

PROTEÍNA ErpY-like COMO VACINA RECOMBINANTE DE SUBUNIDADE PROTEGE CONTRA A LEPTOSPIROSE EM HAMSTERS

STELLA BUCHHORN DE FREITAS¹; THAÍS LARRÉ OLIVEIRA²; AMILTON SEIXAS NETO²; DAIANE DRAWANZ HARTWIG²; MARTA GONÇALVES AMARAL³

¹Universidade Federal de Pelotas– stellafreitas@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – thais.larreoliveira@gmail.com; amiltonseixas@gmail.com; daianehartwig@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – martagamaral@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* spp., ao qual pertencem 20 espécies e mais de 250 sorovares. A infecção em humanos e animais pode ser atribuída ao contato direto ou indireto com a urina de animais portadores do agente patogênico (FAINE et al. 1999; REIS et al. 2008). Diversos mamíferos podem albergar leptospirosas patogênicas, porém os roedores são os reservatórios mais frequentes. Esses animais alojam os microrganismos nos rins e o eliminam através da urina (JORGE et al. 2015), sendo fonte de infecção para humanos, animais e meio ambiente.

Dentre os sintomas gerados pela infecção, verifica-se, geralmente, a ocorrência de vômitos acompanhados de febre e dores de cabeça, o que pode fazer com que a enfermidade seja facilmente confundida com outras doenças febris. Em sua forma aguda, a leptospirose pode afetar múltiplos órgãos, como o fígado (icterícia), os rins (nefrite), os pulmões (hemorragia pulmonar) e o cérebro (meningite) (FAINE et al. 1999; GOUVEIA et al. 2008; SEGURA et al. 2005).

A ocorrência da leptospirose está, na grande maioria dos casos, associada a regiões tropicais e subtropicais, com condições precárias de saneamento. Esta doença é considerada um problema de saúde pública, além de causar prejuízos econômicos no setor agrícola (FAINE et al. 1999; LEVETT 2001).

Devido às limitações existentes no controle da leptospirose, torna-se cada vez mais necessária a busca por métodos alternativos, mais eficazes e sensíveis para o controle da doença. Estudos celulares e moleculares tem focado na análise de sequências genômicas de isolados de *Leptospira* spp. na busca por novos alvos relacionados ao desenvolvimento de métodos de diagnóstico e produção de vacinas. Dentre eles, tem sido avaliado o potencial de uma série de LICs, presentes em leptospirosas patogênicas (HARTWIG et al. 2011; HARTWIG et al. 2013), como a lipoproteína ErpY-like, alvo deste estudo.

A lipoproteína ErpY-like foi reportada como sendo uma proteína de *L. interrogans* que possui sequência muito similar a fatores de virulência encontrados em outros patógenos, como a lipoproteína de membrana externa ErpY de *Borrelia burgdorferi*, além da expressão desta proteína ser observada durante a infecção *in vivo* (ESHGHI et al. 2009). Sendo assim, o objetivo desse estudo foi produzir a proteína ErpY-like em sua forma recombinante e utilizá-la na imunização de hamsters para avaliação de seu potencial protetor através de ensaios desafio.

2. METODOLOGIA

Potencial imunoprotetor da proteína recombinante ErpY-like: o potencial imunoprotetor da proteína rErpY-like como vacina de subunidade recombinante foi avaliado em hamsters. Para tanto, machos de 4–6 semanas de idade foram divididos em 2 grupos de 8 animais cada. Os animais foram imunizados com a proteína recombinante rErpY-like (80 µg) ou solução salina acrescidos do adjuvante Addavax™ (1:1) através da via intramuscular. Um grupo de 4 animais foi imunizado com 10^9 células de leptospiros inativadas pelo calor, como controle positivo do desafio. As vacinas foram administradas em duas doses com 14 dias de intervalo entre as doses. Amostras de sangue foram coletadas pelo plexo retro-ocular antes de cada imunização e também do desafio, sendo o soro estocado à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vinte e oito dias após a primeira dose todos os animais foram desafiados intraperitonealmente com uma dose de 10^3 leptospiros, que equivale a $5\times\text{DL}_{50}$ de *L. interrogans* serovar Copenhageni. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as regulamentações, políticas e princípios do manual estabelecido pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel (CEEA 5429).

Histopatologia e cultura: para os ensaios de histopatologia e cultura os hamsters que sobreviverem até 30 dias após o desafio foram eutanasiados e amostras de tecido renal e pulmonar coletadas para estudos histopatológicos. A imunidade esterilizante induzida pelas vacinas foi determinada através de isolamento de leptospira por cultivo de amostras de tecido renal, onde de cada órgão foram coletadas de 1 a 2 g assepticamente, processadas e transferidas para 5 ml de meio EMJH (Difco) (pH 7.2). Microscopia de campo escuro foi realizada durante 8 semanas com intuito de identificar culturas positivas. Para os estudos de histopatologia, as amostras de tecido foram fixadas em formalina 10% (pH 7.0) e embebidas em parafina. Seis amostras de 5 - 6 µm obtidas de cada órgão foram coradas com hematoxilina-eosina e avaliadas por patologista na identificação de nefrite intersticial e hemorragia pulmonar.

Avaliação do perfil de anticorpos em hamsters através de ELISA: o soro dos hamsters vacinados foi avaliado quanto à presença de imunoglobulina G (IgG) específicas através de um ELISA. Placas de 96 cavidades (Polysorp™ Surface, NUNC) foram sensibilizadas *overnight* com o antígeno diluído em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6, cuja concentração, assim como a diluição de soro utilizada foram determinadas através de ELISA tipo *checkerboard*. A leitura da OD₄₅₀ foi feita no equipamento Multiskan MCC/340 (Titertek Instruments).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proteína recombinante ErpY-like utilizada para imunizar hamsters associada ao adjuvante Addavax demonstrou potencial imunoprotetor em hamsters, onde mais de 60% dos animais imunizados sobreviveu ao desafio letal com cepa virulenta de *L. interrogans* (Fig. 1), sendo significativamente diferente do grupo imunizado com solução salina acrescida de Addavax (* $P<0,05$).

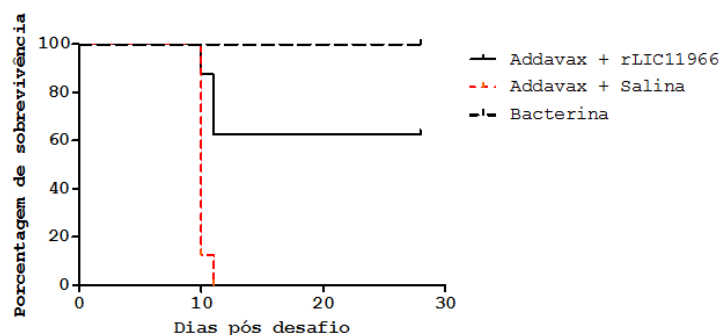


Figura 1: Curva de sobrevivência dos animais vacinados com rErpY-like acrescida do adjuvante Addavax e desafiados com cepa virulenta de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (10^3 leptospiros, que equivale a $5x DL_{50}$). O teste Wilcoxon Log-rank e o teste de Fischer foram usados para determinar diferenças significativas entre os grupos imunizados e os grupos controles (* $P < 0,05$).

As imunizações com a proteína ErpY-like acrescida do adjuvante Addavax induziram anticorpos IgG em hamster ($P < 0.05$) conforme demonstrado através de ELISA (Figura 2). Já aos 14 dias pós-imunização níveis significativos de IgG foram identificados, e estes aumentaram com o *boost*, conforme demonstrado no dia 28. Os animais imunizados com PBS não tiveram níveis significativos de anticorpos detectados. Já em relação aos cultivos renais dos 5 animais sobreviventes ao desafio, todos foram negativos na cultura, o que indica imunidade esterilizante.

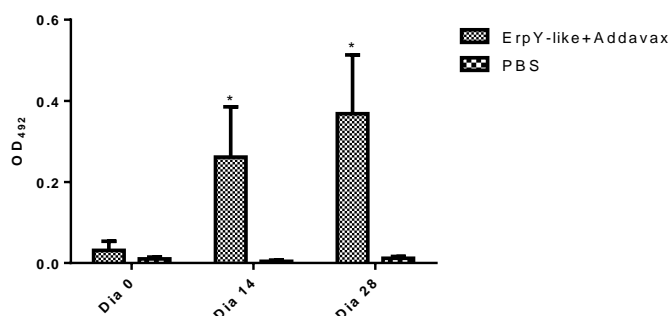


Figura 2: Resposta imune humoral dos hamsters imunizados com rErpY-like+Addavax. A proteína rErpY-like expressa por *E. coli* foi utilizada como antígeno no ELISA. A média dos valores foi calculada para as amostras de soro avaliadas em triplicata. Resultados foram expressos como a média da absorbância e significância $P^* < 0.05$ em comparação com o grupo controle.

As análises histopatológicas de pulmão e rim e cultura de leptospiros dos rins dos hamsters imunizados e sobreviventes, podem ser observadas na tabela 1. Os resultados de cultura renal indicam que a vacina baseada em rErpY-like + Addavax induziu imunidade esterilizante em hamsters. Já em relação as análises histopatológicas os hamsters sobreviventes apresentaram lesões, assim como os imunizados com a bacterina (ver tabela 1).



Tabela 1: Análises histopatológicas e cultivo de leptospiras de rim e pulmão dos hamsters imunizados e que sobreviveram ao desafio.

Vacina	% Proteção (sobreviventes/total)		% Cultura positiva (positivo/sobreviventes)	% Lesões histopatológicas (positivos/sobreviventes)		
	Vacinados	Controles		Kidneys		
				Hemorragia pulmonar	Degeneração celular e necrose	Infiltração de linfócitos
rErp Y- like + Addavax	62.5 (5/8)	0 (0/8)	0/5	80 (4/5)	60 (3/5)	40 (2/5)
Bacterin	100 (4/4)		0/4	75 (3/4)	25 (1/4)	0 (0/4)

4. CONCLUSÕES

A proteína ErpY-like descrita é imunogênica, uma vez que animais experimentalmente imunizados com este polipeptídeo produzem anticorpos específicos contra a mesma, e apresentam imunoproteção contra desafio letal, representando seu potencial como alvo vacinal. Além disso, os animais que sobreviveram ao ensaio desafio não apresentavam leptospiras em seus rins, o que indica a capacidade desta vacina induzir imunidade esterilizante.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ESHGHI, A., CULLEN, P.A., COWEN, L., ZUERNER, R.L., & CAMERON, C.E. 2009. Global proteome analysis of *Leptospira interrogans*. *J.ProteomeRes.*, 10, 4564-4578.
- FAINE, S., ADLER, B., BOLIN, C., & PEROLAT, P. 1999. *Leptospira and Leptospirosis* Melbourne, MedSci.
- GOUVEIA, E.L., METCALFE, J., DE CARVALHO, A.L., AIRES, T.S., VILLASBOAS-BISNETO, J.C., QUEIRROZ, A., & Santos, A.C., Salgado, K., Reis, M.G., & Ko, A.I. 2008 Leptospirosis-associated Severe Pulmonary Hemorrhagic Syndrome, Salvador, Brazil. *Emerg.Infect.Dis.*, 14, (3) 505-508.
- HARTWIG, D.D., SEIXAS, F.K., CERQUEIRA, G.M., MCBRIDE, A.J., & DELLAGOSTIN, O.A. 2011. Characterization of the immunogenic and antigenic potential of putative lipoproteins from *Leptospira interrogans*. *Curr.Microbiol.*, 4, 1337-1341.
- HARTWIG, D.D., FORSTER, K.M., OLIVEIRA, T.L., AMARAL, M., MCBRIDE, A.J., & DELLAGOSTIN, O.A. 2013. A prime-boost strategy using the novel vaccine candidate, LemA, protects hamsters against leptospirosis. *Clin.VaccineImmunol.*, 20, (5) 747-752.
- JORGE, S., MONTE, L.G., DE OLIVEIRA, N.R., COLLARES, T.F., ROLOFF, B.C., GOMES, C.K., HARTWIG, D.D., DELLAGOSTIN, O.A., & HARTLEBEN, C.P. 2015. Phenotypic and Molecular Characterization of *Leptospira interrogans* Isolated from *Canis familiaris* in Southern Brazil. *Curr.Microbiol.*, 4, 496-500.
- LEVETT, P. N. Leptospirosis. 2001. *Clin.Microbiol.Rev.*, 14, (2) 296-326.
- SEGURA, E.R., GANOZA, C.A., CAMPOS, K., RICARDI, J.N., TORRES, S., & SILVA, H. 2005. Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden. *Clin.Infect.Dis.*, 40, (33) 43-51.