

## PRODUÇÃO DE SORO HIPERIMUNE EM *Rattus norvegicus* COMO INSUMO PARA CARACTERIZAÇÃO DE VACINAS RECOMBINANTES CONTRA LEPTOSPIROSE

JADY DUARTE NOGUEIRA<sup>1</sup>; VITÓRIA ADRIELLY CATSCHOR DOS SANTOS<sup>2</sup>;  
MARA ANDRADE COLARES MAIA<sup>3</sup>; DOMITILA BRZOSKOWSKI CHAGAS<sup>4</sup>;  
LAURA DE VARGAS MAIOCCHI<sup>5</sup>; ODIR ANTÔNIO DELLAGOSTIN<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas  
– [jadyduartenogueira2@hotmail.com](mailto:jadyduartenogueira2@hotmail.com)

<sup>2</sup>Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas  
– [vitoriacatschor@gmail.com](mailto:vitoriacatschor@gmail.com)

<sup>3</sup>Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas  
– [chagas.domitila@gmail.com](mailto:chagas.domitila@gmail.com)

<sup>4</sup>Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas  
– [maracamaia@hotmail.com](mailto:maracamaia@hotmail.com)

<sup>5</sup>Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas  
– [lauradevargasmaiocchi@gmail.com](mailto:lauradevargasmaiocchi@gmail.com)

<sup>6</sup>Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas  
– [odirad@ufpel.edu.br](mailto:odirad@ufpel.edu.br)

### 1. INTRODUÇÃO

A leptospirose, causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, é considerada uma doença negligenciada que afeta humanos e animais (HAAKE; LEVETT, 2015). A transmissão para humanos ocorre pela exposição direta à urina de animais infectados ou indireta via água ou solo contaminados (ADLER; MOC-TEZUMA, 2010). Regiões de clima tropical, épocas de enchentes e locais com instalações sanitárias precárias tendem a aumentar os índices de ocorrência da doença. No período entre 2010 e 2020, foram confirmados 39.270 casos de leptospirose no Brasil, o que consiste em uma média anual de 3.734 casos. Nesse mesmo período, foram registrados 3.419 óbitos, com média de 321 óbitos por ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). A vacinação permanece como a medida de controle mais eficaz contra a leptospirose.

A fim de superar as limitações das vacinas inativadas (bacterinas) comercialmente disponíveis, para uso animal, diversos estudos têm relatado a avaliação de proteínas quiméricas no desenvolvimento de vacinas recombinantes contra leptospirose, buscando alcançar uma proteção de amplo espectro contra a doença (DA CUNHA et al., 2019; BETTIN et al., 2022). O antígeno quimérico denominado rQ1, previamente construído pelo nosso grupo, consiste na fusão das proteínas recombinantes LipL32, LemA e LigAni, que estão presentes na membrana externa de leptospiros patogênicas. Este antígeno, já avaliado como vacina de subunidade e vacina vetorizada por *Mycobacterium bovis* BCG, demonstrou potencial na proteção contra leptospirose em modelo animal de hamster (OLIVEIRA et al., 2019).

No entanto, outros trabalhos ainda precisam ser realizados para avaliar a capacidade imunoprotetora dessas formulações frente a desafio heterólogo, bem como para desenvolver protótipos vacinais de menor custo de produção. Para isso, se faz necessária a produção de insumos, como anticorpos, que permitam confirmar a produção do antígeno recombinante nos sistemas de expressão heteróloga utilizados. Diante disso, esse trabalho teve como objetivo a produção e caracterização de um soro hiperimune capaz de reconhecer o antígeno quimérico rQ1, a fim de permitir a

caracterização de protótipos vacinais desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa contra leptospirose animal.

## 2. METODOLOGIA

**2.1 Produção do imunógeno:** A proteína rQ1 foi produzida conforme metodologia descrita anteriormente (BETTIN et al., 2022). A formulação vacinal foi desenvolvida contendo 100 µg da proteína recombinante, diluída em um volume ajustado para 150 µL de PBS 1X, e emulsificada com o mesmo volume de adjuvante de Freund incompleto (InvivoGen), totalizando assim um volume final de 300 µL por dose.

**2.2 Inoculação dos animais:** Ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, de aproximadamente 6-8 semanas receberam doses de 300 µL da formulação preparada por injeção via intraperitoneal com intervalo de três semanas entre a primeira e a segunda imunização e duas semanas entre a segunda e a terceira dose de reforço. Os animais foram eutanasiados por aprofundamento de anestesia inalatória, seguido de punção cardíaca para exsanguinação total. O sangue foi centrifugado a 7000 rpm, 10 min, 4 °C para a obtenção dos soros, que foram posteriormente aliquotados e armazenados à -20 °C. Todos os procedimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel (CEEA 12207-2020).

**2.3 Titulação do soro através de Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA):** Uma placa de poliestireno foi sensibilizada, conforme descrito previamente por CONRAD et al., 2017, com 200 ng da proteína recombinante diluída em tampão carbonato bicarbonato e deixada *overnight* à 4 °C. Após a sensibilização, foi realizado um bloqueio com 5% de leite em pó diluído em PBS-T (tampão fosfato-salino + 0,05% de Tween 20) por 2 h à 37 °C. Em seguida, os soros foram submetidos a uma diluição seriada de 1:50 a 1:102.400 em PBS 1x ao longo da placa. Posteriormente, a placa foi incubada com anticorpo anti-IgG de rato conjugado com peroxidase na diluição 1:5000 por 1 h à 37 °C. Foram realizadas 5 lavagens de 5 min com PBS-T após cada etapa. A reação foi revelada através da adição de uma solução composta de 10 ml de tampão citrato-fosfato (pH 4,0), 4 mg de OPD (*o-Phenylenediamine*) e 10 µL de água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30 volumes, seguido de incubação em temperatura ambiente por 15 min na ausência de luz. A reação foi parada pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico 3% (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). As absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro de placa utilizando um comprimento de onda de 492 nm. A análise estatística foi feita através do software *GraphPad Prism* versão 8.

**2.4 Caracterização do soro através de Western blot:** Diferentes concentrações da proteína rQ1 (1,5-100 ng) foram submetidas a eletroforese em gel de poliácridamida SDS-PAGE 12% seguido de eletrotransferência para uma membrana de nitrocelulose. O bloqueio das reações inespecíficas foi realizado a partir da incubação da membrana em leite em pó 5% por 16-18 h à 4 °C, sob agitação. Após 3 lavagens com PBS-T, o soro hiperimune produzido diluído 1:200 foi adicionado para incubação em temperatura ambiente por 1 h. Por fim, o anticorpo secundário anti-IgG de rato conjugado com peroxidase na diluição de 1:5000 foi adicionado e a reação foi revelada pela adição de solução contendo Tris 50 mM, peróxido de hidrogênio 30 volumes e diaminobenzidina (DAB).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A obtenção de anticorpos policlonais (pAbs) produzidos em ratos foi eficaz. No ELISA, o soro hiperimune obtido reconheceu o antígeno recombinante de maneira eficiente até a diluição de 1:819.200 demonstrando uma alta afinidade ao antígeno (Figura 1). No *Western blot*, o pAb anti-rQ1 foi capaz de reconhecer a proteína na sua forma recombinante com o peso molecular esperado de 70 kDa, até a quantidade de 50 ng de proteína (Figura 2), demonstrando sua utilidade para caracterizar a expressão desse antígeno em protótipos vacinais contra leptospirose.

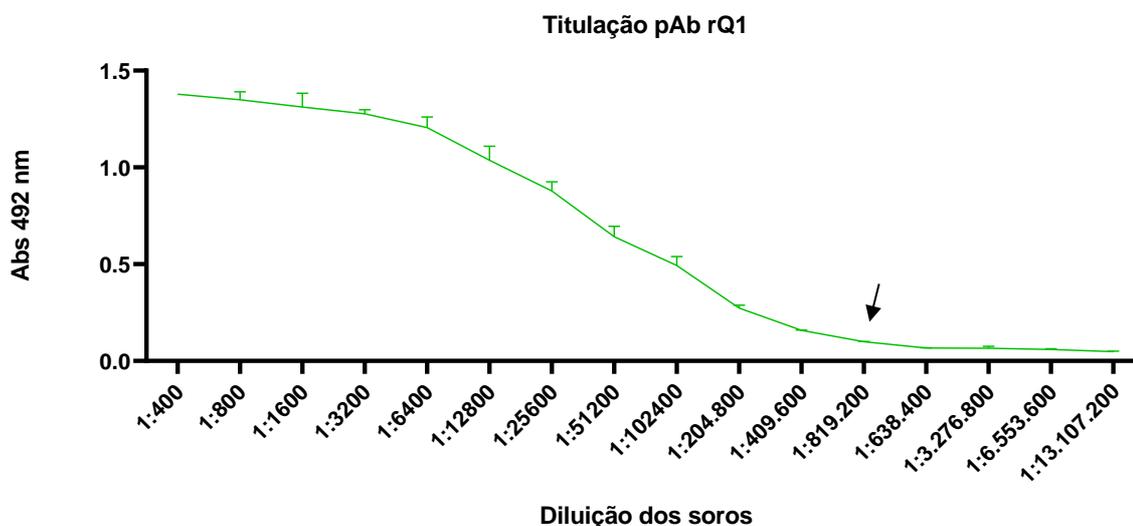


Figura 1: Titulação do soro hiperimune anti-rQ1 por ELISA indireto. O soro hiperimune reconhece o antígeno recombinante até a diluição de 1:819.200.

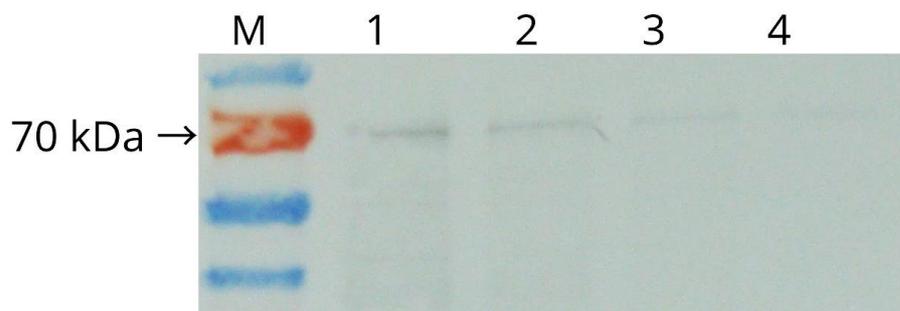


Figura 2: Caracterização do soro hiperimune contra a proteína rQ1 através de *Western blot*; M, marcador de peso molecular; 1: 100 ng de rQ1; 2: 50 ng de rQ1; 3: 25 ng de rQ1; 4: 12,5 ng de rQ1.

### 4. CONCLUSÕES

A proteína rQ1 é capaz de induzir a produção de anticorpos específico em ratos Wistar, demonstrando sua imunogenicidade. O soro hiperimune produzido

demonstrou ter capacidade de reconhecer a proteína recombinante com alta afinidade, podendo assim ser utilizado como insumo para confirmar a produção do antígeno rQ1 em etapas de desenvolvimento e caracterização de novos protótipos vacinais.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. *Leptospira and leptospirosis*. **Veterinary microbiology**, v. 140, p. 287–296, 2010.

BETTIN, E.B. et al. *TonB-dependent receptor epitopes expressed in M. bovis BCG induced significant protection in the hamster model of leptospirosis*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 106, n. 1, p. 173-184, 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Leptospirose. Brasília, 2021.

CONRAD, N. L. et al. *LigB subunit vaccine confers sterile immunity against challenge in the hamster model of leptospirosis*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 3, p. 1–20, 2017.

DA CUNHA, C.E. et al. Evaluation of different strategies to promote a protective immune response against *leptospirosis* using a recombinant *LigA* and *LigB* chimeric. **Vaccine**, v. 37, n. 13, p. 1844-1852, 2019.

DINSDALE, D. et al. The ultrastructural immunolocalization of *γ-glutamyltranspeptidase* in rat lung: Correlation with the histochemical demonstration of enzyme activity. **The Histochemical journal**, v. 24, n. 3, p. 144-152, 1992.

HAAKE, A.; LEVETT, P. *Leptospirosis in humans*. **Leptospira and leptospirosis**, p. 65-97, 2015.

OLIVEIRA, T.L. et al. Recombinant BCG strains expressing chimeric proteins derived from *Leptospira* protect hamsters against *leptospirosis*. **Vaccine**, v. 37, n. 6, p. 776-782, 2019.