

2.11.04 - Imunologia / Imunologia Aplicada.

PROTEÍNA HIPOTÉTICA CONSERVADA DE *Leishmania* TESTADA COMO VACINA CONTRA A LEISHMANIOSE VISCERAL

Amanda L. A. Pereira¹, Daniela P. Lage², Grasielle S.V. Tavares², Amanda S. Machado², Vívian T. Martins², Eduardo A. F. Coelho^{2,3}

1. Estudante do Colégio Técnico da Universidade Federal de Minas Gerais (COLTEC-UFMG)
2. Pesquisadora da Faculdade de Medicina da UFMG - Departamento de Infectologia e Medicina Tropical
3. Professor do COLTEC-UFMG

Resumo

No Brasil, a leishmaniose visceral (LV) é causada pela espécie *Leishmania infantum*. O diagnóstico da doença apresenta problemas de sensibilidade, enquanto o tratamento é tóxico e/ou oneroso. Nesse sentido, a vacinação é considerada uma medida efetiva e de baixo custo para o controle da LV. Dessa forma, no presente trabalho, uma proteína hipotética de *L. infantum* (LiHyD) foi avaliada na forma recombinante como vacina contra a LV em camundongos BALB/c. A proteína foi administrada em associação à saponina como adjuvante. Antes da infecção desafio, observou-se que os camundongos vacinados apresentaram níveis elevados de IFN-gama, IL-12 e GM-CSF, quando comparados aos grupos salina e saponina. Após a infecção, reduções significativas da carga parasitária foram encontradas no grupo rLiHyD/saponina quando comparado aos controles. Uma resposta do tipo Th1 foi também achada nesses animais. Conclui-se assim que a composição rLiHyD/saponina poderia ser considerada para a proteção contra a LV.

Autorização legal: O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG) sobre o protocolo 333/2015.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*; profilaxia; proteínas recombinantes.

Apoio financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Trabalho selecionado para a JNIC: PRPq/UFMG

Introdução

As leishmanioses são doenças que ocorrem em 98 países onde 380 milhões de pessoas vivem em áreas de risco. Elas se dividem em três formas, conforme as diferentes manifestações clínicas, sendo elas: visceral, cutânea e mucosa. No Brasil, a Leishmaniose Visceral (LV) é causada pelo parasito *Leishmania infantum*. O tratamento da doença se baseia no uso de antimoniais pentavalentes, porém, o aumento da resistência do parasita, os efeitos colaterais e/ou custo elevado das drogas têm sido obstáculos relevantes. Dessa forma, torna-se evidente o fato de que as terapias medicamentosas causam problemas aos pacientes. No que tange às medidas profiláticas, a vacina disponível no mercado e aprovada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil é a Leish-Tec. Contudo, essa vacina apresenta eficácia controversa. Diante disso, o desenvolvimento de novas vacinas é uma prioridade para o combate da doença, por se tratar de uma medida preventiva contra a doença e de menor custo. Com isso, o presente trabalho dedicou-se à obtenção de um novo antígeno vacinal, com o objetivo de encontrar uma medida profilática de baixo custo e de fácil execução, como forma de garantir que todos os indivíduos tenham acesso a elas, independentemente das condições socioeconômicas do país afetado.

Metodologia

O trabalho identificou e selecionou uma proteína hipotética específica de *L. infantum* (chamada LiHyD) para o uso como antígeno vacinal, devido à sua reatividade com soros de cães com a LV ativa e por ser conservada entre diferentes espécies de *Leishmania*, mas não está presente em outros Tripanossomatídeos ou em espécies de mamíferos. A proteína recombinante foi obtida após a clonagem do fragmento de DNA de *L. infantum*, o qual contém a região que a codifica. O DNA genômico foi extraído e amplificado utilizando a técnica de PCR. Os produtos foram clonados em vetor pGEM-T e depois transferidos para um vetor de expressão pET21a. O plasmídeo recombinante foi transferido para a bactéria *Escherichia coli* BL21. Após a expressão, as células foram lisadas e a proteína recombinante foi purificada usando kit específico.

Com vistas a avaliar a eficácia protetora da proteína recombinante a partir da detecção do perfil da resposta imune gerada, grupos de camundongos BALB/c fêmeas (n=8 por grupo) foram imunizados com a proteína rLiHyD mais saponina, somente com o adjuvante ou com solução salina (PBS), por meio da administração de três doses com intervalos de duas semanas. Após 4 semanas da última imunização, os camundongos (n=4 por grupo) foram sacrificados para análise da resposta imune. No mesmo período, os

demais animais foram infectados por via subcutânea na pata direita com 10^7 promastigotas estacionárias de *L. infantum* (MOM/BR/1970/BH46). Os parasitas foram cultivados a 24°C em meio Schneider (Sigma, St. Louis, MO, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Sigma), 20 mM de L-glutamina, 200 U/mL de penicilina, e 100 µg/mL de estreptomicina pH 7,4. O extrato solúvel de *Leishmania* (SLA) foi preparado a partir de 10^{10} promastigotas na fase estacionária de crescimento. Após 10 semanas da infecção, os camundongos vacinados e infectados foram eutanasiados, quando o baço, fígado, medula óssea e linfonodos drenantes foram coletados para avaliação da carga parasitária.

Com o objetivo de avaliar a resposta celular, células do baço dos camundongos foram mantidas *in vitro* com meio de cultura (controle) ou estimuladas com o extrato proteico solúvel dos parasitas por 48 h, quando os sobrenadantes foram coletados e as citocinas IFN-gama, IL-4, IL-10, IL-12 e GM-CSF foram quantificadas. Com o intuito de avaliar a carga parasitária, foi adotado o protocolo de diluição limitante (Vieira et al., 1996). Já a medição de nitrito ocorreu também no sobrenadante dos esplenócitos. Amostras de soros dos animais foram também coletadas e os níveis dos anticorpos IgG1 e IgG2a anti-parasita foram também avaliados por ELISA.

Resultados e Discussão

A imunogenicidade da proteína rLiHyD foi avaliada em camundongos BALB/c, 4 semanas após a última dose da vacina. Após estimulação *in vitro* com o extrato proteico solúvel dos parasitas, células do baço de camundongos vacinados produziram níveis elevados de IFN-gama, IL-12 e GM-CSF em comparação aos controles (grupo salina e saponina). Nenhum aumento na produção de IL-4 e IL-10 foram observados em qualquer grupo após a estimulação com o extrato. Tais achados sugerem a presença de uma resposta tipo Th1 protetora nos animais imunizados. Já em relação à resposta imune humoral, os camundongos vacinados com a proteína rLiHyD mais saponina apresentaram níveis mais elevados de anticorpos do isotipo IgG2a, quando comparado aos grupos controle. Esse achado correlacionou-se com a resposta do tipo Th1 identificada na análise de citocinas.

Ademais, os camundongos imunizados apresentaram carga parasitária significativamente menor nos diferentes órgãos examinados (baço, fígado, linfonodos drenantes e medula óssea) do que os camundongos inoculados com o adjuvante sozinho ou com o diluente da vacina. Adicionalmente, outro importante achado diz respeito à presença de maiores níveis de nitrito nas células do baço de camundongos infectados e imunizados na presença de extrato proteico de *Leishmania*. Essa detecção está associada ao fato de que o IFN- γ é capaz de ativar a síntese de óxido nítrico pelos macrófagos, o qual possui ação citotóxica em relação às formas amastigotas intracelulares do parasito.

Sendo assim, a proteína rLiHyD foi capaz de desencadear um mecanismo de combate ao parasita *Leishmania*, o que justifica a redução da carga parasitária, isto é, os camundongos que foram imunizados desenvolveram não apenas uma resposta imunológica do tipo Th1, mas também uma memória desta e, no momento em que foram expostos à infecção, foram capazes de desenvolver uma resposta imune secundária, cuja velocidade e intensidade foi comprovadamente maior.

Conclusão

É possível concluir que a proteína recombinante LiHyD foi eficaz em conferir proteção em camundongos BALB/c contra a infecção por *L. infantum*, por meio do desenvolvimento de uma resposta celular e humoral do tipo Th1 e redução significativa na carga parasitária em diferentes órgãos avaliados. Sendo assim, a proteína se apresenta como uma candidata para o desenvolvimento de uma vacina contra a LV.

Referências bibliográficas

COELHO EA, TAVARES CAP, CARVALHO FAA, CHAVES KF, TEIXEIRA KN, et al. (2003) Immune responses induced by the *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection. *Infect Immun* 71: 3988–3994.

COELHO VT, OLIVEIRA JS, VALADARES DG, CHÁVEZ-FUMAGALLI MA, DUARTE MC, et al. (2012) Identification of proteins in promastigote and amastigote-like *Leishmania* using a immunoproteomic approach. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1430.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose visceral grave: normas e condutas. Brasília: Ministério da Saúde; 2006. [Monografia na internet]. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_lv_grave_nc.pdf

Mondal S, Bhattacharya P, Ali N. Current diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010 Aug;8(8):919-44. doi: 10.1586/eri.10.78. PMID: 20695748.

Machado AS, Ramos FF, Oliveira-da-Silva JA, Santos TTO, Tavares GSV, Costa LE, Lage DP, Teixeira-Ferreira A, Perales J, Fernandes AP, Moreira RLF, Duarte MC, Tupinambás U, Caligiorne RB, Cota GF, Coelho EAF, Ludolf F. Na immunoproteomics approach to identify *Leishmania infantum* proteins to be Applied for the diagnosis of visceral leishmaniasis and human immunodeficiency virus co-infection. *Parasitology*. 2020 Aug;147(9):932-939. doi: 10.1017/S0031182020000578. Epub 2020 Apr 20. PMID: 32308186.

Tavares GSV, Mendonça DVC, Lage DP, Granato JDT, Ottoni FM, Ludolf F, Chávez-Fumagalli MA, Duarte MC, Tavares CAP, Alves RJ, Coimbra ES, Coelho EAF. Antileishmanial Activity, Cytotoxicity and Mechanism of Action of Clioquinol Against *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* Species. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2018 Sep;123(3):236-246. doi: 10.1111/bcpt.12990. Epub 2018 Apr 6. PMID: 29481714.

Tavares GSV, Mendonça DVC, Miyazaki CK, Lage DP, Soyer TG, Carvalho LM, Ottoni FM, Dias DS, Ribeiro PAF, Antinarelli LMR, Ludolf F, Duarte MC, Coimbra ES, Chávez-Fumagalli MA, Roatt BM, Menezes-Souza D, Barichello JM, Alves RJ, Coelho EAF. A Pluronic® F127-based polymeric micelle system containing an antileishmanial molecule is immunotherapeutic and effective in the treatment of *Leishmania amazonensis* infection. *Parasitol Int*. 2019 Feb;68(1):63-72. doi: 10.1016/j.parint.2018.10.005. Epub 2018 Oct 16. PMID: 30339837.

VIEIRA LQ, GOLDSCHMIDT M, NASHLEAMAS M, PFEFFER K, MAK T, et al. (1996) Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with *Leishmania major*, but control parasite replication. *J Immunol* 157: 827–835.

World Health Organization. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases. [Acessado em nov. 2010]. Disponível em http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/NTD_2010report_embargoed.pdf.