

## AVALIAÇÃO DO USO DA QUIMERA RECOMBINANTE Erpy-LemA COMO INSUMO PARA O DIAGNÓSTICO E CONTROLE DA LEPTOSPIROSE

BEATRIZ BATISTA BRITES<sup>1</sup>; AMILTON CLAIR PINTO SEIXAS NETO<sup>2</sup>; THAYNÁ  
LANER CARDOSO<sup>3</sup>; SAMUEL RODRIGUES CARVALHO<sup>4</sup>; NATALI LIMA DIAS<sup>5</sup>;  
DAIANE DRAWANZ HARTWIG<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [beatriz.batista.brites@gmail.com](mailto:beatriz.batista.brites@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [amiltonseixas@gmail.com](mailto:amiltonseixas@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas - [nanalaner@hotmail.com](mailto:nanalaner@hotmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas - [samukrc17@gmail.com](mailto:samukrc17@gmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas - [natali.dias.754@gmail.com](mailto:natali.dias.754@gmail.com)

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – [daianehartwig@gmail.com](mailto:daianehartwig@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma antrozoose frequente em regiões tropicais e subtropicais (LEVETT 2001). É uma infecção causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* spp., que acomete humanos e animais em todo o mundo. A incidência e a mortalidade da doença em países subdesenvolvidos, onde fatores como a manifestação de sintomas variáveis e inespecíficos, a falta de vigilância e de testes de diagnóstico rápidos e eficazes, ainda são consideradas decisivas para o sub-diagnóstico quando analisando o panorama global (REIS et al. 2008).

O Teste de Aglutinação Microscópica (MAT) é a técnica padrão ouro para o diagnóstico de leptospirose e consiste em confrontar diferentes sorovares de cepas patogênicas vivas com o soro de pacientes suspeitos da infecção (Levett 2001). Apesar de ser uma técnica muito utilizada, é um método laborioso, que apresenta riscos aos técnicos, bem como, há um alto índice de resultados errôneos devido a diferentes interpretações e uma baixa sensibilidade na fase aguda da doença (YAAKOB, RODRIGUES, JOHN 2015).

A lipoproteína Erpy-like é descrita como um antígeno de *Leptospira interrogans*, sendo eficaz na proteção de hamster contra infecção letal (OLIVEIRA et al. 2018) e quando empregada em teste sorológico do tipo (*Enzyme linked Immunosorbent Assay*) no diagnóstico da infecção em suínos (PADILHA et al. 2019). Além disso, a hipotética lipoproteína LemA, quando utilizada no desenvolvimento de vacinas, demonstrou ser um excelente antígeno (HARTWIG et al. 2011; OLIVEIRA et al. 2018; 2020; HARTWIG et al. 2013).

Assim, neste estudo produzimos uma quimera recombinante multi-epítomos baseada nas proteínas rErpY e LemA e avaliamos sua capacidade imunogênica *in vivo* como possível alvo no desenvolvimento de vacinas para controle da leptospirose.

### 2. METODOLOGIA

**2.1 Inoculação de camundongos BALB/C:** foram utilizados seis camundongos BALB/C machos com 6–8 semanas de idade, separados em dois grupos distintos. Os grupos foram (1) animais imunizados com rErpY/LemA mais adjuvante; (2) animais inoculados com o diluente de proteínas tampão fosfato salino (PBS 1X) e adjuvante. O protocolo de imunização dos grupos se manteve similar: inoculação intraperitoneal de 50 mg da quimera recombinante para o grupo 1 e 50 mL de PBS para o grupo 2, realizadas nos dias 0, 14, 21, 28, 35, 42 e 49. A primeira dose foi realizada com adição de adjuvante completo de Freund (Sigma Aldrich, EUA) na proporção de 1:1, enquanto nas doses seguintes foi utilizado adjuvante incompleto

de Freund (Sigma-Aldrich, EUA). Previamente, a cada inoculação e no último dia de experimentação foram coletadas amostras sanguíneas dos animais e submetidas à centrifugação ( $3.000 \times g$ , 5 min) para obtenção do soro. Todas as amostras de soro foram mantidas a  $-20^\circ\text{C}$ .

**2.2 Soroconversão:** para avaliar a resposta imune humoral dos camundongos foi utilizado o Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA), conforme o protocolo padrão estabelecido por LOGOZZI et al (2020). Placas de fundo chato de 96 poços foram sensibilizadas com 50 ng da proteína recombinante diluída em tampão carbonato-bicarbonato. Soro fetal bovino foi utilizado para o bloqueio e entre todas as etapas, foi realizado a lavagem das placas (PBS acrescido de Tween 20%). Os soros obtidos dos animais foram testados em duplicatas, na concentração 1:100. IgG anti-mouse conjugado com peroxidase foi aplicado.

**2.3 Titulação:** foram utilizadas 50 ng da quimera recombinante para sensibilização da placa e soros referentes ao 49º dia foram aplicados em duplicata, através de diluição seriada (1:100 a 1:102.400). Anticorpo monoclonal antiIgG de camundongo conjugado com peroxidase foi adicionado.

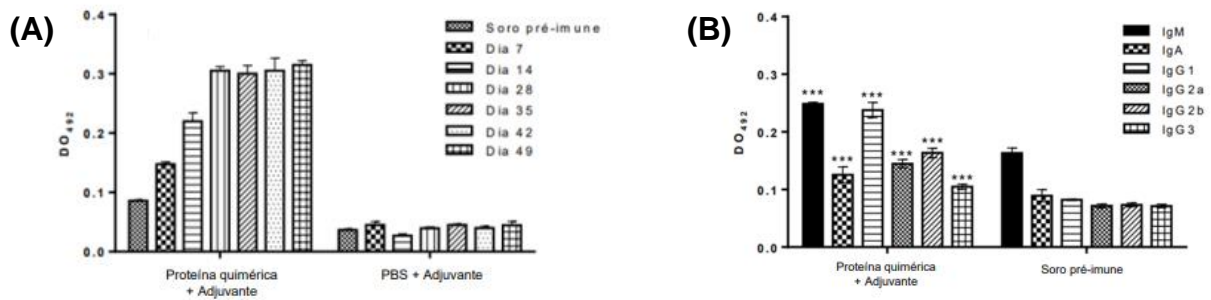
**2.4 Isotipagem:** para avaliar os diferentes isotipos produzidos de anticorpos foi utilizado o kit *Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents* (Invitrogen, USA). Foram avaliados os seguintes isotipos: IgM, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. Para isso, foram utilizados 50 ng de proteínas para sensibilização da placa de 96 cavidades, 60  $\mu\text{l}$  do *pool* de soros (1:1 diluído em PBS 1X) dos animais imunizados, 100  $\mu\text{l}$  de cada um dos reagentes isotípicos específicos e anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase.

Para observar os resultados das reações de soroconversão, titulação e isotipagem, foi utilizado um tampão de revelação e a reação interrompida com a adição de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2M. A leitura de todos os ensaios foram realizadas através de um leitor de placas Multiskan MCC/340 ELISA, com comprimento de onda de 492 nm.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

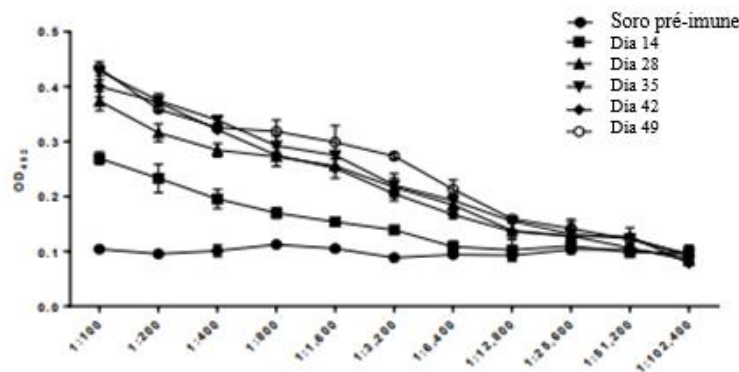
Os animais imunizados com a quimera ErpY-LemA apresentaram resposta imune significativa a partir do 7º dia pós-imunização em comparação com o soro pré-imune (dia 0;  $P < 0,001$ ) (Figura 1A). Uma resposta significativa de anticorpos IgG permaneceu crescente nos animais imunizados até o 49º dia de experimentação. Os animais imunizados com PBS + adjuvante não apresentaram resposta imune significativa. É possível notar melhora expressiva na resposta quando comparado com resultados das análises da utilização dos epítomos de maneira individual avaliados por OLIVEIRA et al (2018), visto que ambas ErpY-like e LemA apresentaram respostas a partir do 28º dia de experimentação e a quimera apresentou resultados significativos a partir do 7º dia experimental.

Quanto à isotipagem dos anticorpos, foi possível identificar os isotipos IgM, IgA e das subclasses IgG, registrando diferenças estatisticamente significativas em comparação ao grupo controle negativo (PBS + adjuvante) (Figura 1B). A presença significativa de todos os isotipos de anticorpos avaliados foi detectada em animais imunizados com proteína ErpY-LemA ( $P < 0,001$ ), em comparação com o soro pré-imune.



**Fig. 1:** (A) Resposta de anticorpo IgG em camundongos imunizados com ErpY-LemA. Os valores são apresentados como média  $\pm$  DP, e a significância foi determinada pela análise de variância (comparações múltiplas de Tukey). (B) Isotipagem das subclasses IgA, IgM e IgG anti-Erpy-LemA quimera. Os dados representam as absorvências médias dos soros agrupados de camundongos coletados no dia 0 (soro pré-imune) e no dia 49. As diferenças significativas, em comparação com o soro pré-imune, são indicadas por asteriscos (\*\*\*)  $P < 0,001$ .

Os animais imunizados com duas e três doses (dias 14 e 28) de ErpY/LemA tiveram um título de 1:3.200 ( $P < 0,05$ ) e 1:6.400 ( $P < 0,05$ ), respectivamente, enquanto, os animais imunizados com quatro, cinco e seis doses (dia 35, 42 e 49) de Erpy-LemA obtiveram um título de 1:12.800 ( $P < 0,05$ ) em comparação com o soro pré-imune (dia 0) (Figura 2).



**Fig. 2:** Curva de titulação de anti-soro de camundongo criado contra a quimera recombinante. Como controle negativo, foi utilizado soro pré-imune de camundongos ( $P < 0,05$ ).

#### 4. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos no presente estudo foi possível verificar que a proteína quimérica utilizada se apresentou imunogênica, sendo capaz de estimular uma produção significativa de anticorpos IgG a partir do sétimo dia após a imunização, bem como diferentes isotipos de anticorpos. Esses achados validam o uso da quimera rErpY/LemA como potencial imunobiológico.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÁVILA-MARTÍNEZ, E.G. **Análises *in silico* e produção de quimera recombinante contendo epítomos das proteínas ErpY-like e LemA de *Leptospira* spp. para uso em sorodiagnóstico e desenvolvimento de vacinas.** 2023. 145f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.

- BHARTI A.R., NALLY J. E., RICALDI J. N., et al. (2003) Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases** 3:757–771.
- FERNANDES LG V., AVELAR KES, ROMERO EC, HEINEMANN MB, KIRCHGATTER K, NASCIMENTO ALTO (2022). A New Recombinant Multiepitope Chimeric Protein of *Leptospira interrogans* Is a Promising Marker for the Serodiagnosis of Leptospirosis. **Trop Med Infect Dis**.
- GHOSH, K. K., AMAN P., ANUSUA D., MD S. H., PRATEEK S., PANKAJ K., VINAYAGAMURTHY B., E MANISH K. 2019. Role of supramolecule ErPY-like lipoprotein of *Leptospira* in thrombin-catalyzed fibrin clot inhibition and binding to complement factors H and I, and its diagnostic potential”. **Infection and Immunity** 87 (12): 1–18.
- HARTWIG, D. D., FORSTER K. M., OLIVEIRA, T. L., AMARAL, M. G., McBRIDE, A.J.A., DELLAGOSTIN, O. A. 2013. A prime-boost strategy using the novel vaccine candidate, LemA, protects hamsters against leptospirosis. **Clinical and Vaccine Immunology** 20 (5): 747–52.
- HARTWIG, DAIANE D., A. DELLAGOSTIN ODIR, ANDRÉ A. GRASSMANN, SAMUEL R. FÉLIX, ÉVERTON F. DA SILVA, E ALAN J.A. McBRIDE. 2011. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Human Vaccines** 7 (11): 1215–24.
- LEVETT, PAUL N. 2001. “**Leptospirosis**” 14 (2): 296–326.
- MAIA MAC, BETTIN EB, BARBOSA LN, DE OLIVEIRA NR, BUNDE TT, PEDRA ACK, ROSA GA, DA ROSA EEB, SEIXAS NETO ACP, GRASSMANN AA, MCFADDEN J, DELLAGOSTIN OA, McBRIDE AJA (2022) Challenges for the development of a universal vaccine against leptospirosis revealed by the evaluation of 22 vaccine candidates. **Front Cell Infect Microbiol** 12.
- OLIVEIRA, THAÍS LARRÉ, KÁTIA LESTON BACELO, KARINE MACIEL FORSTER, VINICIUS ILHA, OSCAR ENDRIGO RODRIGUES, E DAIANE D. HARTWIG. 2020. DNA nanovaccines prepared using LemA antigen protect Golden Syrian hamsters against *Leptospira* lethal infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 115 (2): 1–6.
- OLIVEIRA, THAÍS LARRÉ, RODRIGO ANDRADE SCHUCH, GUILHERME ROIG INDA, BÁRBARA COUTO ROLOFF, AMILTON CLAIR PINTO SEIXAS NETO, MARTA AMARAL, ODIR ANTONIO DELLAGOSTIN, E DAIANE DRAWANZ HARTWIG. 2018. LemA and Erp Y-like recombinant proteins from *Leptospira interrogans* protect hamsters from challenge using AddaVax™ as adjuvant”. **Vaccine** 36 (19): 2574–80.
- PADILHA, BÁRBARA COUTO ROLOFF, HENRIQUE QUEIROZ SIMÃO, THAÍS FARIAS COLLARES, STELLA BUCHHORN DE FREITAS, THAÍS LARRÉ OLIVEIRA, RODRIGO ANDRADE SCHUCH, RAFAEL DOS SANTOS WOLOSKI, E DAIANE DRAWANZ HARTWIG. 2022. ErpY-like protein, a promising antigen to leptospirosis control: characterization of antigenic and immunogenic potential. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**. 44: 1–9.
- REIS MG, COSTA F, RISTOW P (2021) *Leptospira interrogans* biofilm formation in *Rattus norvegicus* (Norway rats) natural reservoirs. **PLoS Negl Trop Dis** 15:e0009736.
- Yaakob, Yuszniyahyati, Kenneth Francis Rodrigues, e Daisy Vanitha John. 2015. “Leptospirosis: Recent incidents and available diagnostics– A review”. **Medical Journal of Malaysia** 70 (6): 351–55.