

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

**Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Curso de Graduação em Biotecnologia**



Trabalho de Conclusão de Curso

**DESENVOLVIMENTO DE VACINA RECOMBINANTE CONTRA
LEPTOSPIROSE: CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS LIC11207 E
LIC20087**

Fernanda Endler Valiati

Pelotas, 2013

FERNANDA ENDLER VALIATI

**DESENVOLVIMENTO DE VACINA RECOMBINANTE CONTRA LEPTOSPIROSE:
CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS LIC11207 E LIC20087**

Trabalho Acadêmico apresentado ao
Curso de Graduação em Biotecnologia
da Universidade Federal de Pelotas
como requisito parcial à obtenção do
título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador acadêmico: Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Orientador de estágio: Prof. Dr. Rafael Roesler

Pelotas, 2013

Dados de catalogação na fonte:

Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

V172d

Valiati, Fernanda Endler

Desenvolvimento de vacina recombinante contra leptospirose : caracterização dos antígenos lic11207 e lic20087 / Fernanda Endler Valiati. – 51f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2014. – Orientador Éverton Fagonde da Silva ; **co-orientador** Odir Antonio Dellagostin.

Banca examinadora:

M.Sc. Amilton Seixas Netto

Dr. Samuel Rodrigues Félix

Dra. Anelize Félix

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva (orientador)

Dedicatória

Aos meus pais, que sempre me apoiaram nos meus sonhos e possibilitaram que eles se tornassem realidade, me dando todo suporte e amor necessários.

Ao meu irmão, pela parceria, apoio e cumplicidade mesmo que à distância, principalmente, nos momentos de folga e descontração.

À minha família como um todo, por todo incentivo e carinho.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas e ao Núcleo de Biotecnologia do CDTec, por me proporcionar uma educação de qualidade.

Aos meus pais, Lúcia e Rolnei, por terem sido fundamentais na construção do meu caráter, por toda amizade e carinho, pelo apoio e incentivo que me motiva a seguir e lutar pelos meus sonhos, pelo exemplo e valores que sigo todos os dias e acima de tudo, pelo amor incondicional.

Ao meu irmão, Luciano, por entrar na minha vida e me ensinar que dividir e compartilhar é muito melhor do que estar sozinho.

À minha família como um todo, que sempre esteve presente, tanto nos momentos felizes como nos momentos difíceis.

Ao meu tio Antônio Marcus Endler (*in memoriam*), por ter sido um dos primeiros a acreditar que eu era capaz e por ser um dos meus maiores exemplos de vida.

Ao meu orientador de estágio, Éverton Fagonde da Silva, pela oportunidade de ingresso no estágio, que foi fundamental para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao professor Odir Dellagostin, por sempre se mostrar disponível quando precisamos, pelo exemplo de pessoa a ser seguido e pela oportunidade de fazer parte de um grupo de pesquisa maravilhoso.

Aos amigos do grupo de pesquisa, em especial ao André, ao Marcus, ao Amilton e ao Samuel pela disposição em me ensinar, por me ajudarem na realização deste trabalho e pela amizade todos os dias.

Aos colegas do Laboratório de Vacinologia, pelos agradáveis anos de convívio e pelos momentos de trabalho e diversão compartilhados.

Aos meus amigos de graduação e aos amigos que conheci durante esta trajetória em Pelotas, por terem compartilhado comigo momentos inesquecíveis e pela amizade eterna que construímos.

Aos demais amigos, colegas, funcionários e professores do Núcleo de Biotecnologia pela disposição em colaborar para o andamento das pesquisas e demais processos educacionais.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

Meu carinho e gratidão!

“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.”

(Albert Einstein)

Resumo

Valiati, Fernanda Endler. **Desenvolvimento de vacina recombinante contra leptospirose: caracterização dos antígenos LIC20087 e LIC11207**. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A leptospirose é uma zoonose emergente causada pela infecção por espiroquetas do gênero *Leptospira* spp.. Distribuída mundialmente, a leptospirose é mais frequente em áreas tropicais e sub-tropicais, onde as condições ambientais e sócio-econômicas favorecem sua transmissão. Os seres humanos comumente se infectam através do contato direto ou indireto com a urina de animais infectados. As vacinas disponíveis atualmente são as bacterinas, que apresentam resposta imune de curto prazo, diversos efeitos colaterais e são protetoras apenas contra os sorovares incluídos na preparação da vacina. Embora vacinas recombinantes contra leptospirose virem sendo avaliadas, ainda representam um grande desafio. Neste estudo, duas novas proteínas recombinantes de *Leptospira* foram obtidas. Uma delas foi testada no modelo de leptospirose aguda em hamster para avaliar vacinas experimentais. A análise *in silico* do genoma de *L. interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae sorovar Copenhageni cepa FIOCRUZ L1-130 foi realizada para identificar genes alvo potenciais para o desenvolvimento de vacinas de subunidade. Dois genes foram selecionados para expressão de proteínas recombinantes em sistema de expressão heteróloga em *Escherichia coli*: a lic11207 e a lic20087, que codificam para prováveis lipoproteína e proteína de membrana externa, respectivamente. Os genes foram amplificados a partir do DNA genômico de *L. borgpeterseni* sorogrupo Ballum cepa 4E. Os procedimentos de clonagem resultaram nos vetores recombinantes pAE/lic20087 e pAE/lic11207. As proteínas recombinantes foram expressas em *E. coli* BL21 (DE3) Star e purificadas por cromatografia de afinidade. Ambas foram visualizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio e por western blot com anti-6xHis revelaram rLIC20087 e rLIC11207 com 34 kDa e 37,6 kDa, respectivamente. Posteriormente, a proteína rLIC11207 foi utilizada na imunização de hamsters que foram subsequentemente desafiados com dose letal de *L. borgpeterseni* 4E. A resposta imune humoral induzida pela proteína foi avaliada por ensaio imunoenzimático e demonstrou que todos os grupos inoculados com rLIC11207 produziram anticorpos anti-rLIC11207. A proteína rLIC11207 mostrou-se antigênica e imunogênica, tornando promissora sua utilização como vacina contra leptospirose.

Palavras-chave: leptospirose; *lic11207*; *lic20087*; vacina recombinante.

Abstract

Valiati, Fernanda Endler. **Desenvolvimento de vacina recombinante contra leptospirose: caracterização dos antígenos LIC20087 e LIC11207.** 2013. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Leptospirosis is an emerging zoonotic disease caused by spirochetes from the genus *Leptospira* spp.. Found worldwide, leptospirosis is more common in tropical and sub-tropical areas where environmental and socioeconomic conditions favor its transmission. Humans most commonly become infected through direct or indirect contact with the urine from infected animals. Vaccines currently available are bacterins, which provide short-term immune response, several side effects and are protective only against the serovars included in the vaccine preparation. Thus, recombinant vaccine against leptospirosis has been assessed, but still represents a major challenge. In this study, two new recombinant leptospiral proteins were produced for future use as vaccine candidates. *In silico* analysis on *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae Copenhageni L1-130 genome was conducted to identify potential gene targets for the development of subunit vaccines and two genes were selected for recombinant protein expression in *Escherichia coli* (*E. coli*) heterologous expression system: *lic11207* and *lic20087*, encoding a lipoprotein and an outer membrane protein (OMP), respectively. The cloning procedures resulted in pAE/*lic20087* and pAE/*lic11207* recombinant vectors and recombinant proteins were visualized in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and *western blot* with anti-6xHis antibody revealed rLIC20087 and rLIC11207 with 34 kDa and 37,6 kDa, respectively. Subsequently, rLIC11207 protein was used to immunize hamsters to obtain hyperimmune serum anti-rLIC11207 and the animals were subjected to challenge test, which were assessed by enzyme immunoassay. The induced antibody responses demonstrated that all groups inoculated with rLIC11207 antibodies produced rLIC11207. The rLIC11207 was antigenic and immunogenic, making it a promising vaccine candidate against leptospirosis.

Keywords: leptospirosis; *lic11207*; *lic20087*; recombinant vaccine.

Lista de Figuras

Figura 1 - Amplificação dos genes <i>lic11207</i> e <i>lic20087</i> por PCR	34
Figura 2 - Os vetores de expressão recombinantes obtidos no <i>software</i> Vector NTI 1..	35
Figura 3 - Análise da presença da <i>lic11207</i> e da <i>lic20087</i> em <i>Leptospira</i> spp.....	36
Figura 4 - Caracterização dos vetores recombinantes pela digestão com a enzima de restrição <i>XbaI</i>	37
Figura 5 - Purificação das proteínas rLIC11207 e rLIC20087 através de cromatografia de afinidade em coluna de sefarose carregada com níquel.	38
Figura 6 - <i>Western blot</i> mostrando as proteínas recombinantes rLIC20087 e rLIC11207..	39
Figura 7 - Produção de anticorpos sistêmicos anti-rLIC11207 determinados através de ELISA dos grupos LIC11207 + adjuvante oleoso e PBS + adjuvante oleoso.....	40
Figura 8 - Produção de anticorpos sistêmicos anti-rLIC11207 determinados através de ELISA dos grupos LIC11207 + adjuvante alumínio e PBS + adjuvante alumínio.....	40

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Resultados da proteção conferida pelos grupos vacinais.....	40
--	----

Sumário

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 <i>Agente etiológico</i>	16
2.1.1 <i>Classificação e composição genômica</i>	16
2.1.2 <i>Biologia Celular</i>	17
2.1.3 <i>Cultivo in vitro</i>	17
2.2 <i>Reservatórios</i>	18
2.3 <i>Ciclo de transmissão</i>	19
2.4 <i>Patogênese</i>	20
2.5 <i>Manifestações clínicas</i>	21
2.6 <i>Imunidade e vacinas</i>	22
2.7 <i>Controle, diagnóstico e tratamento</i>	25
3. OBJETIVOS	27
3.1 <i>Objetivo geral</i>	27
3.2 <i>Objetivos específicos</i>	27
4. METODOLOGIA	28
4.1 <i>Cepas, condições de cultivo e extração de DNA</i>	28
4.2 <i>Escolha das LICs e desenho dos primers</i>	28
4.3 <i>Análise da presença dos genes lic110207 e lic20087 em Leptospira spp.</i>	29
4.4 <i>Amplificação e clonagem de lic11207 e lic20087 em vetor pAE</i>	29
4.5 <i>Transformação de E. coli por eletroporação e extração dos vetores recombinantes</i>	29
4.6 <i>Expressão heteróloga dos genes lic11207 e lic20087</i>	30
4.7 <i>Purificação de rLIC11207 e rLIC20087</i>	30
4.8 <i>Antigenicidade e caracterização das proteínas recombinantes LIC11207 e LIC20087</i>	31
4.9 <i>Animais e coleta de amostras</i>	31
4.10 <i>Imunizações e teste de desafio</i>	32
4.11 <i>Avaliação da resposta imune humoral</i>	32

5. RESULTADOS.....	34
5.1 <i>Análise da presença dos genes lic11207 e lic20087 em Leptospira spp.</i>	34
5.2 <i>Análise in silico, amplificação dos genes e clonagem no vetor pAE</i>	34
5.3 <i>Caracterização e extração dos vetores recombinantes</i>	36
5.4 <i>Obtenção das proteínas recombinantes LIC11207 e LIC20087</i>	37
5.5 <i>Caracterização da proteínas recombinantes LIC11207 e LIC20087 por Western blot</i>	38
5.6 <i>Avaliação da resposta imune humoral</i>	39
5.7 <i>Teste de desafio</i>	41
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÕES	45
8. REFERÊNCIAS.....	46

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença infecciosa negligenciada que tem emergido nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, apresentando distribuição mundial (HARTSKEERL, COLLARES-PERREIRA & ELLIS, 2011). Tem sido identificada nos últimos anos como um problema global de saúde pública, pois aumenta as taxas de mortalidade e de morbidade (BHARTI et al., 2003). É uma zoonose cosmopolita causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* e encontrada mais comumente em áreas tropicais e sub-tropicais, onde as condições ambientais e sócio-econômicas favorecem a sua transmissão (GANOZA et al., 2010).

Nos países desenvolvidos a leptospirose é considerada uma patologia ocupacional, enquanto que nos países em desenvolvimento esta relacionada com a carência de estrutura sanitária básica (REIS et al., 2008). A ineficácia ou inexistência de rede de esgoto e drenagem de águas pluviais e a coleta de lixo inadequada são condições favoráveis à endemidade e a ocorrência de epidemias (REIS et al., 2008; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2004). Estima-se a ocorrência de cerca de 500.000 casos de leptospirose por ano em todo o mundo (WHO, 2003).

No Brasil, a doença apresenta-se de forma endêmica, sendo notificados cerca de 10.000 casos de leptospirose humana anualmente, com taxa de mortalidade em torno de 10% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). Além disso, os dados encontrados são subestimados devido a não identificação da forma febril na fase inicial da doença (BHARTI et al., 2003). Ela torna-se epidêmica em períodos chuvosos, principalmente nas capitais e áreas metropolitanas, devido às enchentes associadas à aglomeração populacional de baixa renda, às condições inadequadas de saneamento e à alta infestação de roedores infectados (PLANK & DEAN, 2000).

A prevalência dos diferentes sorovares dentro de uma população humana depende dos animais reservatórios presentes e os sorovares que eles carregam, bem como as condições ambientais locais, a ocupação e as práticas agropecuárias (BHARTI et al., 2003). A transmissão da leptospirose em humanos e animais domésticos ocorre incidentalmente pela exposição à água ou solo contaminados pela urina de animais infectados ou por contato direto com esses animais (KOIZUMI et al., 2012). Quando disseminada dentro do hospedeiro a *Leptospira* patogênica pode causar desde sintomas

como febre até manifestações mais severas, podendo levar à morte (LOURDAULT et al., 2011).

Devido às perdas econômicas causadas pela doença e os prejuízos em termos de saúde pública se faz necessário o uso de vacinas em humanos e animais (FRAGA, BARBOSA, & ISAAC, 2011). Atualmente, as vacinas disponíveis são constituídas de células inteiras inativadas, chamadas bacterinas, ou preparados da membrana de *Leptospiras* patogênicas, as quais induzem reações adversas, imunidade pouco duradoura e sorovar específica, não protegendo contra os diferentes sorovares que podem causar a leptospirose (ADLER & DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Deste modo, o desenvolvimento de novas estratégias para a prevenção da leptospirose é indispensável (FRAGA, BARBOSA & ISAAC, 2011).

Diante dessa limitação, o desenvolvimento de uma vacina multi-sorovar, que gere proteção cruzada contra os diferentes sorovares de *Leptospira*, ainda representa um grande desafio (MCBRIDE et al., 2005). Proteínas de membrana externa são apontadas como potenciais alvos vacinais, devido a sua localização na superfície da célula e a sua participação na interação com o hospedeiro (HAAKE & MATSUNAGA, 2011).

Nesse estudo realizamos a clonagem dos genes, expressão e purificação de duas novas proteínas de *Leptospira* patogênica, LIC20087 e LIC11207, com possível localização na superfície. A proteína rLIC11027 foi avaliada quanto a sua antigenicidade e imunogenicidade através de teste no modelo animal hamster.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Agente etiológico

2.1.1 Classificação e composição genômica

As leptospiras são bactérias pertencentes à ordem *Spirochaetales*, à família *Leptospiraceae* e ao gênero *Leptospira* (BHARTI et al., 2003). Esse gênero inclui espécies patogênicas e saprófitas, totalizando 20 espécies (KO, GOARANT, & PICARDEAU, 2009). Treze delas são consideradas patogênicas e podem ser classificadas em mais de 260 sorovares, sendo elas *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii* e *L. wolffii*. Já as saprófitas contêm mais de 60 sorovares e incluem as espécies *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. yanagawae*, *L. kmetyi*, *L. vanthielii* e *L. wolbachii* (ADLER & DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; CERQUEIRA & PICARDEAU, 2009).

Essa classificação sorológica é determinada, principalmente, pela diversidade estrutural e antigênica dos carboidratos componentes do lipopolissacarídeo (LPS) presente na sua membrana externa (BHARTI et al., 2003; LEVETT, 2001). Por conveniência, os sorovares relacionados antigenicamente foram organizados em sorogrupos, sendo que as leptospiras patogênicas estão distribuídas em 23 sorogrupos (GOMES, 2013).

O genoma das leptospiras é composto de dois cromossomos circulares, CI e CII. Este último contém um gene *asd* que codifica a enzima aspartato-beta-semi aldeído-desidrogenase, essencial na biossíntese de aminoácidos e parede celular, sendo qualificado como pequeno cromossomo (GOMES, 2013; NASCIMENTO et al., 2004; PICARDEAU et al., 2008; MCBRIDE et al., 2005). Duas espécies patogênicas e uma saprófita, quando comparados os seus genomas, identificaram a presença de 2.052 genes compartilhados, identificando o core do genoma leptospiral. Mais de 50% dos genes de *Leptospira* são de função desconhecida, sugerindo a presença de fatores de virulência e mecanismos de patogenicidade únicos (ADLER & DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

2.1.2 Biologia Celular

Leptospiras são espiroquetas pertencentes ao gênero *Leptospira*, família *Leptospiraceae*, ordem *Spirochaetales* (PLANK & DEAN, 2000). Elas apresentam formato helicoidal, geralmente com 6 a 20 µm de comprimento e 0,1 a 0,2 µm de diâmetro. São espiraladas, apresentam suas extremidades em forma de gancho, e são móveis devido à presença de dois flagelos periplasmáticos, que se encontram um em cada pólo da célula e se estendem no espaço entre a membrana interna e a membrana externa (BHARTI et al., 2003; EVANGELISTA & COBURN, 2011; KO et al., 2009). São bactérias aeróbicas estritas, quimiorganotróficas, catalase positivas e oxidases negativas. Possuem como característica serem capazes de utilizar os ácidos graxos de cadeia longa como única fonte de carbono e energia, porém são incapazes de metabolizar os açúcares e não necessitam de aminoácidos para o seu crescimento *in vitro* (ADLER & DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; KO et al., 2009).

As leptospiras compartilham características tanto de bactérias Gram-negativas como de Gram-positivas. A estrutura de membrana dupla e a presença de LPS agregam características de bactérias Gram-negativas, enquanto que a camada de peptidoglicano ancorada à membrana citoplasmática interna é remanescente de bactérias Gram-positivas (EVANGELISTA & COBURN, 2011). Ancorado na membrana externa, o LPS, constitui o principal antígeno e o principal componente de superfície (HAAKE, 2000).

2.1.3 Cultivo *in vitro*

As leptospiras apresentam temperatura ótima de crescimento *in vitro* em torno de 26 a 30 °C e multiplicam-se melhor em pH entre 7,2 e 7,4. O tempo de geração para os sorovares patogênicos é de 8 a 12 horas em meio líquido (GOMES, 2013). Crescem em meio simples enriquecido com vitaminas, ácidos graxos de cadeia longa e sais de amônio. Normalmente, o meio utilizado, disponível comercialmente, é o *Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris* (EMJH), baseado em ácido oleico, albumina sérica bovina e polisorbato 80, geralmente suplementado com soro de coelho ou suplementos comerciais (EVANGELISTA & COBURN, 2011; LEVETT, 2001).

Os meios tornam-se seletivos pela adição de vários antimicrobianos, sendo os

mais comuns 5-fluoruracil e sulfado de neomicina (ADLER & DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Para avaliar o crescimento e verificar a presença de contaminantes no cultivo, utiliza-se o microscópio de campo escuro (GOMES, 2013).

2.2 Reservatórios

Os animais acometidos pela leptospirose podem ser passíveis a duas modalidades, portadores convalescentes e os portadores assintomáticos. Os animais sinantrópicos, domésticos e selvagens são os reservatórios essenciais para a persistência dos focos da infecção, tendo em vista a longa duração desta condição (meses ou anos) e a ampla facilidade de deslocamento atribuída a estes animais (OLIVEIRA, LOURDES & SIMÕES, 2013).

Roedores são portadores assintomáticos da doença e também os principais carreadores da espiroqueta, porém, esse caráter de portador crônico já foi reportado em quase todos os mamíferos. Entretanto, os seres humanos são considerados hospedeiros acidentais dentro da cadeia de transmissão, sendo pouco eficiente na transmissão da doença (ADLER & DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

As principais espécies de roedores sinantrópicos portadores são *Rattus norvegicus* (ratazana ou rato de esgoto), *Rattus rattus* (rato de telhado ou rato preto) e *Mus musculus* (camundongo). Ao se infectarem, não desenvolvem a doença e tornam-se portadores, albergando a *Leptospira* nos rins, eliminando-a viva no meio ambiente e contaminando, dessa forma, água, solo e alimentos (KO et al., 2009; WHO, 2003). O *R. norvegicus* é o principal portador do sorovar Icterohaemorrhagiae, um dos mais patogênicos para o homem. Outros reservatórios de importância são: caninos, suínos, bovinos, equinos, ovinos e caprinos, porém, estes podem manifestar a doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Pelo fato de todos os mamíferos serem susceptíveis à infecção e poderem atuar como fonte de infecção, é importante conhecer os sorovares prevalentes em uma população e os hospedeiros que permitem a manutenção do ciclo da doença em cada região para um maior entendimento epidemiológico da doença. A prevalência de diferentes sorovares de *Leptospira* dentro de uma população depende dos reservatórios

animais presentes nessa região e dos sorovares que eles albergam (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012; OLIVEIRA et al., 2013).

2.3 Ciclo de transmissão

A transmissão da leptospirose ocorre, incidentalmente, de forma indireta, pela exposição à água ou solo contaminados pela urina de animais infectados ou por contato direto com tecidos e órgãos desses animais (KOIZUMI et al., 2012). O ciclo de transmissão da leptospirose envolve, portanto, um animal reservatório do patógeno, uma fonte de infecção e um hospedeiro suscetível (ADLER & DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

A infecção é comum em roedores, animais silvestres e animais domésticos, acometendo mais de 160 mamíferos no mundo (OLIVEIRA et al., 2013) e está associada diretamente a fatores ambientais que favorecem o contato destes com as excretas dos reservatórios (HOTEZ et al., 2008). No caso da infecção humana, as taxas de incidência são subestimadas e dependem de fatores como as condições socioeconômicas, a região e o clima onde as pessoas vivem (BHARTI et al., 2003; VINETZ, 2001).

A entrada do microrganismo no hospedeiro ocorre através da pele com presença de microlesões, da pele íntegra imersa por longos períodos em água contaminada ou através de mucosas (orofaríngea, nasal, ocular e genital) (HARTSKEERL, COLLARES-PEREIRA & ELLIS, 2011). O contato com água ou lama contaminadas demonstra a importância do elo hídrico na transmissão da doença ao homem (BHARTI et al., 2003). Outras modalidades de transmissão possíveis, como pelo contato com sangue, tecidos e órgãos de animais contaminados, por ingestão de água ou alimentos contaminados, acidental em laboratório ou por via transplacentária são relatadas, porém, com muito pouca frequência. A transmissão entre humanos é muito rara e de pouca relevância epidemiológica, podendo ocorrer pelo contato com urina, sangue, secreções e tecidos de pessoas infectadas (WHO, 2003).

O período de transmissibilidade pode durar meses, anos ou a vida toda, de acordo com a espécie animal e o sorovar envolvido, onde os animais infectados eliminam a *Leptospira* através da urina (KO et al., 2009). A suscetibilidade no homem é geral e a

imunidade adquirida pós-infecção é sorovar-específica, podendo um mesmo indivíduo apresentar a doença mais de uma vez se o agente causal de cada episódio pertencer a um sorovar diferente do anterior. O período de incubação varia de 1 a 30 dias, sendo em média entre 5 e 14 dias (LEVETT, 2001; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

2.4 Patogênese

Após a entrada no hospedeiro, as leptospiras patogênicas multiplicam-se e disseminam-se rapidamente para os órgãos-alvo, como rins, pulmões e fígado através da via hematogena e da sua capacidade de translocação celular (BAROCCHI et al., 2002; FAINE et al., 1999; KO et al., 2009). O local de preferência para colonização das leptospiras é o lúmen dos túbulos renais, local onde a concentração de anticorpos é baixa, atuando como estratégia para a evasão do sistema imune (HARTSKEERL et al., 2011; MCBRIDE et al., 2005). Proteínas de membrana externa com afinidade por componentes da matriz extracelular do hospedeiro também são importantes na invasão e na disseminação da bactéria no organismo (CULLEN et al., 2005; HAAKE & MATSUNAGA, 2011).

As leptospiras apresentam mais de 80 genes envolvidos em motilidade e quimiotaxia, mecanismos fundamentais para a patogênese. A quimiotaxia parece ter um importante papel na patogenicidade devido ao comportamento de motilidade em resposta à hemoglobina (KO et al., 2009; YURI et al., 1993). Sua capacidade de deslocamento e a localização interna do flagelo periplasmático, previnem a imobilização da bactéria por parte dos anticorpos anti-flagelares, além de permitir proteção contra variações extremas de condições externas, como diferentes concentrações salinas e pH (CHARON & GOLDSTEIN, 2002; GOLDSTEIN & CHARON, 1988).

Acredita-se que a patogênese da leptospirose esteja relacionada com a resposta imune do hospedeiro para componentes de membrana, como os lipopolissacarídeos, os peptidoglicanos e as lipoproteínas (CULLEN et al., 2005; FRAGA et al., 2013). Estudos realizados com leptospiras mutantes apresentando interrupção de proteínas pertencentes a biossíntese do LPS, resultaram em atenuação da virulência, ou seja, perda da capacidade de causar doença em modelo animal suscetível, demonstrando que

os LPS tem um papel importante na patogênese dessas bactérias (LAMBERT et al., 2012; LIAO et al., 2009; MURRAY et al., 2009). Estes atuam ativando os receptores do tipo Toll (TLR), sendo relatada a ativação do TLR2 em células humanas e TLR2 e TLR4 em células de camundongos (WERTS et al., 2001; YANG et al., 2006).

Os peptidoglicanos oferecem firmeza, flexibilidade e força que são indispensáveis para a divisão celular e o crescimento bacteriano, além de atuarem na capacidade de suportar a pressão osmótica interna alta. Eles atuam induzindo a liberação de fator alfa de necrose tumoral (TNF- α) de monócitos através de um mecanismo independente dos efeitos endotóxicos (BHATTACHARJEE et al., 2013; CINCO et al., 1996). Já as lipoproteínas são componentes fundamentais das membranas de eubactérias, e podem estar implicadas na lesão endotelial, com provável atividade de hemolisinas (HAAKE, 2000; LEE et al., 2000; MERI, MURGIA, STEFANEL, MERI & CINCO, 2005). A hemólise apresenta vantagens para a bactéria, disponibilizando ferro e ácidos graxos que são essenciais para o seu crescimento (LOUVEL et al., 2006). Proteínas de membrana externa (OMP) e glicoproteínas também estão envolvidas no estímulo da resposta celular (DIAMENT et al., 2002; H.L. YANG et al., 2006).

Outro mecanismo que pode ser relatado é o de adesão. Estudos mostram uma correlação entre adesão e virulência, quando comparadas leptospiros atenuadas com virulentas, estas últimas aderem em maior número à fibronectina, colágeno e laminina (BREINER et al., 2009; DOLHNIKOFF et al., 2007). Algumas proteínas relacionadas a adesão já foram descritas como, por exemplo, as chamadas Ligs (MATSUNAGA et al., 2003). A expressão de LigA e LigB é aumentada quando as espécies patogênicas de leptospiros são expostas às concentrações de cloreto de sódio semelhantes aquelas encontradas no tecido dos hospedeiros, indicando um importante papel na patogênese da leptospirose e estando possivelmente envolvidas na colonização dos tecidos servindo como adesinas (CHOY et al., 2007; MATSUNAGA et al., 2005).

2.5 Manifestações clínicas

A apresentação clínica da doença é bifásica, caracterizada por uma fase aguda ou septicêmica na primeira semana da infecção, seguida pela fase imune, caracterizada

pela disseminação das bactérias para os órgãos-alvo, produção de anticorpos e excreção das leptospiros na urina (KO et al., 2009; LEVETT, 2001). Os sintomas podem variar desde formas subclínicas ou leves até formas mais graves ou fatais com complicações multissistêmicas (GANCHEVA, 2013). Essas manifestações dependem de fatores como a dose infectante, a imunidade do hospedeiro e o sorovar em questão (LEVETT, 2001).

Inicialmente, os sintomas são pouco específicos e apresentam pouca variação clínica, tendo aspecto semelhante na maioria dos pacientes. Estes caracterizam-se por febre, mialgia, calafrios e cefaleia. À medida que o curso clínico progride, pode evoluir para um quadro de disfunção renal, fenômenos hemorrágicos e alterações hemodinâmicas, pulmonares, cardíacas e de consciência, com taxas de letalidade entre 10% e 40%, sendo a hemorragia pulmonar a manifestação mais grave, e muitas vezes letal, caracterizada por tosse, dispneia e hemoptise (MCBRIDE et al., 2005; RICALDI & VINETZ, 2006; VINETZ, 2001; WHO, 2003).

Em animais de produção, a leptospirose pode resultar em distúrbios reprodutivos como a retenção da placenta, os abortos e os natimortos; em alterações congênitas; ou em infecções inaparentes capazes de levá-los à subfertilidade, causando perdas produtivas e reprodutivas no animal, resultando em significativas perdas no setor agropecuário (ADLER & DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; FAINE, 1999; LILENBAUM & DOS SANTOS, 1995).

2.6 Imunidade e vacinas

O sistema imune inato constitui a primeira linha de defesa do hospedeiro, desempenhando um papel crucial no reconhecimento precoce e na eliminação de bactérias do organismo. A ativação da via alternativa do sistema complemento é um dos mecanismos mais importantes efetores durante as primeiras horas depois da infecção (BARBOSA et al., 2009; MERI et al., 2005). Uma ilustração clara deste fato é a observado quando saprófitas *L. biflexa* são mortas dentro de alguns minutos na presença de soro humano normal *in vitro*. No entanto, as espécies patogênicas de *Leptospira* são capazes de sobreviver e são mais resistentes à ação do sistema de complemento, principalmente, quando são virulentas (FRAGA et al., 2011; MERI et al., 2005).

O termo patogênicas refere-se a propriedades genótípicas dessas leptospiros que podem ser expressos ou não, enquanto que, o termo virulentas refere-se a características fenotípicas que caracterizam alterações patológicas que podem afetar o hospedeiro (FRAGA et al., 2011). Por exemplo, as *L. interrogans* causam a doença em humanos quando expressam seus mecanismos de virulência, o que pode ser perdido em uma extensão variável em cultura, tornando-se assim relativamente não virulentas, entretanto, continuam classificadas como patogênicas. Por outro lado, as *L. biflexa* não causam a doença em nenhum hospedeiro conhecido, recebendo assim a classificação de saprófitas. A propriedade de virulência pode ser restabelecida por meio de passagem através de um sistema hospedeiro adequado (FAINE et al., 1999).

Como as leptospiros são patógenos extracelulares, a resposta imune adquirida depende da produção de anticorpos e da ativação da via clássica do sistema do complemento (FRAGA et al., 2013). As leptospiros são inicialmente detectadas pelo sistema imune do hospedeiro através dos padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) e a maioria dos anticorpos específicos produzidos são contra os LPS (FRAGA et al., 2011; MOGENSEN, 2009). Como consequência, a imunização passiva com anticorpos anti-LPS monoclonais ou policlonais é capaz de conferir proteção contra a doença (JOST et al., 1986). Em muitos modelos experimentais, tornou-se evidente que a fagocitose da *Leptospira* por neutrófilos e macrófagos só é eficaz se este patógeno é opsonizado por IgG específico. Além da opsonização, estes anticorpos podem aglutinar a *Leptospira* e ativar a via clássica do sistema do complemento. Opsoninas como iC3b gerados após a ativação do complemento também podem ser importantes para aumentar a fagocitose (BANFI et al., 1982; CINCO et al., 2002; WANG, SULLIVAN, & MANDELL, 1984).

A imunidade humoral mediada ainda permanece pouco compreendida, mas é de extrema importância para conferir proteção contra a leptospirose em humanos, cães, suínos, cobaias e hamsters (ADLER & DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; FAINE et al., 1999). Atualmente, as vacinas disponíveis são constituídas de células inteiras inativadas ou preparados da membrana de leptospiros patogênicas, as quais induzem imunidade sorovar específica, não proporcionando proteção cruzada contra os diferentes sorovares

que podem causar a doença. Além disso, não geram resposta dependente de células T, sendo necessários reforços anuais (DELLAGOSTIN et al., 2011; FAINE et al., 1999). Essas vacinas também apresentam outras limitações como imunidade baixa e pouco duradoura (6 a 12 meses) e reações adversas (DELLAGOSTIN et al., 2011; ZUERNER et al., 2011)

Diante dessas limitações, o desenvolvimento de uma vacina multi-sorovar, que gere proteção cruzada contra os diferentes sorovares de *Leptospira* ainda representa um grande desafio (DELLAGOSTIN, 2011). Por isso diversos estudos tem focado no desenvolvimento de vacinas recombinantes contra leptospirose e proteínas de membrana externa são apontadas como potenciais alvos vacinais, devido a sua localização na superfície da célula e a sua participação na interação com o hospedeiro (DELLAGOSTIN et al., 2011; HAAKE & MATSUNAGA, 2011).

A lipoproteína de membrana externa LipL32, a proteína mais abundante na bactéria, já foi apresentada ao sistema imune via diferentes tipos de vacinas, porém todas as estratégias apresentaram baixa eficácia. As proteínas LipL41 e OmpL1 demonstraram proteção parcial quando co-administradas em hamsters (HAAKE, et al., 2000; GRASSMANN et al., 2012). O potencial imunoprotetor de formulações vacinais com as proteínas Ligs combinadas a diferentes adjuvantes também já foi avaliado, apresentando os resultados mais promissores encontrados até então, e formulações recombinantes de duas OMPs, LIC10494 e LIC12730, protegeram parcialmente hamsters contra o desafio e melhoraram significativamente a sobrevivência nestes animais quando imunizados. A maioria dos animais sobreviventes (80-100%) foram positivos para a presença de leptospira (DELLAGOSTIN, et al., 2011).

Vacinas de subunidade são um tipo de vacina recombinante que serve como uma possível alternativa para o controle da leptospirose, pois são licenciadas pelos órgãos de regulamentação competentes e tem o potencial de conferir proteção sem o risco de causar a doença. Diversos antígenos leptospirais, até então considerados os mais promissores para compor uma vacina como a LipL32, a LipL41, a LigA, a LigB e a Loa22, já foram testados através de diferentes estratégias e combinados com diferentes adjuvantes, entretanto, nenhum destes antígenos conferiu proteção total,

estatisticamente significativa e esterilizante (DELLAGOSTIN et al., 2011; WANG et al., 2007). Assim, novas estratégias para a obtenção e produção de antígenos, bem como diferentes formas de apresentação desses antígenos ao sistema imune tem sido exploradas.

2.7 Controle, diagnóstico e tratamento

O controle da doença consiste basicamente na implementação de medidas como investimentos no setor de saneamento básico com melhoria das condições higiênico sanitárias da população; controle de animais reservatórios com consequente interrupção da sua transmissão; e educação ambiental (WHO, 2003). Além disso, estratégias que utilizam vacinas compostas da célula inteira morta de leptospiras, chamadas de bacterinas, são usadas na tentativa de reduzir a prevalência de animais soropositivos e servem como uma importante medida preventiva (DELLAGOSTIN et al., 2011; FAINE et al., 1999).

O diagnóstico é baseado no histórico, contexto epidemiológico e exame físico do paciente e confirmado por exames laboratoriais complementares, através de testes sorológicos, moleculares e bacteriológicos devido as variadas e inespecíficas formas de apresentação dos sintomas e a inexistência de lesões patognomônicas (FAINE et al., 1999; WHO, 2003). Os testes de diagnóstico podem ser diretos ou indiretos e destinados a detectar anticorpos, DNA ou microrganismo em tecidos e fluidos corporais (GROOMS & BOLIN, 2005). O teste sorológico mais utilizado na rotina clínica e indicado como teste de referência pela Organização Mundial de Saúde é o de reação de soroaglutinação microscópica (MAT) (WHO, 2003). A base diagnóstica do MAT é formada pela reação de aglutinação entre os anticorpos presentes no soro dos pacientes e o antígeno-O dos LPS de membrana de vários sorovares de *Leptospira* (MCBRIDE et al., 2005; OOTEMAN, VAGO & KOURY, 2006;).

Outras técnicas mais comumente utilizadas no diagnóstico laboratorial podem ser citadas: (I) o ELISA, que é baseado na interação antígeno/anticorpo geralmente utilizado para detectar anticorpos da classe IgM; (II) a reação em cadeia da polimerase (PCR), que baseia-se na detecção e amplificação do DNA de *Leptospira* de diversos tecidos ou

fluidos corpóreos; e (III) o isolamento da bactéria, que consiste no cultivo das leptospiras em meios de cultura (BOMFIM, BARBOSA-STANCIOLI & KOURY, 2008; MCBRIDE et al., 2007; OOTEMAN et al., 2006).

O tratamento preconizado da leptospirose é baseado na administração de antibióticos e outros medicamentos quando necessário diante de possíveis complicações do quadro clínico (WHO, 2003). Os antibióticos utilizados são a penicilina, ampicilina, amoxicilina, oxitetraciclina, doxiciclina e diidroestreptomicina, sendo este último o mais recomendado por sua comprovada eficácia na proteção de indivíduos expostos e pela eliminação do estado portador (LEVETT, 2001). Leptospiras são sensíveis a um grande espectro de antimicrobianos *in vitro*, porém, pouco se tem sido avaliado em triagens clínicas *in vivo* (BHARTI et al., 2003; WHO, 2003).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Obter e caracterizar os antígenos vacinais, *lic11207* e *lic20087*, para o desenvolvimento de uma vacina recombinante.

3.2 Objetivos específicos

Selecionar sequências codificadoras para proteínas hipotéticas de *Leptospira*, a partir da sequência depositada em banco de dados (GenBank);

Amplificar e clonar estes genes que codificam proteínas hipotéticas de *Leptospira* patogênica;

Expressar no sistema de expressão heteróloga em *E. coli* e purificar as proteínas selecionadas;

Avaliar a imunogenicidade da preparação vacinal em hamsters;

Testar a eficiência da preparação vacinal selecionada em hamsters, através de teste de desafio com cepa homóloga;

4. METODOLOGIA

4.1 Cepas, condições de cultivo e extração de DNA

As cepas de *Leptospira* que foram utilizadas neste estudo foram *L. interrogans* sorovar *Copenhageni* cepa Fiocruz L1-130 e *L. borgpetersenii* sorovar Ballum cepa 4E. As leptospiras foram crescidas em meio EMJH (Difco) enriquecido com 10% de suplemento comercial (Difco) e mantidas a 29 °C. Foram realizados repiques semanais de cada cultura, acompanhados de contagem de células bacterianas em câmara de Petroff-Hausser, sendo que 10^8 células de cada cepa foram centrifugadas e utilizadas para extração de DNA genômico utilizando o kit comercial *illustra™ bacteria genomicPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare). A cepa *E. coli* utilizada para clonagem foi *E. coli* TOP10 (Invitrogen) e expressão foi *E. coli* BL21 Star DE3 (Invitrogen). Estas cepas foram cultivadas a 37 °C em meio Luria-Bertani (LB) sob agitação de 200 rpm ou acrescido de 1,5% de ágar e, quando necessário, suplementado com 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina.

4.2 Escolha das LICs e desenho dos *primers*

A partir da sequência genômica de *L. interrogans Copenhageni* L1-130, disponível no banco de dados GenBank (NCBI) foram selecionadas 2 sequências codificadoras. As sequências foram escolhidas a partir de informações sobre as proteínas correspondentes, obtidas em análises no banco de dados *UniProt Knowledge Base* (UniProtKB), buscando por requisitos desejáveis como hipotéticas proteínas de membrana externa expostas na superfície ou prováveis lipoproteínas. Uma vez escolhidas as sequências, foram desenhados *primers* com o auxílio do *software* Vector NTI 11 (Invitrogen). Cada *primer* adicionou a uma extremidade da sequência alvo um sítio para enzima de restrição que permitiu a clonagem no vetor pAE de expressão em *E. coli*. Para isso foram utilizados os seguintes *primers* para os genes *lic20087* e *lic11207* Forward 5' CGGGATCCGAAAATCCTTCGTTTCAGTT 3' e Reverse 5' GGGAAGCTTTTACTTAGAAGAAGTTTCCGAAAA 3' e Forward 5' CGGGATCCAATGAAGGAGGAAATGAAAAT 3' e Reverse 5' GGGAAGCTTTTAGTTACAAGCTCCCGAAGC 3', respectivamente. Ambos os *primers* possuem sítio para as enzimas de restrição *BamHI* e *HindIII*.

4.3 Análise da presença dos genes *lic110207* e *lic20087* em *Leptospira* spp.

A presença dos genes *lic11207* e *lic20087* entre *Leptospira* foi analisada através de PCR usando como molde o DNA genômico dos 18 sorovares seguintes: *L. interrogans* sorovares *Pomona*, *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae*, *Autumnalis*, *Bataviae*, *Bratislava*, *Djasiman*, *Hebdomadis* e *Muenchen*; *L. borgpetersenii* sorovares *Ballum*, *Castellonis*, *Mini*, *Poi*, *Sejroe* e *Javanica*; *L. kirshneri* sorovares *Grippotyphosa* e *Cynopteri* e *L. santarosai* sorogrupo *Pomona*. Os primers e parâmetros utilizados foram os mesmos descritos anteriormente para amplificação inicial dos genes selecionados. A integridade do DNA genômico foi avaliada através da amplificação do gene 16S rDNA. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%.

4.4 Amplificação e clonagem de *lic11207* e *lic20087* em vetor pAE

A amplificação das sequências alvos selecionadas foi realizada através da técnica de PCR utilizando a enzima *Taq* DNA Polimerase (*GoTaq* *Coloress Master Mix - ProMega*), num volume final de 25 µL de reação. As reações de PCR foram realizadas usando 30 ciclos de desnaturação (95 °C), anelamento (55 °C) e extensão (72 °C). Os produtos da reação de PCR foram purificados com kit comercial *illustra™ GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare), analisados e visualizados por eletroforese em gel de agarose 1%. Em seguida o vetor de expressão em *E. coli* e o inserto resultante do produto do PCR foram digeridos com as enzimas de restrição *BamHI* e *HindIII*, à 37 °C durante 2 h. O produto de cada digestão foi purificado com o mesmo kit comercial citado acima. A reação de ligação do inserto ao vetor pAE foi realizada com a enzima *T4 DNA ligase* (Invitrogen) à 4 °C, *overnight*. A eficiência dessas reações foi visualizada através de eletroforese em gel de agarose 1%.

4.5 Transformação de *E. coli* por eletroporação e extração dos vetores recombinantes

Em 80 µL de células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10 foram colocados 1 µL dos produtos das reações de ligação para o processo de eletroporação (25 µF de capacitância, 200 ohms de resistência e 2.5 kV). Após a transformação, as células foram cultivadas em placa de LB sólido suplementado com 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina.

Os clones recombinantes para o plasmídeo pAE/*lic11027* e pAE/*lic20087* foram cultivados e expandidos em meio LB suplementado com 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina. A partir deste cultivo, foi realizada uma extração de DNA plasmideal com o *kit* comercial *GFX Micro Plasmid Prep Kit* (GE Healthcare) e o plasmídeo foi purificado com o *kit illustra™ plasmidPrep Mini Spin kit* (GE Healthcare). Em seguida foram submetidos a confirmação da presença de inserto por PCR com os mesmos *primers* utilizados na primeira amplificação e digestão com enzimas de restrição. O resultado das extrações foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1%. Os plasmídeos extraídos foram quantificados por espectrofotometria utilizando absorbância no comprimento de onda de 260 nm, e a pureza avaliada pela razão entre as absorbâncias obtidas em 260 nm e 280 nm.

4.6 Expressão heteróloga dos genes *lic11207* e *lic20087*

Os vetores recombinantes pAE/*lic110207* e pAE/*lic20087* foram utilizados para transformar a cepa de expressão *E. coli* BL21 Star (DE3) por choque térmico. Após transformadas, as células foram crescidas em 25 mL de LB líquido contendo 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina e cultivadas *overnight*. Estas culturas foram utilizadas como inóculo em 500 mL do mesmo meio com 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina, que foi incubado à 37 °C até a fase log de crescimento (densidade óptica a 600 nm entre 0,6 e 0,8), quando então a expressão dos genes *lic110207* e *lic20087* foram induzidas com 1 mM de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo). Após 3 h, as culturas foram fracionadas em tubos de 250 mL, centrifugadas a 6.000 × *g* por 15 min à 4° C, e os *pellets* foram armazenados à – 20 °C.

4.7 Purificação de rLIC11207 e rLIC20087

Os *pellets* foram solubilizados em tampão contendo 100 mM de Tris-base, 300 mM de NaCl, 8 M de ureia e 5 mM de Imidazol (pH 8,0) e as células rompidas por sonicação. Após centrifugação à 10.000 × *g* por 30 min, 4 °C, o sobrenadante foi filtrado e as proteínas foram purificadas através de cromatografia de afinidade em coluna de sefarose carregada com níquel. As alíquotas de rLIC11207 e rLIC20087 foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% para visualização da pureza das mesmas e, posteriormente, dialisadas à 4 °C contra tampão contendo 100 mM de

Tris-base e 300 mM de NaCl em concentrações decrescentes de ureia. Por fim, a proteína foi dialisada contra tampão fosfato-salino (PBS) (pH 7,2) *overnight* à 4 °C e armazenada à - 20 °C. A proteína foi quantificada pelo *kit BCA Protein Assay* (Thermo Scientific Pierce), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

4.8 Antigenicidade e caracterização das proteínas recombinantes LIC11207 e LIC20087

As proteínas purificadas foram submetidas a técnica de *Western blot* para caracterizar a antigenicidade das proteínas obtidas. Primeiramente foi realizado o SDS-PAGE 12% seguido de *Western blot* com anticorpo monoclonal (MAb) anti-6xHis (Sigma), utilizando como controle positivo da reação a proteína recombinante rLipL32 e como controle negativo albumina sérica bovina (BSA). As proteínas foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose *Hybond ECL* (Amersham Biosciences) durante 1,5 h à 150 V. As membranas foram bloqueadas com leite em pó 5%, *overnight* à 4 °C, seguido de 3 lavagens com PBS + 0,05% de *Tween 20* (PBS-T). Posteriormente, as membranas foram incubadas durante 1 h à temperatura ambiente com MAb anti-6xHis numa diluição de 1:6000. Após 3 lavagens com PBS-T, foram adicionados o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma) na diluição de 1:6000 (contra MAb anti-6xHis). Após 3 lavagens com PBS-T, as reações foram reveladas com diaminobenzidina (DAB) e H₂O₂.

4.9 Animais e coleta de amostras

Hamsters fêmeas (*Mesocricetus auratus*) foram utilizadas como modelo animal para os experimentos de desafio e avaliação da resposta imune. Todos os animais foram mantidos em microisoladores com as dimensões de 49 × 34 × 16 cm, e alojados em estantes ventiladas climatizadas durante todos os experimentos, para a manutenção dos parâmetros fisiológicos dos animais. O fornecimento de água e ração foi *ad libitum* e as trocas das caixas com as camas de maravalha foram realizadas três vezes por semana. O experimento contou com o número total de 36 animais, divididos em seis grupos, que durante todo o experimento de desafio tiveram seu peso corporal monitorado diariamente após o mesmo. Amostras de sangue de cerca de 500 uL foram coletadas através de punção do plexo venoso retro-ocular nos dias 0, 14 e 28, sendo o soro processado e congelado a 20°C. Todos os procedimentos foram realizados conforme as

recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) para o bem estar dos animais de laboratório e projeto foi aprovado Conselho Coordenador do Ensino, da Pesquisa e da Extensão (COCEPE).

4.10 Imunizações e teste de desafio

Foi realizado um experimento de desafio homólogo apenas para a proteína rLIC11207, contando com 6 animais por grupo divididos em: (I) grupo controle PBS; (II) grupo controle PBS + adjuvante alumínio; (III) grupo controle PBS + adjuvante oleoso; (IV) grupo proteína + adjuvante alumínio; (V) grupo proteína + adjuvante oleoso; e (VI) grupo bacterina. As vacinas foram administradas em duas doses com volume total de 300 µL cada, a serem administradas no músculo quadríceps nos dias 0 e 14. As vacinas foram administradas em duas doses de 100 µg de proteína recombinante, em um volume de 300 µL com intervalo de 14 dias entre as inoculações. Os adjuvantes oleoso e hidróxido de alumínio foram utilizados para este estudo, sendo o alumínio aplicado via intramuscular e o oleoso via subcutânea. No 28º dia de experimento os animais foram desafiados com 10^3 da cepa homóloga *L. borgpeterseni* 4E. A eficácia da vacina foi determinada pelo número de animais sobreviventes ao desafio, quando comparado ao grupo controle (apenas adjuvante), seguindo parâmetros e metodologias já estabelecidas (SILVA et al., 2007).

4.11 Avaliação da resposta imune humoral

O título de anticorpos sistêmicos foi determinado através de ELISA indireto com o soro dos hamsters de cada grupo, utilizando como antígeno a proteína recombinante purificada rLIC11207. As placas foram sensibilizadas com 50 ng de proteína por poço à 4°C *over night*. Posteriormente, as placas foram bloqueadas com leite em pó 5% à 37°C por 1h. Após, foram utilizados soros diluídos com PBS-T nas concentrações de 1:100 nos animais inoculados pela proteína combinada com o adjuvante oleoso e 1:1000 para o grupo da proteína combinada com o adjuvante alumínio. O anticorpo secundário anti-hamster foi utilizado na concentração de 1:6000 e incubado à 37°C por 1h. Todas as etapas foram intercaladas por 3 lavagens com PBS-T. A revelação foi feita com orto-fenilenoldiamina por 15 minutos. A reação foi interrompida com a solução de parada

contendo ácido sulfúrico 4N e a leitura dos resultados foi feita com leitor de ELISA à 492nm. Por fim, as análises dos dados foram realizadas via Excel.

5. RESULTADOS

5.1 Análise *in silico*, amplificação dos genes e clonagem no vetor pAE

Dois genes foram identificados e selecionados para expressão de proteínas recombinantes em sistema de expressão heteróloga em *E. coli*, as *lic11207* e *lic20087*. O primeiro codifica para uma lipoproteína e o segundo codifica para uma proteína de membrana externa. Ambos os genes foram eficientemente amplificados por PCR, gerando fragmentos de aproximadamente 1015 pb para a *lic11207* e 918 pb para a *lic20087* (Fig. 1).

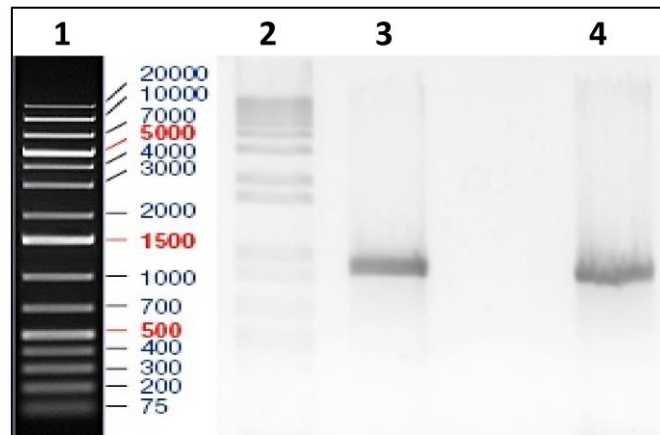


Figura 1 - Amplificação dos genes *lic11207* e *lic20087* por PCR. (1) Foto do marcador de peso molecular *1kb plus DNA ladder* (Invitrogen) com o tamanho respectivo das bandas, disponibilizado pelo fabricante; (2) marcador de peso molecular *1kb plus DNA ladder* (Invitrogen) aplicado no gel; (3) amplificação da *lic11207* para clonagem no vetor pAE; (4) amplificação da *lic20087* para clonagem no vetor pAE.

O processo de clonagem resultou nos vetores recombinantes pAE/*lic20087* e pAE/*lic11207* (Fig. 2).

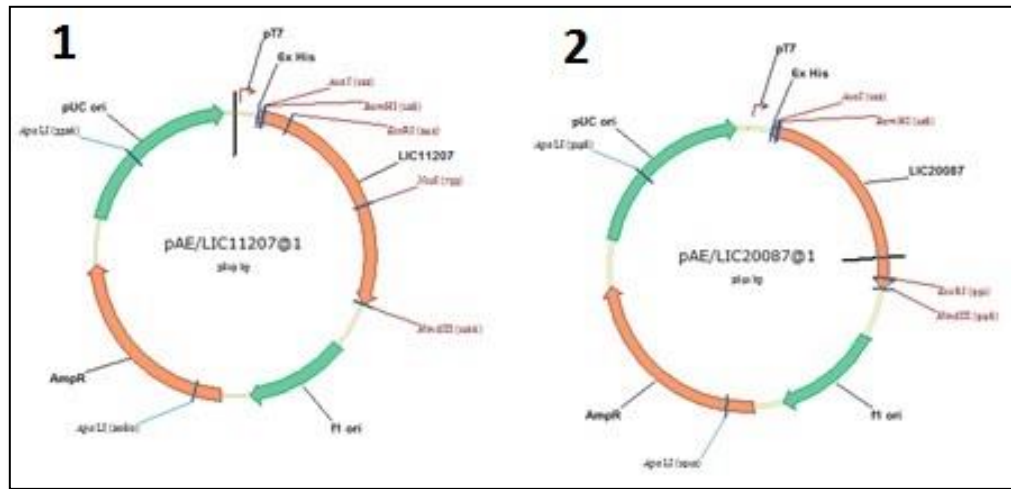


Figura 2 - Os vetores de expressão recombinantes obtidos no software Vector NTI 11. (1) Obtenção do vetor recombinante pAE/lic11207; (2) obtenção do vetor recombinante pAE/lic20087.

5.2 Análise da presença dos genes *lic11207* e *lic20087* em *Leptospira* spp.

Ambos os genes foram amplificados a partir de todos os 18 sorovares de leptospiros patogênicos testados, *lic11207* (Fig. 3A) e *lic20087* (Fig. 3B). Este resultado fornece evidências de que rLIC11207 e rLIC20087 são proteínas conservadas em um grande número de sorovares patogênicos. A amplificação do gene 16s rDNA confirmou a integridade do DNA utilizado na técnica de PCR (dados não mostrados). A análise relacionada às espécies saprófitas foi realizada *in silico* e não apresentou homologia aos genes estudados (dados não mostrados).

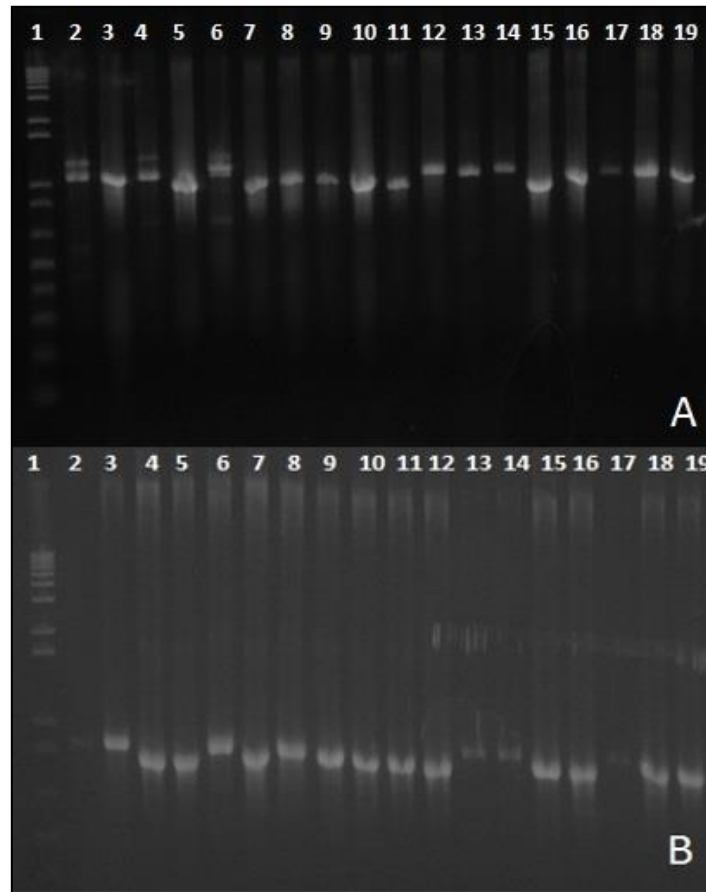


Figura 3 - Análise da presença da *lic11207* e da *lic20087* em *Leptospira*. A) amplificação do gene *lic11207*. B) amplificação do gene *lic20087*. (1) Marcador de peso molecular *1kb plus DNA ladder* (Invitrogen). (3) *L. interrogans* sorovares *Pomona*, (7) *Canicola*, (12) *Icterohaemorrhagiae*, (14) *Autumnalis*, (15) *Bataviae*, (16) *Bratislava*, (17) *Djasiman*, (18) *Hebdomadis* e (19) *Muenchen*; (13) *L. borgpetersenii* sorovares *Ballum*, (9) *Castellonis*, (10) *Mini*, (11) *Poi*, (5) *Sejroe* e (2) *Javanica*; (4) *L. kirshneri* sorovares *Grippityphosa*; (6) *Cynopteri* e (8) *L. santarosai* sorogrupo *Pomona*.

5.3 Caracterização e extração dos vetores recombinantes

Identificou-se, através de uma triagem, clones recombinantes para ambos os vetores recombinantes, através da visualização em gel de agarose de um padrão de banda de peso molecular maior que a do vetor pAE sem inserto, indicando a presença da *lic11207* e da *lic20087* nessas construções, sendo que estas foram confirmadas através da técnica de PCR (dados não mostrados), condizente com o tamanho do inserto.

A digestão enzimática também foi realizada com o objetivo de confirmar a presença do inserto *lic11207* e *lic20087* no vetor pAE. Dos possíveis clones recombinantes obtidos para pAE/*lic11207*, dois tiveram o DNA plasmideal digerido com a

enzima *Xba*I e pAE/*lic20087* resultou em três, sendo que a caracterização dos vetores pela digestão com esta enzima de restrição *Xba*I resultou em um padrão de fragmentação condizente ao esperado: 2814pb e 1005pb para pAE/*lic11207* e 3219pb e 432pb para pAE/*lic2008* (Fig. 4).

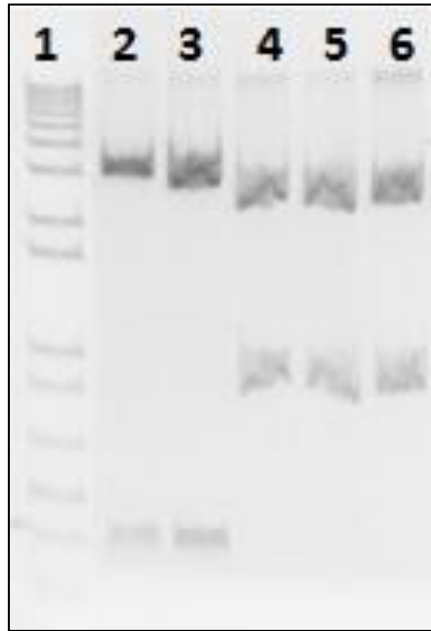


Figura 4 - Caracterização dos vetores recombinantes pela digestão com a enzima de restrição *Xba*I. (1) Marcador de peso molecular e 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); (2-3) clones de pAE/*lic11207*; (4-6) clones de pAE/*lic20087*.

5.4 Obtenção das proteínas recombinantes LIC11207 e LIC20087

As proteínas foram eficientemente expressas em *E. coli* Star e apresentaram tamanho esperado de 37,6 kDa para rLIC11207 e 34 kDa para rLIC20087 (Fig. 5). A purificação resultou em alíquotas de proteínas com alto grau de pureza e um rendimento de aproximadamente 10 mg.mL⁻¹ de cultura. Após purificação, a proteína foi dialisada contra tampão Tris-NaCl, concentrada em polietilenoglicol (PEG) e estocada à -20°C.

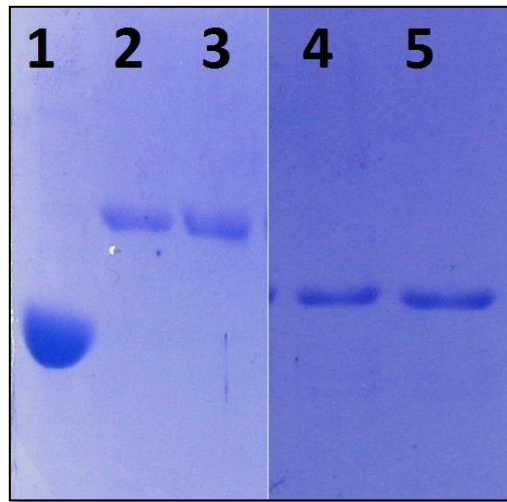


Figura 5 - Purificação das proteínas rLIC11207 e rLIC20087 através de cromatografia de afinidade em coluna de sefarose carregada com níquel. (1) rLipL32 (32 kDa) usada como controle positivo de tamanho conhecido; (2-3) rLIC11207 purificada com ureia; (4-5) rLIC2008 purificada com ureia.

5.5 Caracterização da proteínas recombinantes LIC11207 e LIC20087 por *Western blot*

Ambas as proteínas rLIC11207 e rLIC20087 foram caracterizadas mediante WB com anticorpo monoclonal (Mab) anti-6xHis. Em ambos os resultados, as proteínas foram reconhecidas no tamanho esperado de 37,6 kDa para rLIC11207 e 34 kDa para rLIC20087 (Fig. 6). A reação com a proteína rLIC11207 reconheceu algumas bandas abaixo da banda correspondente à proteína recombinante. Estas bandas não foram identificadas no extrato celular total de *E. coli* Star, sugerindo que são isoformas da proteína ou proteína degradada.

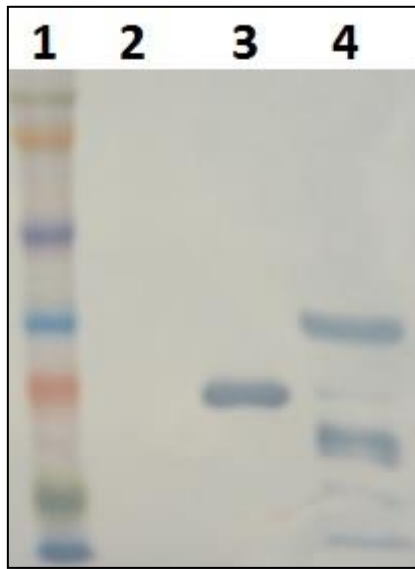


Figura 6 - Western blot mostrando as proteínas recombinantes rLIC20087 e rLIC11207. (1) Marcador de peso molecular pré-corado; (2) extrato total de *E. coli* Star; (3) rLIC20087 (34 kDa); (4) rLIC11207 (37,6 kDa).

5.6 Avaliação da resposta imune humoral

A quantificação de anticorpos IgG anti-rLIC11207 no soro dos animais vacinados feita através de ELISA indireto demonstrou que todos os grupos inoculados com rLIC11207 produziram anticorpos anti-rLIC11207, demonstrando que a vacina recombinante foi imunogênica para os hamsters. Os grupos controles não estimularam a produção de anticorpos IgG anti-rLIC11207. Uma dose de rLIC11207 foi capaz de induzir a produção de anticorpos anti-rLIC11207 e para ambos os grupos, rLIC11207 combinado com adjuvante oleoso (Fig. 7) ou rLIC11207 combinado com adjuvante alumínio (Fig. 8), apresentaram um aumento no nível de anticorpos após a segunda dose vacinal.

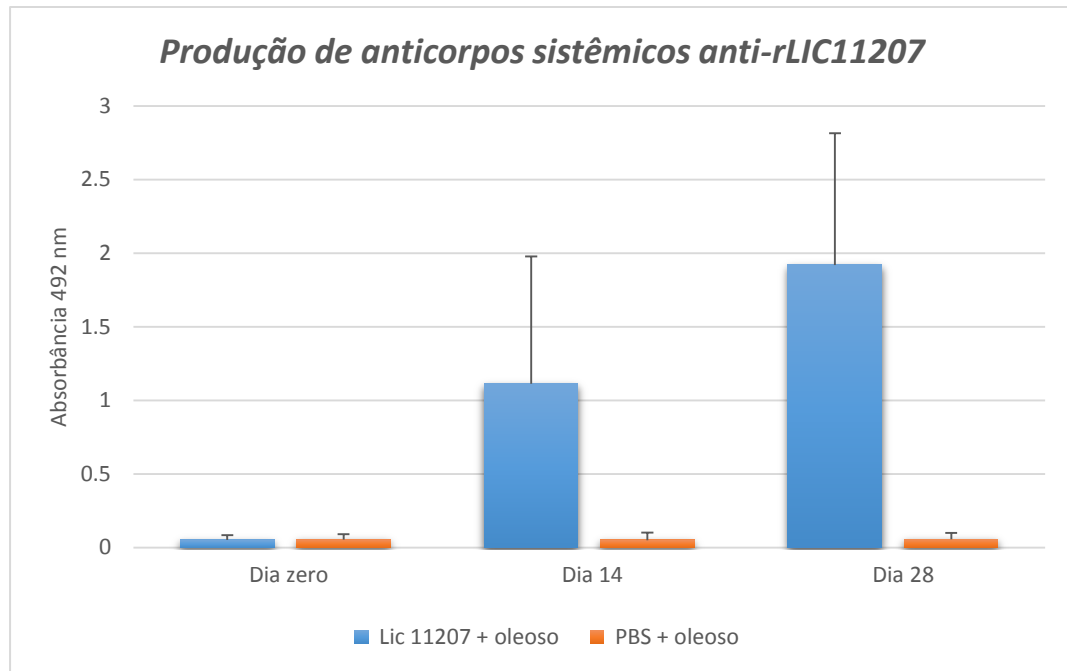


Figura 7 - Produção de anticorpos sistêmicos anti-rLIC11207 determinados através de ELISA dos grupos LIC11207 + adjuvante oleoso e PBS + adjuvante oleoso. (1) Absorbância dos animais no dia zero; (2) absorbância dos animais após primeira dose vacinal no 14º dia; (3) absorbância dos animais após segunda dose vacinal no 28º dia.

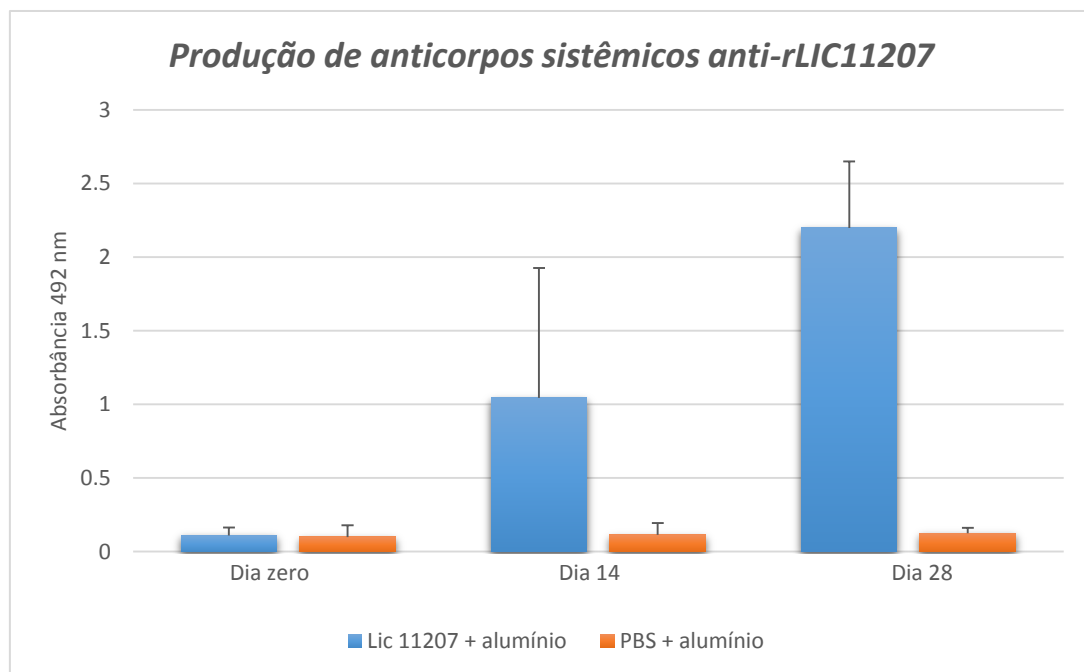


Figura 8 - Produção de anticorpos sistêmicos anti-rLIC11207 determinados através de ELISA dos grupos LIC11207 + adjuvante alumínio e PBS + adjuvante alumínio. (1) Absorbância dos animais no dia zero; (2) absorbância dos animais após primeira dose vacinal no 14º dia; (3) absorbância dos animais após segunda dose vacinal no 28º dia.

5.7 Teste de desafio

A eficácia da vacina não pode ser determinada, pois 100% dos animais, tanto dos grupos vacinados quanto dos grupos controle sobreviveram, sugerindo que a dose infectante não foi suficiente para desencadear a doença nos animais ou, possivelmente, a cepa utilizada não estava virulenta (Tabela 1). A pesagem demonstrou aumento no peso dos animais no decorrer dos dias, sugerindo que os animais se mantiveram saudáveis e não foram acometidos pela doença (dados não mostrados). Os animais foram eutanasiados conforme Resolução nº 1000 do Conselho Regional de Medicina Veterinária do ano de 2012.

Tabela 1 – Resultados da proteção conferida pelos grupos vacinais.

GRUPOS VACINAIS	Nº SOBREVIVENTES	% SOBREVIVENTES
RLIC11207 + OLEOSO	6	100%
RLIC11207 + ALUMÍNIO	6	100%
PBS + OLEOSO	6	100%
PBS + ALUMÍNIO	6	100%
BACTERINA	6	100%
PBS	6	100%

6. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de potenciais vacinas contra leptospirose, que sejam seguras e capazes de gerar proteção cruzada contra diferentes sorovares da bactéria, ainda representa um grande desafio (MCBRIDE et al., 2005). Proteínas de membrana externa e lipoproteínas expostas à superfície celular são apontadas como potenciais alvos vacinais, devido a sua localização na superfície da célula e a sua participação na interação com o hospedeiro (DELLAGOSTIN et al., 2011; HAAKE, 2000). O presente estudo objetivou a construção e a caracterização de duas vacinas recombinantes contra a leptospirose utilizando os antígenos rLIC11207 e rLIC20087.

Vários problemas confrontam o desenvolvimento de uma vacina para prevenir a leptospirose. As bacterinas apresentam imunidade baixa e pouco duradoura, são sorovares específicas e, atualmente, ainda não há conhecimento suficiente dos mecanismos protetores contra infecção de leptospirose (PETERSEN et al., 2001). Este estudo objetivou a busca de candidatos vacinais capazes de conferir proteção de amplo espectro e a presença dos genes *lic11207* e *lic20087* nos 18 sorovares diferentes de leptospirosas patogênicas demonstra que estes, além de conservados, são antígenos potenciais para a produção de uma vacina multi-sorovar contra a leptospirose e, possivelmente, são expressos na maioria das espécies patogênicas, o que viria a proporcionar proteção cruzada.

Esforços para a identificação de componentes imunogênicos com potencial para o desenvolvimento de vacinas recombinantes vem sendo avaliados (MATSUNAGA et al., 2003), e as análises *in silico* realizadas neste trabalho apontaram para genes que parecem codificar uma provável lipoproteína (LIC11207) e uma provável proteína de membrana externa (LIC20087), sugerindo que estas proteínas recombinantes podem induzir a produção de anticorpos que as reconheçam na sua forma nativa devido a vantagem das suas localizações.

A clonagem e expressão de proteínas heterólogas em microrganismos diversos possibilitou a substituição de purificações trabalhosas e de baixo rendimento pela obtenção de elevadas quantidades de proteínas de interesse biotecnológico a um custo

muito mais baixo (HOCKNEY, 1994). Vantagens como ter as características genéticas bem conhecidas e as proteínas expressas reterem sua atividade completa, fazem do microrganismo *E. coli* um sistema de expressão importante para a produção de proteínas recombinantes (MAKRIDES, 1996). Uma variedade de antígenos vacinais já foi introduzida e expressada em *E. coli*, apresentando uma variabilidade de resultados quanto a sua eficácia na proteção contra o desafio. Esta variabilidade pode ser devido as particularidades do antígeno, à via de imunização utilizada ou ao método de apresentação do antígeno (JIMENEZ-DELGADILLO et al., 2004; FIORENTINI et al., 2004; MCARTHUR et al., 2004). Neste trabalho, a utilização deste sistema de expressão se mostrou eficiente e as proteínas recombinantes rLIC11207 e rLIC20087 foram eficientemente expressas.

O WB realizado com anticorpo anti-6xHis identificou as proteínas recombinantes purificadas no tamanho esperado, 34 kDa para rLIC20087 e 37,6 kDa para rLIC11207 demonstrando que as proteínas foram eficientemente purificadas. Porém, durante as preparações vacinais, a proteína rLIC20087 sofreu processo de desnaturação devido, provavelmente, a exposição a condições desfavoráveis àquelas em que foi produzida, como variações da temperatura e, portanto, perdeu sua solubilidade e precipitou, impossibilitando seu teste em modelo animal. Entretanto, o mesmo não ocorreu com a proteína rLIC11207, que permaneceu em condições ótimas para posterior teste de desafio.

O título de anticorpos sistêmicos foi determinado através de ELISA indireto com o soro dos hamsters de cada grupo, utilizando como antígeno a proteína recombinantes purificada (SILVA et al. 2007). O adjuvante hidróxido de alumínio atua no desenvolvimento rápido de altos títulos de anticorpos de resposta de longa duração depois da imunização primária, é muito conhecido por sua capacidade de adsorção e por retardar a eliminação do antígeno, além de induzir eosinofilia e ativação de complemento, assim como uma intensa degranulação de mastócitos no local da injeção. A inflamação no local “estimula” a drenagem linfática da região e facilita o transporte do antígeno para os linfonodos (RESENDE et al., 2004). As vacinas com adjuvantes oleosos são utilizadas com sucesso em programas de controle de doenças na América do Sul (PATIL et al.,

2002) e outras partes do mundo. As emulsões lipídicas são conhecidas como os efetivos adjuvantes capazes de induzir uma resposta imune elevada e duradoura (GUPTA & SIBER, 1995). Desse modo, a proteína rLIC11207 foi avaliada quanto a sua antigenicidade e imunogenicidade através das imunizações realizadas em modelo animal hamster utilizando-se formulações vacinais combinadas com ambos os adjuvantes acima descritos e sua eficiência foi testada através do teste de desafio com cepa homóloga. Os resultados do ELISA apresentaram reações altas antígeno-específicas para ambas as formulações vacinais e o soro hiperimune foi capaz de reconhecer rLIC11207, indicando que houve alta produção sistêmica de anticorpos e que as vacinas recombinantes testadas foram imungênicas, sugerindo que o antígeno é capaz de induzir respostas imunes efetivas e foi adequadamente apresentado ao sistema imune.

O desafio homólogo seguiu parâmetros e metodologias já estabelecidas pelo nosso grupo de pesquisa (SILVA et al., 2007). No 28º dia de experimento os animais foram desafiados com 10^3 da cepa homóloga e a eficácia de proteção da vacina não pode ser determinada, em função dos animais pertencentes ao grupo controle terem sido sobreviventes ao desafio. Este resultado sugere que a dose infectante não foi suficiente para desencadear a doença nos animais ou, possivelmente, a cepa utilizada possa vir a ter perdido a sua virulência.

Neste trabalho, construímos vetores recombinantes funcionais capazes de expressar as proteínas rLIC11207 e rLIC20087 em sistema procaríoto, sendo estes antígenos que apresentam potencial para serem empregados no desenvolvimento de vacinas recombinantes visando o controle da leptospirose. Entretanto, devido aos dados inconclusivos do teste de desafio, futuros experimentos envolvem nova avaliação do caráter imunoprotetor dessas proteínas, através de desafios homólogos e heterólogos.

7. CONCLUSÕES

- De 20 sequências analisadas, a *lic11207* e a *lic20087*, foram selecionadas.
- A metodologia utilizada para clonagem dos genes *lic11207* e *lic20087* no vetor de expressão pAE é eficiente, gerando construções funcionais capazes de expressar ambas proteínas em células procarióticas.
- A expressão em sistema de expressão heterólogo *E. coli* e a purificação por cromatografia de afinidade são eficientes para a obtenção de ambas proteínas rLIC11207 e rLIC20087.
- Os genes *lic11207* e *lic20087* estão presentes nos 18 sorovares de leptospiros patogênicas testados, tornando promissora sua utilização para o desenvolvimento de vacinas de amplo espectro contra leptospirose que gerem proteção cruzada contra esses diferentes sorovares.
- A formulação vacinal com rLIC11207 administradas com adjuvante oleoso e hidróxido de alumínio induz resposta imune humoral em hamsters.

8. REFERÊNCIAS

ADLER, B. e LA PEÑA MOCTEZUMA, A. DE. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 287–96, doi:10.1016/j.vetmic.2009.03.012, 2010.

BANFI, E. et al. The role of antibodies and serum complement in the interaction between macrophages and leptospire. **Journal of general microbiology**, v. 128, n. 4, p. 813–6, 1982.

BARBOSA, A. S. et al. Immune evasion of leptospira species by acquisition of human complement regulator C4BP. **Infection and immunity**, v. 77, n. 3, p. 1137–43, doi:10.1128/IAI.01310-08, 2009.

BAROCCHI, M. A. et al. Rapid Translocation of Polarized MDCK Cell Monolayers by *Leptospira interrogans*, an Invasive but Nonintracellular Pathogen Rapid Translocation of Polarized MDCK Cell Monolayers by *Leptospira interrogans*, an Invasive but Nonintracellular Pathogen. **Infection and immunity**, v. 70, n. 12, p. 6926–6932, doi:10.1128/IAI.70.12.6926, 2002.

BHARTI, A. R. et al. Reviews Leptospirosis : a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, p. 757–771, 2003.

BHATTACHARJEE, B. et al. Chemogenomics profiling of drug targets of peptidoglycan biosynthesis pathway in *Leptospira interrogans* by virtual screening approaches. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 779–84, 2013.

BOMFIM, M. R. Q.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F. e KOURY, M. C. Detection of pathogenic leptospire in urine from naturally infected cattle by nested PCR. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 178, n. 2, p. 251–6, doi:10.1016/j.tvjl.2007.07.029, 2008.

BREINER, D. D. et al. *Leptospira interrogans* binds to human cell surface receptors including proteoglycans. **Infection and immunity**, v. 77, n. 12, p. 5528–36, doi:10.1128/IAI.00546-09, 2009.

CERQUEIRA, G. M. e PICARDEAU, M. A century of *Leptospira* strain typing. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 9, n. 5, p. 760–8, doi:10.1016/j.meegid.2009.06.009, 2009.

CHAGAS-JUNIOR, A. D. et al. Detection and quantification of *Leptospira interrogans* in hamster and rat kidney samples: immunofluorescent imprints versus real-time PCR. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. e32712, doi:10.1371/journal.pone.0032712, 2012.

CHARON, N. W. e GOLDSTEIN, S. F. Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes. **Annual review of genetics**, v. 36, p. 47–73, doi:10.1146/annurev.genet.36.041602.134359, 2002.

CHOY, H. a et al. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. **Infection and immunity**, v. 75, n. 5, p. 2441–50, doi:10.1128/IAI.01635-06, 2007.

CINCO, M. et al. *Leptospira interrogans* and *Leptospira* peptidoglycans induce the release of tumor necrosis factor alpha from human monocytes. **FEMS microbiology letters**, v. 138, n. 2-3, p. 211–4, 1996.

CINCO, M. et al. *Leptospira interrogans* binds to the CR3 receptor on mammalian cells. **Microbial Pathogenesis**, v. 33, n. 6, p. 299–305, doi:10.1006/mpat.2002.0537, 2002.

CULLEN, P. A. et al. Surfaceome of *Leptospira* spp . **Infection and immunity**, v. 73, n. 8, p. 4853–4863, doi:10.1128/IAI.73.8.4853, 2005.

DELLAGOSTIN, O. a et al. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Human vaccines**, v. 7, n. 11, p. 1215–24, doi:10.4161/hv.7.11.17944, 2011.

DIAMENT, D. et al. Peripheral Blood Mononuclear Cell Activation Induced by *Leptospira interrogans* Glycolipoprotein Peripheral Blood Mononuclear Cell Activation Induced by *Leptospira interrogans* Glycolipoprotein. **Infection and immunity**, v. 70, n. 4, p. 1677–1683, doi:10.1128/IAI.70.4.1677, 2002.

DOLHNIKOFF, M. et al. Pathology and pathophysiology of pulmonary manifestations in leptospirosis. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 142–8, 2007.

EVANGELISTA, K. V. . e COBURN, J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future Microbiol.**, v. 5, n. 9, p. 1413–1425, doi:10.2217/fmb.10.102.*Leptospira*, 2011.

FRAGA, T. R. et al. Immune Evasion by Pathogenic *Leptospira* Strains: The Secretion of Proteases that Directly Cleave Complement Proteins. **The Journal of infectious diseases**, p. 1–11, doi:10.1093/infdis/jit569, 2013.

FRAGA, T. R.;; BARBOSA, a S. e ISAAC, L. Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. **Scandinavian journal of immunology**, v. 73, n. 5, p. 408–19, doi:10.1111/j.1365-3083.2010.02505.x, 2011.

GANCHEVA, G. I. Leptospirosis in elderly patients. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 592–5, doi:10.1016/j.bjid.2013.01.012, 2013.

GANOZA, C. a et al. Asymptomatic renal colonization of humans in the peruvian Amazon by *Leptospira*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 2, p. e612, doi:10.1371/journal.pntd.0000612, 2010.

GOLDSTEIN, S. F. e CHARON, N. W. Motility of the Spirochete *Leptospira*. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 9, p. 101–110, 1988.

GRASSMANN, A. a et al. Protection against lethal leptospirosis after vaccination with LipL32 coupled or coadministered with the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Clinical and vaccine immunology: CVI**, v. 19, n. 5, p. 740–5, doi:10.1128/CVI.05720-11, 2012.

GROOMS, D. L. e BOLIN, C. a. Diagnosis of fetal loss caused by bovine viral diarrhoea virus and *Leptospira* spp. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 21, n. 2, p. 463–72, doi:10.1016/j.cvfa.2005.02.010, 2005.

GUPTA, R.K.; CIBER, G. R. Adjuvants for human vaccines-current status, problems and future prospects. **Vaccine** v. 13, p. 1263-1276, 1995.

HAAKE, D. A. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. **Microbiology**, v. 146, p. 1491–1504, 2000.

HAAKE, DAVID A.; MATSUNAGA, J. *Leptospira*: A spirochaete with a hybrid outer membrane. **Mol. Microbiol.**, p. 1–16, 2011.

HARTSKEERL, R. a.; COLLARES-PEREIRA, M. e ELLIS, W. a. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 17, n. 4, p. 494–501, doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03474.x, 2011.

HOTEZ, P. J. et al. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 2, n. 9, p. e300, doi:10.1371/journal.pntd.0000300, 2008.

J P GOMES, M. **Gênero *Leptospira* spp.** FAVET-UFRGS - [S.I.]. 2013.

JOST, B. H. et al. A monoclonal antibody reacting with a determinant on leptospiral lipopolysaccharide protects guinea pigs against leptospirosis. **Journal of medical microbiology**, v. 22, n. 3, p. 269–75, 1986.

KO, A. I.; GOARANT, C. e PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature reviews. Microbiology**, v. 7, n. 10, p. 736–47, doi:10.1038/nrmicro2208, 2009.

KOIZUMI, N. et al. A new loop-mediated isothermal amplification method for rapid, simple, and sensitive detection of *Leptospira* spp. in urine. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 6, p. 2072–4, doi:10.1128/JCM.00481-12, 2012.

LAMBERT, A. et al. FlaA proteins in *Leptospira interrogans* are essential for motility and virulence but are not required for formation of the flagellum sheath. **Infection and immunity**, v. 80, n. 6, p. 2019–25, doi:10.1128/IAI.00131-12, 2012.

LEE, S. H. et al. Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar lai. **Gene**, v. 254, n. 1-2, p. 19–28, 2000.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 296–326, doi:10.1128/CMR.14.2.296, 2001.

LIAO, S. et al. Inactivation of the *fliY* gene encoding a flagellar motor switch protein attenuates mobility and virulence of *Leptospira interrogans* strain Lai. **BMC microbiology**, v. 9, p. 253, doi:10.1186/1471-2180-9-253, 2009.

LOURDAULT, K. et al. Inactivation of *clpB* in the pathogen *Leptospira interrogans* reduces virulence and resistance to stress conditions. **Infection and immunity**, v. 79, n. 9, p. 3711–7, doi:10.1128/IAI.05168-11, 2011.

LOUVEL, H. et al. Comparative and functional genomic analyses of iron transport and regulation in *Leptospira* spp. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 22, p. 7893–904, doi:10.1128/JB.00711-06, 2006.

MATSUNAGA, J. et al. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Molecular Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 929–946, doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03619.x, 2003.

MATSUNAGA, J. et al. Osmolarity , a Key Environmental Signal Controlling Expression of Leptospiral Proteins LigA and LigB and the Extracellular Release of LigA Osmolarity , a Key Environmental Signal Controlling Expression of Leptospiral Proteins LigA and LigB and the Extracel. **Infection and immunity**, v. 73, n. 1, p. 70–78, doi:10.1128/IAI.73.1.70, 2005.

MCBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. Leptospirosis. **Curr Opin Infect Dis**, v.18, n.5, p.376-386, 2005.

MCBRIDE, A. J. a et al. Evaluation of four whole-cell *Leptospira*-based serological tests for diagnosis of urban leptospirosis. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 14, n. 9, p. 1245–8, doi:10.1128/CVI.00217-07, 2007.

MERI, T. et al. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospire. **Microbial pathogenesis**, v. 39, n. 4, p. 139–47, doi:10.1016/j.micpath.2005.07.003, 2005.

MERIEN, F.; BARANTON, G. e PEROLAT, P. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. **Infection and immunity**, v. 65, n. 2, p. 729–38, 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Casos confirmados de Leptospirose. **Portal da Saúde**, p. 91–99, 2012.

MOGENSEN, T. H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. **Clinical microbiology reviews**, v. 22, n. 2, p. 240–73, Table of Contents, doi:10.1128/CMR.00046-08, 2009.

MURRAY, G. L. et al. Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*. **Infection and immunity**, v. 77, n. 3, p. 952–8, doi:10.1128/IAI.01370-08, 2009.

NASCIMENTO, A. L. T. O. et al. Comparative Genomics of Two *Leptospira interrogans* Serovars Reveals Novel Insights into Physiology and Pathogenesis Comparative Genomics of Two *Leptospira interrogans* Serovars Reveals Novel Insights into Physiology and Pathogenesis †. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 7, p. 2164–2172, doi:10.1128/JB.186.7.2164, 2004.

OLIVEIRA, S. V. De; LOURDES, M. De e SIMÕES, N. Reservatórios animais da leptospirose : Uma revisão bibliográfica. **Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde**, v. 39, n. 1, p. 9–20, 2013.

OOTEMAN, M. C.; VAGO, A. R. e KOURY, M. C. Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. **Journal of microbiological methods**, v. 65, n. 2, p. 247–57, doi:10.1016/j.mimet.2005.07.015, 2006.

PICARDEAU, M. et al. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. **PLoS one**, v. 3, n. 2, p. e1607, doi:10.1371/journal.pone.0001607, 2008.

PLANK, R. e DEAN, D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 2, n. 10, p. 1265–76, 2000.

REIS, R. B. et al. Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 2, n. 4, p. e228, doi:10.1371/journal.pntd.0000228, 2008.

RESENDE, C.B.F.; PASSOL, J.; FERREIRA, C.A.I.S.; ZANETTI, R.C.; LIMAS, C.H. Adjuvantes de vacinas: possibilidades de uso em seres humanos ou animais. **Rev. bras. alerg. imunopatol**, vol. 27, nº 3, 2004.

RICALDI, J. N. e VINETZ, J. M. Leptospirosis in the tropics and in travelers. **Current infectious disease reports**, v. 8, n. 1, p. 51–8, 2006.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. LEPTOSPIROSE: Guia de Vigilância Epidemiológica. **Ministério da Saúde. Portal da Saúde**, v. 8, p. 15–32, 2004.

SILVA, E. F. et al. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, v. 25, n. 33, p. 6277–86, doi:10.1016/j.vaccine.2007.05.053, 2007.

SILVA, J. B. DA et al. Induction of TNF-alfa and CXCL-2 mRNAs in different organs of mice infected with pathogenic *Leptospira*. **Microbial pathogenesis**, v. 52, n. 4, p. 206–16, doi:10.1016/j.micpath.2012.01.002, 2012.

VINETZ, J. M. Leptospirosis. **Curr Opin Infect Dis**, v. 14, n. 5, p. 527–538, 2001.

WANG, Z.; JIN, L.; WEGRZYN, A. Leptospirosis vaccines. **Microb Cell Fact**, v.6, p.39, 2007.

WANG, Boyao et al. Role of Specific Antibody in Interaction of Leptospire with Human Monocytes and Monocyte-Derived Macrophages. **Infection and immunity**, v. 46, n. 3, p. 809–813, 1984.

WANG, B et al. Interaction of leptospire with human polymorphonuclear neutrophils. **Infection and immunity**, v. 44, n. 2, p. 459–64, 1984.

WERTS, C. et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. **Nature Immunology**, v. 2, n. 4, 2001.

WHO. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. **WHO Library Cataloguing-in-Publication**, p. 122, 2003.

YANG, C.-W. et al. Toll-like receptor 2 mediates early inflammation by leptospiral outer membrane proteins in proximal tubule cells. **Kidney international**, v. 69, n. 5, p. 815–22, doi:10.1038/sj.ki.5000119, 2006.

YANG, H.-L. et al. In silico and microarray-based genomic approaches to identifying potential vaccine candidates against *Leptospira interrogans*. **BMC genomics**, v. 7, p. 293, doi:10.1186/1471-2164-7-293, 2006.

YURI, K. et al. Chemotaxis of Leptospire to Hemoglobin in Relation to Virulence. **Infection and immunity**, v. 61, n. 5, p. 2270–2272, 1993.

ZUERNER, R. L. et al. A *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo vaccine induces a Th1 response, activates NK cells, and reduces renal colonization. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 18, n. 4, p. 684–91, doi:10.1128/CVI.00288-10, 2011.