS-T), todos conjugado à peroxidase e seguido de incubação a 37 °C por mais 1 h. As reações foram reveladas com o substrato *o-phenylenediamine dihydrochloride* (OPD) acrescido de peróxido de hidrogênio, por 15 min. no escuro. A leitura da densidade óptica foi feita em espectrofotômetro com filtro ajustado para 450 nm.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ELISAs com anticorpos anti-IgG e anti-IgG2/3 foram os únicos que apresentaram resposta positiva (Fig. 1). Os ELISA visando a detecção de anticorpos anti-IgM, anti-IgG1 e anti-IgG3 não demonstraram resultados positivos para nenhum dos soros, independente do tratamento na qual o animal foi submetido ou o instante da coleta. Uma vez que não houve detecção do anticorpo isotipo IgG3, toda absorbância gerada pelo anticorpo anti-IgG2/3 foi interpretada como reconhecida pelo isotipo IgG2. É válido destacar que todos os animais apresentaram baixa resposta frente aos anticorpos anti-IgG e anti-IgG2/3 no instante pré-vacina, com níveis de absorbância inferior a 0,05.



**Figura 1.** Isotipagem da resposta imune humoral induzida pela bacterina de *L. interrogans* sorovar Copenhageni

O tipo de resposta imune tanto humoral quanto celular contra leptospirose ainda não é completamente elucidado. Quando relacionado a resposta em vacinas desafios, diversos estudos já relataram a resposta imune gerada, porém para os antígenos em questão (FAISAL et al., 2009a, FAISAL et al., 2009b, FAISAL et al., 2009c) e os resultados encontrados não foram completamente elucidativos. Quando relacionado a bacterinas, que correspondem às únicas vacinas atuais no mercado, a resposta imune induzida também é pouco conhecida (ZUERNER et al., 2011).

Apesar da falta de conhecimento acerca dos mecanismos específicos de resposta imune, diversos grupos de pesquisa corroboram que a resposta imune predominante é humoral (KO et al., 2009). Similar a outras bactérias gram-negativas, os anticorpos produzidos durante a infecção foram demonstrados como do tipo aglutinante, onde IgM e IgG foram os mais encontrados em pacientes recuperados de leptospirose em até seis anos após o primeiro contato com a bactéria (LEVETT et al., 2001). O resultado do presente trabalho não obteve sucesso em identificar anticorpos IgM e isso pode ter ocorrido devido aos diferentes tempos de permanência deste anticorpo na corrente sanguínea entre humanos e hamsters.

#### 4 CONCLUSÃO

Estes resultados indicam que a predominância do isotipo IgG2 na resposta imune humoral está relacionada com a proteção contra leptospirose através de aglutinação. Estes resultados ainda necessitam de confirmação e estudos mais aprofundados para que possa de certa forma, contribuir para a compreensão da resposta imune humoral gerada pela vacinação com bacterinas em modelo experimental.

## 5 REFERÊNCIAS

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

EVANGELISTA, K. e KOBURN, J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses, **Future Microbiology**, n. 5, p. 1413-1425, 2010.

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

FAISAL, S.M.; YAN, W., MCDONOUGH, S. P.; CHANG, C. F., PAN, M. J., CHANG, Y. F. Leptosome-entrapped leptospiral antigens conferred significant higher levels of protection than those entrapped with PC-liposomes in a hamster model, **Vaccine**, n. 27, p. 6537-6545, 2009a.

FAISAL, S.M.; YAN, W., MCDONOUGH, S. P.; CHANG, Y. F. *Leptospira* immunoglobulin-like protein A variable region (LigAvar) incorporated in liposomes and PLGA microspheres produces a robust immune response correlating to protective immunity, **Vaccine**, n. 27, p. 378-387, 2009b.

FAISAL, S. M., YAN, W., MCDONOUGH, S. P., MOHAMMED, H. O., DIVERS, T. J., CHANG, Y. F. Immune response and prophylactic efficacy of smegmosomes in a hamster model of leptospirosis, **Vaccine**, n. 27, p. 6129-6136, 2009c.

KO, A.I., GOARANT, C., PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen, **Nature Reviews in Microbiology**, n. 7, p. 736-747, 2009.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n.2, p. 296-326. 2001.

MCBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G. e KO, A. I. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.18, n. 5, p. 376-86. 2005.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, Situação epidemiológica das zoonoses de interesse à saúde pública, **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, n. 1, p. 2-17, 2009.

ZUERNER, R. L., ALT, D. P., PALMER, M. V., THACKER, T. C., OLSEN, S. C. A *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo vaccine induces a Th1 response, activates NK cells, and reduces renal colonization. **Clinical Vaccine Immunology**, n. 18(4), p. 684-691, 2011.