

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Veterinária**  
**Programa de Pós-Graduação em Veterinária**



**Tese**

**Prospecção e Avaliação de Proteínas Recombinantes para o Desenvolvimento  
de uma Vacina contra a Leptospirose**

**Tanise Pacheco Fortes**

Pelotas, 2017

**Tanise Pacheco Fortes**

**Prospecção e Avaliação de Proteínas Recombinantes para o Desenvolvimento  
de uma Vacina contra a Leptospirose**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Éverton Fagonde da Silva  
Coorientador: Amilton Clair Seixas Neto

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

F739p Fortes, Tanise Pacheco

Prospecção e Avaliação de Proteínas Recombinantes para o Desenvolvimento de uma Vacina contra a Leptospirose / Tanise Pacheco Fortes ; Everton Fagonde da Silva, orientador ; Amilton Clair Seixas Neto, coorientador. — Pelotas, 2017.

61 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Leptospirose. 2. Vacinologia reversa. 3. Proteínas recombinantes. I. Silva, Everton Fagonde da, orient. II. Seixas Neto, Amilton Clair, coorient. III. Título.

CDD : 636.0898

Tanise Pacheco Fortes

Prospecção e Avaliação de Proteínas Recombinantes para o Desenvolvimento de  
uma Vacina contra a Leptospirose

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências,  
Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária,  
Universidade Federal de Pelotas.

Data de defesa: 21/02/2017

Banca examinadora:

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva (Orientador)  
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Geferson Fischer  
Doutor em Biotecnologia Agrícola pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Fernando da Silva Bandeira  
Doutor em Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dra. Rita de Cássia Conceição  
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Aos meus pais, pelo amor e carinho, dedico.

## **Agradecimentos**

Agradeço aos meus pais, pelo amor, apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos pela presença e às minhas sobrinhas por tornarem os dias mais divertidos.

Ao Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva pela confiança, compreensão e orientação durante o doutorado.

Ao Amilton, Caroline, Gilmar, Jéssica e Paula pela amizade e participação ativa em diferentes etapas deste projeto.

À Universidade Federal de Pelotas, ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária e à CAPES pela oportunidade de realização deste trabalho.

E a todos que, de diferentes formas, colaboraram para tornar tudo isso possível.

**Muito obrigada.**

***“In the end, we are our choices. Build yourself a great history.”***

**Jeff Bezos**

## Resumo

FORTES, Tanise Pacheco. **Prospecção e avaliação de proteínas recombinantes para o desenvolvimento de uma vacina contra a leptospirose.** 2017. 61f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

A leptospirose é uma zoonose de ocorrência mundial causada por membros patogênicos do gênero *Leptospira*. Em países em desenvolvimento, como o Brasil, a doença representa um grave problema de saúde pública. Os hospedeiros suscetíveis adquirem a doença através do contato com urina, água ou solo contaminados com a bactéria. Além dos roedores, os bovinos e os caninos se destacam como importantes reservatórios de *Leptospira* spp, tornando a vacinação dos animais suscetíveis uma das principais formas de prevenção da doença. As vacinas disponíveis comercialmente são bacterinas que induzem resposta imune humoral predominantemente contra o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano e que não são capazes de fornecer proteção de longo prazo contra a infecção. As proteínas da membrana externa de *Leptospira* spp tem sido avaliadas como candidatos vacinais em modelo animal e são uma alternativa promissora às formulações comerciais em uso. Dessa maneira, o objetivo deste estudo foi realizar a triagem de preparações vacinais contendo proteínas recombinantes de *Leptospira* spp, visando o desenvolvimento de uma vacina contra a leptospirose. Cinco genes, LIC11889, LIC10666, LIC10498, LIC12666 e LIC10463, foram identificados e amplificados a partir do genoma de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130. Desses genes, quatro (LIC11889, LIC10666, LIC10498 e LIC10463) foram eficientemente expressos em sistema de expressão heteróloga em *Escherichia coli* e purificados através de cromatografia de afinidade. Duas proteínas recombinantes, rLIC11889 e rLIC10666 foram empregados na formulação de preparações vacinais, utilizadas para imunizar hamsters posteriormente desafiados com dose letal de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130. Todos os animais vacinados com as preparações contendo as proteínas recombinantes sobreviveram à leptospirose aguda, tornando promissora sua utilização para a criação de vacinas contra a doença.

**Palavras-chave:** leptospirose; vacinologia reversa; proteínas recombinantes

## Abstract

FORTES, Tanise Pacheco. **Prospection and evaluation of recombinant proteins for the development of a vaccine against leptospirosis.** 2017. 61f. Thesis (Doctor degree in Sciences) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Leptospirosis is a worldwide zoonosis caused by pathogenic members of the genus *Leptospira*. In countries under development, like Brazil, the disease represents a serious problem of public health. The susceptible hosts acquire the disease through contact with urine, water or soil contaminated with the bacteria. As well as rodents, cattle and dogs are important reservoirs of *Leptospira* spp, making the vaccination of susceptible animals one of the main ways of preventing the disease. The commercially available vaccines are bacterins that induce humoral immune response predominantly against the bacterial lipopolysaccharide (LPS) and are unable to provide long term protection against the infection. The outer membrane proteins of *Leptospira* spp have been evaluated as vaccinal candidates in animal models and are a promising alternative to usual commercial formulae. In this way, the objective of this study was to perform a trial of vaccinal preparations containing recombinant proteins of *Leptospira* spp, to develop a vaccine against leptospirosis. Five genes, LIC11889, LIC10666, LIC10498, LIC12666 and LIC10463 were identified and amplified from the genome of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130. From these genes, four (LIC11889, LIC10666, LIC10498 and LIC10463) were efficiently expressed in an heterologous expression system in *Escherichia coli* and purified through affinity chromatography. Two recombinant proteins, rLIC11889 and rLIC10666 were employed in the formulation of vaccinal preparations, used to immunize hamsters that were later challenged with the lethal dose of *L. interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130. All the animals vaccinated with the preparations containing the recombinant proteins survived acute leptospirosis, making their use for the development of vaccines against the disease promising.

**Keywords:** leptospirosis; reverse vaccinology; recombinant proteins

## Lista de Figuras

### Artigo 2

Figura 1	Amplificação dos genes selecionados por PCR.....	31
Figura 2	Análise da pureza e aparente peso molecular das proteínas por SDS-PAGE.....	32

### Artigo 3

Figura 1	Amplificação de LIC11889 e LIC10666 por PCR.....	43
Figura 2	Análise da pureza e aparente peso molecular das proteínas por SDS-PAGE.....	43
Figura 3	Curvas de sobrevivência dos hamsters imunizados com as proteínas recombinantes e controles após o desafio com cepa homóloga virulenta.....	44

## Lista de Tabelas

### Introdução

Tabela 1	Classificação das espécies de <i>Leptospira</i> quanto à patogenicidade.....	14
----------	--	----

### Artigo 3

Tabela 1	Delineamento para a vacinação dos hamsters com proteína recombinante e grupos controle.....	41
----------	---	----

## Lista de Abreviaturas e Siglas

DAB	Diaminobenzidina
DL	Dose letal
EMJH	Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris
IFN	Interferon
IM	<i>Inner membrane</i>
IPTG	isopropil $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo
LB	Luria-Bertani
LIG	<i>Leptospiral immunoglobulin-like protein</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MAT	<i>Microscopic agglutination test</i>
OM	<i>Outer membrane</i>
OMP	<i>Outer membrane protein</i>
PB	Pares de base
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
RPM	Rotações por minuto
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas

## Lista de Símbolos

$\mu\text{m}$	Micrometro
$\mu\text{l}$	Microlitro
$\mu\text{g}$	Micrograma
$^{\circ}\text{C}$	Grau celsius
$\text{TM}$	<i>Trademark</i>
$\text{\textcircled{R}}$	Marca registrada
$<$	Menor
$\geq$	Maior ou igual

## Sumário

<b>1 Introdução.....</b>	<b>13</b>
<b>2 Hipótese.....</b>	<b>19</b>
<b>3 Objetivos.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>20</b>
<b>4 Artigos.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1 Artigo 1.....</b>	<b>21</b>
<b>4.2 Artigo 2.....</b>	<b>26</b>
<b>4.3 Artigo 3.....</b>	<b>36</b>
<b>5 Considerações Finais.....</b>	<b>51</b>
<b>Referências.....</b>	<b>52</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>60</b>

## 1 Introdução

A leptospirose é uma zoonose de ocorrência mundial causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* (ADLER, 2015). A doença é considerada um problema de saúde pública e estima-se que mais de um milhão de casos humanos ocorram anualmente, resultando em aproximadamente 60 mil mortes (COSTA et al., 2015). As bactérias são classificadas em vinte e uma espécies e mais de duzentos sorovares (LEVETT, 2015). Observadas através de microscopia de campo escuro e em meio líquido, as leptospirosas são organismos pequenos, móveis e com forma helicoidal, geralmente com uma ou ambas as extremidades curvadas (FAINE, 1999).

As leptospirosas são espiroquetas que podem ser encontradas habitando água doce, onde se comportam como micro-organismos saprófitas de vida livre, ou causando infecção em humanos e animais (LEVETT, 2015). Atualmente, a classificação filogenética utilizando sequências do gene 16S rRNA reuniu as espécies de *Leptospira* em três grupos: patogênicas, intermediárias e não patogênicas (TAMURA et al., 2011), conforme mostrado na tabela 1.

Tabela 1 – Classificação das espécies de *Leptospira* quanto à patogenicidade. A classificação foi obtida através de análise molecular filogenética, utilizando sequências do gene 16S rRNA.

<b>Espécie</b>	<b>Classificação</b>
<i>Leptospira alexanderi</i>	Patogênica
<i>Leptospira weilii</i>	Patogênica
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	Patogênica
<i>Leptospira santarosai</i>	Patogênica
<i>Leptospira kmetyi</i>	Patogênica
<i>Leptospira alstonii</i>	Patogênica
<i>Leptospira interrogans</i>	Patogênica
<i>Leptospira kirschneri</i>	Patogênica
<i>Leptospira noguchi</i>	Patogênica
<i>Leptospira licerasiae</i>	Intermediária
<i>Leptospira wolffii</i>	Intermediária
<i>Leptospira fainei</i>	Intermediária
<i>Leptospira inadai</i>	Intermediária
<i>Leptospira broomii</i>	Intermediária
<i>Leptospira idonii</i>	Não patogênica
<i>Leptospira vanthielii</i>	Não patogênica
<i>Leptospira biflexa</i>	Não patogênica
<i>Leptospira wolbachii</i>	Não patogênica
<i>Leptospira terpstrae</i>	Não patogênica
<i>Leptospira meyeri</i>	Não patogênica
<i>Leptospira yanagawae</i>	Não patogênica

Fonte: Tamura et al. (2011).

As espécies patogênicas possuem a capacidade de infectar uma grande variedade de hospedeiros e sobreviver tanto em ambientes aquáticos quanto no organismo de mamíferos (CAMERON, 2015).

As leptospiras são aeróbias obrigatórias, apresentam crescimento ótimo numa faixa de temperatura entre 28-30°C (FAINE, 1999) e medem 6-25µm de comprimento por 0,2µm de diâmetro (BHARTI et al., 2003). Costumam ser cultivadas em meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), composto por ácido

oléico, albumina sérica bovina e polisorbato 80 (LEVETT, 2001). O meio EMJH costuma ser suplementado com soro de coelho ou suplementos comerciais (CAMERON, 2015).

A ultraestrutura geral das leptospirosas é similar à das bactérias Gram-negativas, com uma membrana externa onde o lipopolissacarídeo (LPS) está anexado, uma membrana interna e uma camada de peptidoglicano contendo o espaço periplasmático (CAMERON, 2015). Além do LPS, na membrana externa podem ser encontradas diversas lipoproteínas que tem sido pesquisadas como alvos potenciais para o desenvolvimento de vacinas contra a leptospirose (HAAKE; MATSUNAGA, 2001).

A motilidade das leptospirosas em meio líquido deve-se à atividade de dois flagelos periplasmáticos, localizados no espaço entre a membrana interna (IM) e a membrana externa (OM) (KO et al., 2009). De acordo com Picardeau (2001), a proteína FlaA constitui a bainha do flagelo, enquanto a proteína FlaB constitui o núcleo. Cada flagelo está ancorado em uma das extremidades da célula bacteriana, conferindo à leptospirosas suas pontas em formato de gancho (LAMBERT et al., 2012). A motilidade também é um dos principais fatores relacionados à patogenicidade da leptospirosas (FERNANDES et al., 2016), uma vez que o flagelo incorporado permite que a bactéria execute o movimento de saca rolha característico, facilitando sua disseminação no hospedeiro e sobrevivência no ambiente (BUYUTIMKIN; SAIER, 2015).

Os hospedeiros suscetíveis adquirem a doença através do contato com a urina, água ou solo contaminados com a bactéria (MURRAY, 2013). Depois de penetrarem no organismo, as leptospirosas se disseminam pela corrente sanguínea, atingindo órgãos específicos como fígado, pulmões e rins, onde podem sobreviver por meses (BHARTI et al., 2003; FERNANDES et al., 2016). As bactérias colonizam os rins e se localizam no túbulo proximal renal, sendo excretadas juntamente com a urina (HARTSKEERL et al., 2001). A ocorrência e a duração da eliminação urinária da bactéria costumam variar e são dependentes da relação sorovar-hospedeiro (FORNAZARI et al., 2012). Os roedores (principalmente *Rattus norvegicus*) são portadores assintomáticos leptospirosas, mas bovinos (ambiente rural) e caninos (ambiente urbano) também são descritos como importantes reservatórios da bactéria (BHARTI et al., 2003).

De acordo com Ko et al. (2009), a apresentação clínica da leptospirose costuma ser bifásica, possuindo uma fase aguda (com presença de bacteremia, durante a primeira semana da infecção) e uma fase imune (quando ocorre a disseminação da bactéria no organismo e a produção de anticorpos). Em humanos, os sintomas costumam variar de leves e semelhantes aos de uma gripe, até graves com presença de icterícia e complicações multissistêmicas, um quadro conhecido como Doença de Weil. A gravidade dos sintomas apresentados está relacionada diretamente ao sorovar envolvido na doença (LEVETT, 2001).

Nos bovinos, a leptospirose é considerada uma das principais doenças infecciosas, responsável por grandes perdas econômicas associadas ao aborto, infertilidade, morte embrionária e diminuição na produção de leite (VASCONCELLOS et al., 2001; CHIDEROLI et al., 2016). A doença também representa um fator de risco ocupacional para veterinários, magarefes e produtores rurais (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001). Estudos recentes (PINTO et al., 2015; HAMOND et al., 2016) estimam que a prevalência sorológica nos rebanhos brasileiros seja igual ou superior a 50%. Entre os sorovares mais comumente associados à doença, Hardjobovis e Hardjoprajitno parecem ser os principais (BULACH et al., 2006). Uma das principais medidas de controle sugeridas é a vacinação dos bovinos suscetíveis (BALAKRISHNAN; ROY, 2014).

As vacinas disponíveis contra a doença não mudaram muito nos últimos 100 anos, elas ainda são baseadas em preparações contendo a célula inteira inativada pelo calor (bacterinas) ou extratos da membrana capazes de gerar diversos efeitos colaterais (DELLAGOSTIN et al., 2017). Para bovinos, as vacinas comerciais disponíveis são bacterinas compostas pelos sorovares endêmicos de determinada região e induzem resposta imune humoral contra o LPS bacteriano (ZENG et al., 2015). Infelizmente, a resposta imune fornecida possui curta duração, fazendo com que múltiplas doses da vacina sejam necessárias para a manutenção da imunidade (DELLAGOSTIN et al., 2011). Um problema mais preocupante é a incapacidade das bacterinas em fornecer proteção cruzada contra os sorovares da bactéria que não estão incluídos na preparação vacinal (ZENG et al., 2015). Isso deve-se ao alto nível de variação do LPS entre os diferentes sorovares de *Leptospira*, permitindo que um animal vacinado seja infectado e desenvolva a doença ao entrar em contato com um sorovar não incluído na vacina (PINNE; HAAKE, 2009).

Diante, destas limitações, diversos estudos tem focado no desenvolvimento de vacinas recombinantes contra a leptospirose que sejam capazes de conferir imunidade cruzada contra os sorovares heterólogos e gerar imunidade de longo prazo (MATSUNAGA et al., 2003; SILVA et al., 2007). Haake et al. (1999), demonstraram que LipL41 e OmpL1 fornecem proteção parcial ao serem co-administradas em hamsters. LipL32, a lipoproteína mais abundante presente na membrana externa, já foi testada em forma de vacina de subunidade (SEIXAS et al., 2007; GRASSMANN et al., 2012) e apresentou eficácia baixa. A porção C-terminal da proteína LigA (LigANI) administrada em conjunto com o adjuvante oleoso de Freund, protegeu 67-100% dos hamsters desafiados com *Leptospira interrogans*, mas não conferiu imunidade esterilizante (SILVA et al., 2007).

As proteínas da membrana externas (OMPs) constituem bons alvos para o desenvolvimento de vacinas devido à sua localização na superfície da célula, participação na interação com o hospedeiro e conservação entre as diferentes espécies patogênicas de *Leptospira* (CULLEN et al., 2005; LUCAS et al., 2011). Dois tipos de OMPs foram previamente caracterizados, as porinas (OMPs transmembrana) e as lipoproteínas (ficam ancoradas no espaço periplasmático da membrana externa) (ZUERNER et al., 2000). De acordo com Haake (2000), as lipoproteínas de espiroqueta são antígenos capazes de induzir uma resposta imune protetora, além de constituir o grupo mais proeminente de proteínas que compõem a membrana celular bacteriana.

Neste trabalho, avaliamos as informações disponíveis na literatura com o objetivo de prospectar novos alvos vacinais e desenvolver uma vacina recombinante contra a leptospirose. Inicialmente, apresentamos uma revisão de literatura intitulada "*Leptospirose bovina: uma revisão*" publicada no volume 12, nº36, de abril de 2017, da revista Sodebras.

O segundo artigo, formatado de acordo com as normas da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e escrito na forma de nota técnica, foi intitulado "*Obtenção de proteínas recombinantes para o desenvolvimento de vacina contra a leptospirose bovina*". Nele abordamos a metodologia necessária para a prospecção e construção de novos alvos vacinais, utilizando ferramentas de bioinformática e técnicas de clonagem molecular.

Finalmente, o terceiro artigo "*Vacinação com duas novas proteínas recombinantes confere imunidade protetora parcial em hamsters contra a leptospirose letal*" foi formatado de acordo com as normas da UFPel e relata a eficácia protetora de duas proteínas recombinantes de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 quando utilizadas como preparação vacinal, obtendo resultados promissores.

## **2 Hipótese**

Proteínas recombinantes de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 são capazes de conferir proteção homóloga em hamsters (*Mesocricetus auratus*) quando formuladas em associação com adjuvante oleoso.

## **3 Objetivos**

### **3.1 Objetivo Geral**

Realizar a triagem de preparações vacinais contendo as proteínas recombinantes de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130, visando o desenvolvimento de uma vacina contra a leptospirose animal capaz de conferir proteção de amplo espectro.

### **3.2 Objetivos Específicos**

- Revisar a bibliografia disponível sobre os principais aspectos envolvidos na leptospirose bovina;
- Selecionar sequências codificadoras para proteínas hipotéticas de *Leptospira* a partir de informações disponíveis no banco de dados GenBank;
- Amplificar genes que codificam proteínas hipotéticas de *Leptospira* patogênica através da reação em cadeia da polimerase (PCR);
- Expressar em sistema de expressão heteróloga em *Escherichia coli* e purificar as proteínas selecionadas;
- Formular as preparações vacinais com as proteínas recombinantes e adjuvante oleoso;
- Vacinar hamsters e desafiá-los com cepa homóloga virulenta.

## **4 Artigos**

### **4.1 Artigo 1**

#### **Leptospirose bovina: uma revisão**

Tanise Pacheco Fortes; Gilmar Batista Machado; Amilton Clair Seixas Neto; Caroline Dewes; Paula Soares Pacheco; Éverton Fagonde da Silva

Artigo publicado na Revista Sodebras, v.12, n.136, p.158-161, abr/2017.

## LEPTOSPIROSE BOVINA: UMA REVISÃO

### BOVINE LEPTOSPIROSIS: A REVIEW

TANISE PACHECO FORTES<sup>1</sup>; GILMAR BATISTA MACHADO<sup>1</sup>; AMILTON CLAIR SEIXAS NETO<sup>1</sup>;  
CAROLINE DEWES<sup>1</sup>; PAULA SOARES PACHECO<sup>1</sup>; ÉVERTON FAGONDE DA SILVA<sup>1</sup>

1 – UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

*tanisefortes@gmail.com; gilmar.machado84@hotmail.com; amiltonseixas@gmail.com;*  
*caroldewesvet@hotmail.com; paulaa\_pacheco@hotmail.com; fagondee@gmail.com*

**Resumo** – A leptospirose é uma zoonose negligenciada que afeta humanos e animais. Entre os animais de produção, os bovinos mostram-se relativamente suscetíveis à infecção e são considerados um importante reservatório do micro-organismo no ambiente rural. Nessa espécie, *Hardjo* parece ser o sorovar mais comumente envolvido na infecção. A vacinação dos animais suscetíveis é uma das principais formas de prevenção da doença, mas oferece proteção limitada contra os diferentes sorovares da bactéria. Desta forma, o diagnóstico precoce aliado ao tratamento efetivo da leptospirose torna-se importante para proteger os bovinos da forma severa da doença e prevenir a disseminação de leptospiras no ambiente.

**Palavras-chave:** Leptospirose. Bovinos. Aborto.

**Abstract** – Leptospirosis is a neglected zoonosis that affects humans and animals. Among the species that are used for livestock production, cattle are an important host of the microorganism in the rural environment. In this species, *Hardjo* seems to be the most commonly serovar involved in the infection. Vaccination of susceptible animals is one of the main ways of preventing the disease, but it offers limited protection against the different serovars of the bacteria. Thus, early diagnosis combined with the effective treatment of leptospirosis becomes important to protect cattle from the severe form of the disease and prevent the spread of leptospiras in the environment.

**Keywords:** Leptospirosis. Bovine. Abortion.

#### I. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma importante zoonose que possui distribuição mundial (ELLIS, 2015). A doença é causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*, as quais foram classificadas em vinte e uma espécies e mais de duzentos sorovares (LEVETT, 2015). *Leptospira interrogans* parece ser a espécie predominante na maioria dos países (ADLER *et al.*, 2014). Os sorovares *Hardjobovis* e *Hardjoprajitno* estão mais associados com a infecção em bovinos, mas um grande número de sorovares leptospirais já foram descritos como causadores da enfermidade nesta espécie animal (LOUREIRO *et al.*, 2016). Apesar da sua distribuição mundial, a incidência da leptospirose costuma ser maior em regiões tropicais e com índices altos de precipitação, principalmente nos países em desenvolvimento (KO *et al.*, 1999).

A enfermidade nos mamíferos pode apresentar-se de forma aguda, a qual é similar em animais e humanos, com sinais clínicos variados como febre, perda de peso e mialgia,

podendo ocorrer icterícia e hemorragias (LUCAS *et al.*, 2014; HAAKE; LEVETT, 2015). Em bovinos leiteiros, a “milk drop syndrome” é comumente observada na fase aguda da doença, gerando diminuição e alteração nas características do leite, que passa a apresentar coloração amarelada, consistência similar à do colostro e alta contagem de células somáticas, gerando prejuízo financeiro para os produtores (FAINE *et al.*, 1999). Embora possa ocorrer uma infecção subclínica, a forma crônica da leptospirose é responsável pelas maiores perdas econômicas dos fazendeiros. Nesta forma da doença, vacas gestantes podem apresentar abortos, natimortos, além do nascimento de animais prematuros e fracos (LUCAS *et al.*, 2014). No entanto, essas manifestações clínicas não são específicas e não existe um sinal patognomônico na leptospirose humana e animal.

Neste contexto, o trabalho teve como objetivo revisar a bibliografia disponível sobre leptospirose bovina, ressaltando os principais aspectos envolvidos com a enfermidade.

#### II. LEPTOSPIROSE EM BOVINOS

A enfermidade causada por bactérias do gênero *Leptospira* é considerada uma das principais doenças infecciosas de bovinos, causando perdas econômicas associadas principalmente ao aborto, infertilidade, morte embrionária e diminuição na produção de leite (VASCONCELLOS *et al.*, 2001; CHIDEROLI *et al.*, 2016). No Brasil, a leptospirose bovina é considerada endêmica apesar de ser uma doença subdiagnosticada (LEVETT *et al.*, 2001). Os primeiros trabalhos sobre a doença no país surgiram na década de 50, com a identificação do sorovar Pomona em um feto bovino e originaram uma série de pesquisas sobre a presença de anticorpos anti-*Leptospira* nos rebanhos brasileiros (LILENBAUM, 1996).

O conhecimento dos sorovares prevalentes e seus hospedeiros de manutenção é essencial para o entendimento da cadeia epidemiológica da doença em qualquer área do mundo (BLANCO *et al.*, 2016). Em estudos conduzidos por Hamond *et al.* (2016) no Estado do Rio de Janeiro, quase metade das amostras analisadas foram identificadas como pertencentes à espécie *L. borgpetersenii*, um achado condizente com a prevalência em outros países. Enquanto *L. interrogans* *Hardjoprajitno* é encontrada principalmente na Europa, em outras regiões como Austrália e Nova Zelândia,

a doença em ruminantes está mais associada à *L. borgpetersenii* Hardjobovis (BULACH *et al.*, 2006).

Ainda no Brasil, Loureiro *et al.* (2016) sugeriram que os principais agentes envolvidos na leptospirose de bovinos pertencem ao sorogrupo Sejroe, que é o sorogrupo distribuído entre as diferentes espécies patogênicas de *Leptospira*. Além disso, Vasconcellos *et al.* (2001) sugeriram que não apenas o sorovar Hardjo, mas também outros membros do sorogrupo Sejroe, particularmente os genótipos de *L. santarosai* Guaricura podem estar disseminados nos rebanhos bovinos dos estados do sudeste brasileiro. De forma semelhante, Pinto *et al.* (2015) detectaram aglutininas em 55,1% dos animais estudados para pelo menos um sorogrupo de *Leptospira*, sendo os sorogrupos predominantes Sejroe (38,1%), Javanica (27,2%) e Tarassovi (16,8%).

As estratégias para o controle e a prevenção da leptospirose em bovinos estão diretamente relacionadas ao conhecimento das cepas circulantes nos ambientes particulares, a existência de animais suscetíveis nas propriedades, a presença de animais silvestres e as características climáticas e topográficas de cada região (CHIDEROLI *et al.*, 2016). A vacinação dos bovinos suscetíveis com as vacinas disponíveis atualmente no comércio pode reduzir a eliminação do agente no ambiente, amenizando o risco de contaminação para outros animais e para os humanos responsáveis pelo manejo dos rebanhos (BALAKRISHNAN; ROY, 2014).

### III. RESPOSTA IMUNE CONTRA A LEPTOSPIROSE

De forma geral, as leptospirose patogênicas são capazes de resistir à fagocitose por macrófagos e neutrófilos a menos que anticorpos específicos estejam presentes (ADLER, 2014). Apesar disso, estudos sugerem que as bactérias são capazes de sobreviver no interior dos macrófagos e, subsequentemente, escapar da indução da apoptose, uma habilidade correlacionada com a virulência (JIN *et al.*, 2009).

Atualmente, estudos tem focado na investigação das interações de *Leptospira* com o sistema imune do hospedeiro. Em consequência, tem sido proposto que os diferentes resultados da interação de *Leptospira* com macrófagos de diferentes espécies pode ser a base para as diferentes consequências da infecção aguda em humanos (suscetíveis) e ratos (resistentes) (LI *et al.*, 2007). É sugerido que o dano tecidual observado nas espécies animais suscetíveis à leptospirose aguda e severa, como humanos e hamsters, é mediado pelo menos em parte pelo aumento na produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias quando comparado a espécies animais resistentes, como o rato (MATSUI *et al.*, 2011).

Assim como em outras espécies de mamíferos, os mecanismos de imunidade contra a leptospirose nos bovinos não estão totalmente compreendidos. Nessa espécie, estudos comprovaram que altos títulos de anticorpos circulantes não estão relacionados com a proteção contra a infecção. Além disso, a imunidade nos bovinos está relacionada com a resposta Th1 mediada pelo IFN-gama (NAIMAN *et al.*, 2001). Vacinas que possuem a habilidade de estimular uma resposta Th1 não são capazes de proteger os bovinos contra a infecção, colonização renal, disseminação das leptospirose através da urina e proteção contra a infecção transplacentária do feto (NAIMAN *et al.*, 2001).

### IV. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da leptospirose em bovinos pode ser realizado pela detecção direta do micro-organismo ou de seus componentes nos fluidos e tecidos corporais pelo isolamento de leptospirose em culturas ou pela detecção de anticorpos específicos (ADLER, 2015). A escolha pelo uso de um determinado teste diagnóstico depende de um número variado de fatores, incluindo a acurácia do diagnóstico e os recursos técnicos e financeiros disponíveis (PICARDEAU *et al.*, 2014).

No caso da leptospirose, o diagnóstico precoce da enfermidade é importante para descartar outros diagnósticos diferenciais e começar o tratamento apropriado rapidamente (PINTO *et al.*, 2015). Apesar disso, a sorologia continua sendo a principal ferramenta de diagnóstico, sendo o teste de aglutinação microscópica (MAT), a técnica padrão-ouro para o diagnóstico da leptospirose (ADLER, 2014).

O MAT permite identificar os casos de leptospirose utilizando diferentes sorovares de leptospirose como antígenos (BLANCO *et al.*, 2016). Na técnica, antígenos vivos reagem com amostras de soro e a aglutinação resultante é examinada através da microscopia de campo escuro (MUSSO; SCOLA, 2013). Os sorovares que compõem o painel de antígenos dependem do laboratório encarregado do teste (BLANCO *et al.*, 2016) e deve incluir amostras representando os sorovares de circulação local (PINTO *et al.*, 2015).

Testes moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) demonstram a presença do agente na amostra clínica e permitem a confirmação da doença durante os primeiros cinco dias após a apresentação dos sintomas (PICARDEAU *et al.*, 2014). Testes sorológicos como o MAT, por outro lado, dependem do acúmulo de quantidades detectáveis de anticorpos anti-*Leptospira* em amostras de pacientes convalescentes (PICARDEAU *et al.*, 2014).

### V. VACINAS

As vacinas comerciais disponíveis atualmente para a leptospirose bovina são bacterinas capazes de conferir resposta protetora através, mas não exclusivamente, da indução de anticorpos contra o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano (FERNANDES *et al.*, 2016). O LPS das leptospirose é uma estrutura altamente variável, com diferenças significativas entre os diferentes sorovares da bactéria (PINNE; HAAKE, 2009). Por isso, essas vacinas não induzem proteção de longo prazo contra a infecção e não geram imunidade cruzada contra os sorovares da bactéria que não estão incluídos na preparação vacinal (FERNANDES *et al.*, 2016).

Recentemente, o sequenciamento do genoma bacteriano permitiu o descobrimento de sequências relacionadas a proteínas hipotéticas que, combinadas com ferramentas de bioinformática e com a tecnologia do DNA recombinante, permitiram a produção de proteínas em laboratório, independentemente de sua abundância no organismo e sem a necessidade de cultivar a bactéria *in vitro* (SETTE; RAPPUOLI, 2010). Entre as proteínas recombinantes produzidas, as proteínas de membrana externa (OMP), lipoproteínas e *Leptospiral immunoglobulin-like* (Ligs) tem sido avaliadas como potenciais candidatos vacinais em modelo animal. Diferentes grupos de pesquisa já testaram a atividade protetora de algumas dessas proteínas como vacinas

potenciais (SILVA *et al.*, 2007; FELIX *et al.*, 2011), revelando que algumas são capazes de conferir proteção parcial contra o desafio com leptospiros virulentas.

As vacinas recombinantes, assim como as bacterinas, interferem na infecção por leptospiros, mas não fornecem proteção completa. No geral, essas vacinas costumam falhar em bloquear a colonização renal ou a eliminação da bactéria pela urina, podem gerar efeitos colaterais moderados e costumam ser mais efetivas contra sorovares locais e adaptados ao hospedeiro (BACKSTEDT *et al.*, 2015). Além disso, na ausência de vacinas efetivas, a prevenção da progressão da doença depende primariamente do diagnóstico precoce e do tratamento com antibióticos, impedindo a ocorrência da forma severa da doença disseminada (PICARDEAU *et al.*, 2014).

## VI. CONCLUSÃO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* e é considerada uma das principais doenças infecciosas reprodutivas de bovinos (CHIDEROLI *et al.*, 2016). No Brasil, a doença é considerada endêmica e é causada principalmente pelo sorovar Hardjo (PINTO *et al.*, 2015). Conhecer os sorovares prevalentes numa região e seus hospedeiros de manutenção é essencial para entender a epidemiologia da doença e estabelecer estratégias de prevenção (BLANCO *et al.*, 2016). Uma das principais medidas disponíveis para a prevenção da doença é a vacinação dos animais suscetíveis (BALAKRISHNAN; ROY, 2014). Infelizmente, as vacinas comerciais disponíveis oferecem proteção limitada contra os diferentes sorovares da bactéria (BACKSTEDT *et al.*, 2015), reforçando a importância de um diagnóstico precoce aliado a um tratamento efetivo para prevenir a forma severa da doença (LUCAS *et al.*, 2014).

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, B. Pathogenesis of leptospirosis: cellular and molecular aspects. **Veterinary Microbiology**. v.172, 2014, p. 353-358.

ADLER, B. **Leptospira and leptospirosis**. Austrália, 2015.

BACKSTEDT, B. T.; BUYUKTANIR, O.; LINDOW, J.; WUNDER, E. A.; REIS, M. G.; USMANI-BROWN, S.; LEDIZET, M.; KO, A.; PAL, U. Efficient detection of pathogenic leptospires using 16S ribosomal RNA. **PLoS ONE**. v.10, n.16, 2015, p.1-18.

BALAKRISHNAN, G.; ROY, P. Comparison of efficacy of two experimental bovine leptospira vaccines under laboratory and field. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.159, 2014, p.11-15.

BLANCO, R. M.; SANTOS, L. F.; GALLOWAY, R. L.; ROMERO, E. C. Is the microagglutination test (MAT) good for predicting the infecting serogroup for leptospirosis in Brazil? **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**. v.44, 2016, p.34-36.

BULACH, D. M.; ZUERNER, R. L.; WILSON, P.; SEEMANN, T.; MCGRATH, A.; CULLEN, P. A.; DAVIS, J.; JOHNSON, M.; KUCZEK, E.; ALT, D. P.; PETERSON-BURCH, B.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; DAVIES, J. K.; ADLER, B. Genome Reduction in *Leptospira*

*borgpetersenii* reflects limited transmission potential. **PNAS**. v.103, n.39, 2006, p.14560-14565.

CHIDEROLI, R. T.; PEREIRA, U. P.; GONÇALVES, D. D.; NAKAMURA, A. Y.; ALFIERI, A. A.; FREITAS, J. C. Isolation and molecular characterization of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo strain Hardjobovis in the urine of naturally infected cattle in Brazil. **Genetics and Molecular Research**. v.15, n.1, 2016.

ELLIS, W. A. Animal leptospirosis. **Curr Top Microbiol Immunol**. v.387, 2015, p.99-137.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**, 2ª edição, Melbourne, 1999.

FELIX, S. R.; HARTWIG, D. D.; ARGONDIZZO, A. P.; SILVA, E. F.; SEIXAS, F. K.; NETO, A. C.; MEDEIROS, M. A.; LILENBAUM, W.; DELLAGOSTIN, O. A. Subunit approach to evaluation of the immune protective potential of leptospiral antigens. **Clin Vaccine Immunol**. n.18, 2011, p.2026-2030.

FERNANDES, L. G.; SIQUEIRA, G. H.; TEIXEIRA, A. R. F.; SILVA, L. P.; FIGUEREDO, J. M.; COSATE, M. R.; VIEIRA, M. L.; NASCIMENTO, A. L. T. *Leptospira* spp: novel insights into host-pathogen interactions. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.176, 2016, p.50-57.

HAAKE, D. A.; LEVETT, P. N. Leptospirosis in humans. **Curr Top Microbiol Immunol**. v.387, 2015, p.65-97.

HAMOND, C.; PESTANA, C. P.; MEDEIROS, M. A.; LILENBAUM, W. Molecular characterization and serology of *Leptospira kirschneri* (serogroup Grippotyphosa) isolated from urine of a mare pos-abortion in Brazil. **Zoonosis and Public Health**. v.63, n.3, 2016, p.191-195.

JIN, D.; OJCIUS, D. M.; SUN, D.; DONG, H.; LUO, Y.; MAO, Y.; YAN, J. *Leptospira interrogans* induces apoptosis in macrophages via caspase-8 and caspase-3-dependent pathways. **Infect Immun**. v.77, 2009, p.799-809.

KO, A. I.; REIS, M. R.; DOURADO, C. M. R.; JOHNSON, W. D.; RILEY, L. W.; The Salvador Leptospirosis study group urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **Lancet**. v.354, 1999, p.820-825.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**. v.14, n.2, 2001, p.296-326.

LEVETT, P. N. Systematics of *Leptospiaceae*. **Curr Top Microbiol Immunol**. v.387, 2015, p.11-20.

LI, L.; OJCIUS, D. M.; YAN, J. Comparison of invasion of fibroblasts and macrophages by high- and low-virulence *Leptospira* strains: colonization of the host-cell nucleus and induction of necrosis by the virulent strain. **Arch Microbiol**. v.188, 2007, p.591-598.

LILENBAUM, W. Atualização em leptospiroses bovinas. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v.18, n.1, 1996, p.9-13.

LOUREIRO, A. P.; HAMOND, C.; PINTO, P.; BREMONT, S.; BOURHY, P.; LILENBAUM, W. Molecular analysis of leptospires from serogroup Sejroe obtained from asymptomatic cattle in Rio de Janeiro – Brazil reveals genetic proximity to serovar Guaricura. **Research in Veterinary Science**. v.105, 2016, p.249-253.

- LUCAS, D. S. D.; LO, M.; BULACH, D. M.; QUINSEY, N. S.; MURRAY, G. L.; ALLEN, Andy; ADLER, Ben. Recombinant LipL32 stimulates interferon-gamma production in cattle vaccinated with a monovalent *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo subtype Hardjobovis vaccine. **Veterinary Microbiology**. v.169, 2014, p.163-170.
- MATSUI, M.; ROULEAU, V.; BRUYERE-OSTELLS, L. GOARANTE, C. Gene expression profiles of immune mediators and histopathological findings in animal models of leptospirosis: comparison between susceptible hamsters and resistant mice. **Infect. Immun**. v.79, 2011, p.4480- 4492.
- MUSSO, D.; SCOLA, B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge. **J Microbiol Immunol Infect**. v.46, 2013, p.245-252.
- NAIMAN, B. M.; ALT, D.; BOLIN, C. A.; ZUERNER, R.; BALDWIN, C. L. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and  $\gamma$  T lymphocytes. **Infection and immunity**. v.69, n.12, 2001, p.7550-7558.
- PICARDEAU, M.; BERTHERAT, E.C.; JANCLOES, M.; SKOULODIS, A. N.; DURSKI, K.; HARTSKEERLS, R. A rapid test for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v.78, 2014, p.1-8.
- PINNE, M.; HAAKE, D. A. A comprehensive approach to identification of surface-exposed, outer membrane-spanning proteins of *Leptospira interrogans*. **PLoS ONE**. v.4, 2009.
- PINTO, P. S.; LOUREIRO, A. P.; PENNA, B.; LILLENBAUM, W. Usage of *Leptospira* spp. local strains as antigens increases the sensitivity of the serodiagnosis of bovine leptospirosis. **Acta Tropica**. v.149, 2015, p.163-167.
- SETTE, A.; RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics. **Immunity**. v.33, 2010, p.530-541.
- SILVA, E. F.; MEDEIROS, M. A.; MCBRIDE, A. J.; MATSUNAGA, J.; ESTEVES, G. S.; RAMOS, J. G. R.; SANTOS, C. S.; CRODA, J.; HOMMA, A.; DELLAGOSTIN, O. A.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamsters model of leptospirosis. **Vaccine**. v.25, 2007, p.6277-6286.
- VASCONCELLOS, S. A.; OLIVEIRA, J. C. F.; MORAIS, M.; BARUSELLI, P. S.; AMARAL, R.; PINHEIRO, S. R.; FERREIRA, F.; FERREIRA, F. N. J. S.; SCHOUBERG, A.; HARTSKEERLS, R. A. Isolation of *Leptospira santarosai* serovar Guaricura from buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Vale do Ribeiro, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.32, 2001, p.298-300.

VIII. COPYRIGHT

Direitos autorais: Os autores são os únicos responsáveis pelo material incluído no artigo.

Submetido em: 10/01/2017 Aprovado em:10/02/2017

## 4.2 Artigo 2

### **Obtenção de proteínas recombinantes para o desenvolvimento de vacina contra a leptospirose bovina**

FORTES, Tanise Pacheco; SEIXAS NETO, Amilton Clair; MACHADO, Gilmar  
Batista; DEWES, Caroline; PACHECO, Paula Soares; DELLAGOSTIN, Odir Antônio;  
SILVA, Éverton Fagonde.

Artigo formatado segundo as normas da UFPel

## Obtenção de Proteínas Recombinantes para o Desenvolvimento de Vacina contra a Leptospirose Bovina

FORTES, Tanise Pacheco; SEIXAS NETO, Amilton Clair; MACHADO, Gilmar Batista; DEWES, Caroline; PACHECO, Paula Soares; DELLAGOSTIN, Odir Antônio; SILVA, Éverton Fagonde.

### Resumo

Leptospirose é uma zoonose de ocorrência mundial causada por espécies patogênicas de *Leptospira*. *Leptospira* tem a capacidade de infectar uma grande variedade de hospedeiros mamíferos. Na leptospirose bovina, os aspectos econômicos mais importantes são o nascimento de animais prematuros, com peso baixo, natimortos e abortos. Apesar da ampla vacinação com bacterinas, a leptospirose permanece prevalente nos rebanhos bovinos. Neste contexto, o objetivo do estudo foi expressar e avaliar a antigenicidade de proteínas recombinantes para selecionar novos candidatos para o desenvolvimento de uma vacina recombinante contra a leptospirose bovina. As sequências codificadoras de quatro proteínas (LIC10463, LIC10498, LIC10666 e LIC11889) foram amplificadas através de PCR do DNA genômico de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni, clonadas e expressas em *Escherichia coli*, para posterior purificação através de cromatografia de afinidade. Todas as preparações foram reconhecidas através de sororreatividade com soro de pacientes convalescentes de leptospirose através de ensaios de immunoblot. Esses achados indicam que as proteínas recombinantes exibem potencial para posterior análises como candidatos vacinais.

**Palavras-chave:** *Leptospira*; vacinologia reversa; antígenos recombinantes

**Abstract**

Leptospirosis is a worldwide zoonosis caused by serovars of pathogenic *Leptospira* species. *Leptospira* has the capacity to infect a broad range of mammalian hosts. In bovine leptospirosis, the most important economic aspects of chronic leptospirosis are premature birth, reduced birth weight, stillbirth and abortion. Despite widespread vaccination with inactivated whole cell vaccines, leptospirosis remains prevalent in bovine populations. In this context, the objective of this study was to express and evaluate the antigenicity of recombinant proteins, in order to select new candidates for the development of a recombinant vaccine against bovine leptospirosis. The coding sequences of four proteins (LIC10463, LIC10498, LIC10666, and LIC11889) were amplified by PCR from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni, cloned, expressed in *Escherichia coli* and purified by affinity chromatography. All of the fragment preparations were recognized by seroreactivity with sera from leptospirosis patients in immunoblot analysis. These findings indicate that the recombinant proteins exhibited potential for further evaluation as vaccine candidates.

**Keywords:** *Leptospira*; reverse vaccinology; recombinant antigens.

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial causada por espécies patogênicas de *Leptospira* (ADLER, 2014). A doença é frequente em regiões de clima tropical, como o Brasil, onde aumentos na incidência costumam ser observados durante a estação chuvosa (BLANCO et al., 2016). Os hospedeiros suscetíveis adquirem a infecção através do contato com a urina, água ou solo contaminados com a bactéria (MURRAY, 2013). Depois de penetrar no organismo, a disseminação hematogênica das leptospiras acontece rapidamente, levando a órgãos como fígado, pulmões e rins, onde podem sobreviver por longos períodos (ADLER, 2014; BLANCO et al., 2016). Nos bovinos, a leptospirose causa falha reprodutiva, gerando perdas econômicas decorrentes da infertilidade e do aborto (BALAKRISHNAN; ROY, 2014). As vacinas disponíveis contra a leptospirose nessa espécie são bacterinas que induzem uma resposta imune humoral predominantemente contra o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano (ZENG et al., 2015). Nas leptospiras o LPS é uma estrutura altamente variável, possuindo diferenças significativas entre os sorovares da bactéria e tornando as bacterinas incapazes de fornecer proteção contra aqueles sorovares que não fazem parte da preparação vacinal (PINNE; HAAKE, 2009). Diante deste cenário, a identificação de fatores de virulência bacterianos reconhecidos durante os primeiros estágios da resposta imune e que possam ser utilizados no desenvolvimento de uma vacina recombinante capaz de fornecer proteção cruzada, tornou-se importante (GAMBERINI et al., 2005).

Nos últimos anos, o sequenciamento e a anotação dos genomas microbianos possibilitou a identificação de potenciais antígenos para o desenvolvimento de vacinas (GAMBERINI et al., 2005). As proteínas da membrana externa de leptospira (OMP), lipoproteínas e *Leptospiral immunoglobulin-like proteins* (Ligs) tem sido avaliadas como candidatos vacinais em modelo animal. Diferentes grupos de pesquisa já testaram a atividade protetora de proteínas recombinantes de *Leptospira* como vacinas, revelando que nem todas parecem capazes de conferir proteção parcial em hamsters contra o desafio com bactérias virulentas. Neste contexto, o trabalho teve como objetivo identificar, clonar, expressar e avaliar a antigenicidade de proteínas recombinantes de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130, visando selecionar novos candidatos para o desenvolvimento de uma vacina recombinante contra a leptospirose bovina.

Para a realização deste estudo, *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 (NASCIMENTO et al., 2004) foi cultivada em meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) líquido e mantida a 29°C em estufa bacteriológica. A extração do DNA genômico foi realizada utilizando kit comercial *illustra™ bacteria genomicPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare®). Para clonagem e expressão heteróloga, foram utilizadas as cepas *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen®) e *E. coli* BL21 Star (DE3) (ThermoFisher®), cultivadas a 37°C em meio Luria-Bertani (LB).

A seleção das sequências codificadoras foi realizada com base nas informações disponíveis no GenBank (NCBI) e a escolha foi baseada em informações sobre proteínas correspondentes, obtidas a partir de análises no banco de dados *UniProt Knowledgebase* (UniProt KB). Os *primers* foram desenhados com o auxílio do software Vector NTI 11 (Invitrogen®) e sítios para enzimas de restrição foram adicionados em cada uma das extremidades, permitindo a clonagem no vetor pAE de expressão heteróloga em *E. coli*. Após a extração do DNA genômico, os genes foram amplificados através da reação em cadeia da polimerase (PCR) e os amplicons foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 0,8% (SILVA et al., 2007). Os genes foram amplificados no vetor pAE (RAMOS et al., 2004) e utilizados para transformar células de *E. coli* TOP10 através de choque térmico. Os plasmídeos recombinantes resultantes foram utilizados para transformar a cepa *E. coli* BL21 Star (DE3) e a expressão dos genes LIC11889, LIC10666, LIC10498, LIC12666 e LIC10463 foi induzida pelo uso de isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). As proteínas resultantes foram purificadas através de cromatografia de afinidade com colunas de sefarose e níquel (Ni<sup>+2</sup>) e dialisadas para que voltassem à sua conformação original (SILVA et al., 2007). As proteínas recombinantes obtidas foram submetidas à eletroforese com gel 12% (SDS-PAGE) para estimar a massa molecular e a pureza das preparações. A quantificação dos lotes produzidos foi realizada pelo método de Bradford ou BCA. Para analisar a antigenicidade das proteínas recombinantes, as mesmas foram submetidas a um *Western Blotting* com um pool de soros obtidos de pacientes convalescentes de leptospirose (SILVA et al., 2007), utilizando-se para a detecção primária um anticorpo comercial de cabra anti-humano conjugado com peroxidase. A reação foi revelada com diaminobenzidina (DAB) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Neste estudo, cinco genes (LIC11889, LIC10666, LIC10498, LIC12666 e LIC10463) foram identificados através do uso de ferramentas de bioinformática e eficientemente amplificados a partir do DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 através de PCR (Figura 1).

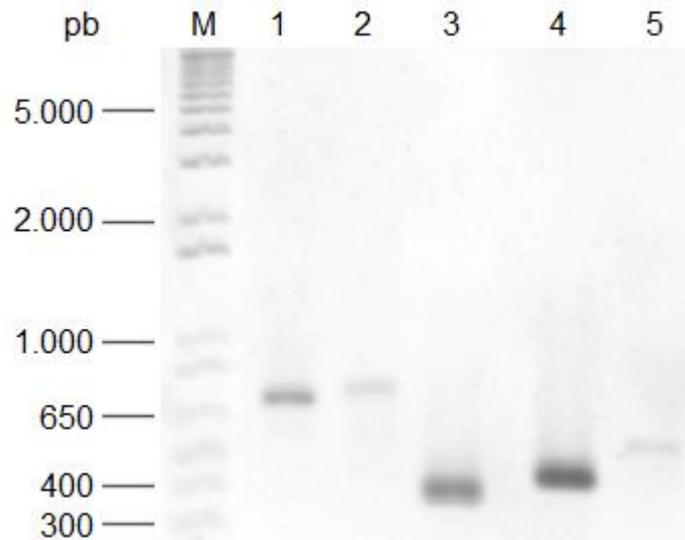


Figura 1 – Amplificação dos genes selecionados por PCR. (M) Marcador de peso molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen®); (1) LIC11889 - 855 pb; (2) LIC10498 – 890 pb; (3) LIC10666 – 338 pb; (4) LIC12666 – 405 pb; e (5) LIC10463 – 496 pb.

Os clones recombinantes foram selecionados através de triagem e os vetores recombinantes foram detectados através de visualização em gel de agarose 0,8%. A digestão enzimática foi realizada com o objetivo de confirmar a presença dos insertos no vetor pAE e resultou em um padrão de fragmentos com o tamanho esperado para cada uma das construções (dados não mostrados). As proteínas recombinantes rLIC11889, rLIC10666, rLIC10498 e rLIC10463 foram expressas na forma de corpúsculos de inclusão insolúveis e purificadas através de cromatografia de afinidade. A pureza, estabilidade e quantidade das proteínas obtidas foram avaliadas através de SDS-PAGE (Figura 2), enquanto a antigenicidade foi testada por *Western Blotting* (dados não mostrados). Não foi possível purificar o alvo LIC12666 e, dessa forma, este foi excluído da etapa de antigenicidade.

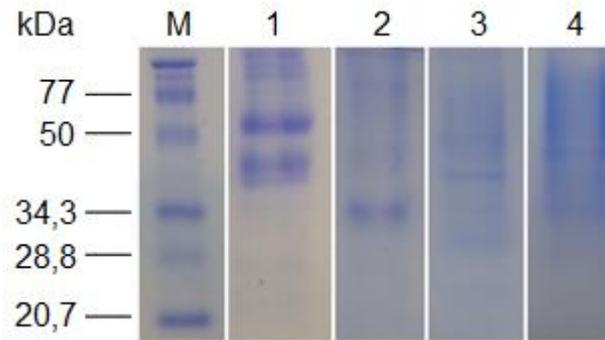


Figura 2 – Análise da pureza e aparente peso molecular das proteínas por SDS-PAGE. Todas as proteínas purificadas foram submetidas à SDS-PAGE 12% e coradas com coomassie blue. (M) Marcador de peso molecular; (1) LIC11889; (2) LIC10666; (3) LIC10463; e (4) LIC10498.

O ensaio de antigenicidade revelou que as proteínas expressas neste estudo reagiram com o pool de soros de pacientes convalescentes de leptospirose. Embora a caracterização da antigenicidade seja um passo importante para a identificação de novos candidatos vacinais, não existe confirmação de uma relação direta com a amplitude da resposta imune produzida e a proteção contra a leptospirose. A lipoproteína LipL32, por exemplo, a qual está exposta na superfície da bactéria, é altamente antigênica e imunogênica, mas não parece capaz de induzir imunidade protetora em modelo animal (MURRAY, 2013).

As vacinas disponíveis contra a leptospirose bovina não evoluíram muito nos últimos anos e continuam sendo principalmente bacterinas inativadas pelo calor. Essas bacterinas possuem importantes limitações, incluindo a falha em prevenir a transmissão da enfermidade, já que protegem contra os antígenos presentes na preparação (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Esse tipo de vacina requer o conhecimento dos principais sorovares causadores da enfermidade num determinado país ou região, para que sejam incluídas as cepas isoladas locais e aqueles sorovares mais prevalentes nos estudos sorológicos (MURRAY et al., 2013). No Brasil, assim como na América Latina, existe um grande potencial para o desenvolvimento de vacinas contra a leptospirose, adotando novas estratégias para a sua preparação e visando uma maior especificidade (DELLAGOSTIN et al., 2011).

Embora a imunidade contra a leptospirose seja predominantemente humoral, o mecanismo para a imunidade de bovinos é diferente (BALAKRISHNAN; ROY, 2014). Estudos demonstram que bovinos, mesmo com altos níveis de anticorpos

aglutinantes, não estavam protegidos da infecção por leptospiras. Apesar da transferência do soro desses bovinos para hamsters tenha induzido imunidade passiva nos roedores, a correlação da imunidade dos bovinos com a resposta Th1 medida pelo IFN- $\gamma$  resultou em consequências para o desenvolvimento de vacinas para essa espécie animal, sendo necessária a inclusão do sorvar Hardjo, considerado o principal causador da infecção em bovinos (NAIMAN et al., 2001).

Durante a infecção em mamíferos, as leptospiras patogênicas expressam antígenos que se tornam alvos da resposta imune do hospedeiro. Entre esses antígenos, encontram-se proteínas conservadas entre os diferentes sorovares de *Leptospira* e descritas como alvos importantes para o desenvolvimento de vacinas (GAMBERINI et al., 2005). Desde a última década, vários alvos proteicos foram identificados como potenciais candidatos vacinais visando o desenvolvimento de uma vacina recombinante contra a leptospirose. No entanto, a grande maioria dos alvos testados não foi capaz de conferir proteção significativa em modelo animal.

No presente estudo, cinco alvos proteicos foram identificados e amplificados a partir do genoma de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130. Destes, quatro alvos foram expressos na forma recombinante e purificados através da cromatografia de afinidade. Assim, essas proteínas constituem alvos potenciais para a utilização em ensaios de imunogenicidade e imunoproteção em modelo animal.

## Referências

ADLER, B. Pathogenesis of leptospirosis: cellular and molecular aspects. **Veterinary Microbiology**, v.172, p.353-358, 2014.

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v.3-4, n.140, p.287-296, 2010.

BALAKRISHNAN, G.; ROY, P. Comparison of efficacy of two experimental bovine leptospira vaccines under laboratory and field. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.159, p.11-15, 2014.

BLANCO, R. M.; SANTOS, L. F.; GALLOWAY, R.L.; ROMERO, E. C. Is the microagglutination test (MAT) good for predicting the infecting serogroup for leptospirosis in Brazil? **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.44, p.34-36, 2016.

DELLAGOSTIN, O. A.; GRASSMANN, A. A.; HARTWIG, D. D.; FELIX, S. R.; SILVA, E. F.; MCBRIDE, A. J. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Human Vaccines**, v.7, p.1215-1224, 2011.

GAMBERINI, M.; GOMEZ, R. M.; ATZINGEN, M. V.; MARTINS, E. A. L.; VASCONCELLOS, S. A.; ROMERO, E. C.; LEITE, L. C. C.; HO, P. L.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. **FEMS Microbiology Letters**, v.244, p.305-313, 2005.

MURRAY, G. L. The lipoprotein LipL32, an enigma of leptospiral biology. **Veterinary Microbiology**, v.162, p.305-314, 2013.

NAIMAN, B. M.; ALT, D.; BOLIN, C. A.; ZUERNER, R.; BALDWIN, C. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and T lymphocytes. **Infection and immunity**, v.69, n.12, p.7550-7558, 2001.

NASCIMENTO, A. L.; KO, A. I.; MARTINS, E. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; HO, P. L.; HAAKE, D. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; HARTSKEERL, R. A.; MARQUES, M. V.; OLIVEIRA, M. C.; MENCK, C. F.; LEITE, L. C.; CARRER, H.; COUTINHO, L. L.; DEGRAVE, W. M.; DELLAGOSTIN, O. A.; EL-DORRY, H.; FERRO, E. S.; FERRO, M. I.; FURLAN, L. R.; GAMBERINI, M.; GIGLIOTI, E. A.; GOES-NETO, A.; GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. H.; HARAKAVA, R.; JERONIMO, S. M.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; KIMURA, E. T.; KURAMAE, E. E.; LEMOS, E. G.; LEMOS, M. V.; MARINO, C. L.; NUNES, L. R.; OLIVEIRA, R. C.; PEREIRA, R.; SCHRIEFER, A.; SIQUEIRA, W. J.; SOMMER, P.; TSAI, S. M.; SIMPSON, A. J.; FERRO, J. A.; CAMARGO, L. E.; KITAJIMA, J. P.; SETUBAL, J. C.; VAN SLUYS, M. A. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **Journal of Bacteriology**, v.186, p.2164-2172, 2004.

PINNE, M.; HAAKE, D. A. A comprehensive approach to identification of surface-exposed, outer membrane-spanning proteins of *Leptospira interrogans*. **PLoS ONE**, v.4, e6071, doi:10.1371/journal.pone.0006071, 2009.

RAMOS, C. R.; ABREU, P. A.; NASCIMENTO, A. L.; HO, P. L. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, p. 1103-1109, 2004.

SILVA, E. F.; MEDEIROS, M. A.; MCBRIDE, A. J.; MATSUNAGA, J.; ESTEVES, G. S.; RAMOS, J. G. R.; SANTOS, C. S.; CRODA, J.; HOMMA, A.; DELLAGOSTIN, O. A.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamsters model of leptospirosis. **Vaccine**, v.25, p.6277-6286, 2007.

ZENG, L.; ZHUANG, X.; HUANG, L.; ZHANG, Y.; CHEN, C.; DONG, K.; ZHANG, Y.; CUI, Z.; DING, X.; CHANG, Y.; GUO, X.; ZHU, Y. Comparative subproteome analysis of three representative *Leptospira interrogans* vaccine strains reveals cross-reactive antigens and novel virulent determinants. **Journal of Proteomics**, v.112, p.27-37, 2007.

### 4.3 Artigo 3

#### **Vacinação com duas novas proteínas recombinantes confere imunidade protetora parcial em hamsters contra a leptospirose letal**

FORTES, Tanise Pacheco; SEIXAS NETO, Amilton Clair; MACHADO, Gilmar Batista; DEWES, Caroline; PACHECO, Paula Soares; DELLAGOSTIN, Odir Antônio; SILVA, Éverton Fagonde.

Artigo formatado segundo as normas da UFPel

## **Vacinação com duas novas proteínas recombinantes confere imunidade protetora contra infecção letal em Hamster**

FORTES, Tanise Pacheco; SEIXAS NETO, Amilton Clair; DEWES, Caroline; MACHADO, Gilmar Batista; PACHECO, Paula Soares; DELLAGOSTIN, Odir Antônio; SILVA, Éverton Fagonde

### **Resumo**

A leptospirose é uma zoonose negligenciada de ocorrência mundial. Em países em desenvolvimento, como Brasil, a doença é um grave problema de saúde pública e veterinária. No ambiente rural, o bovino é um dos principais reservatórios de *Leptospira* e as vacinas disponíveis são bacterinas incapazes de fornecer proteção cruzada contra os diferentes sorovares da bactéria. Neste estudo, avaliamos a capacidade de duas proteínas recombinantes (rLIC11889 e rLIC10666) de conferir proteção em modelo animal após desafio homólogo. Individualmente ou associadas, as proteínas emulsificadas com adjuvante oleoso foram capazes de proteger 100% dos animais desafiados com cepa virulenta homóloga. Os achados indicam que rLIC11889 e rLIC10666 podem ser consideradas como candidatos vacinais em potencial para o desenvolvimento de uma vacina recombinante contra a leptospirose bovina.

**Palavras-chave:** leptospirose; vacina de subunidade; bovinos; proteínas recombinantes; vacinologia reversa

**Abstract**

Leptospirosis is a neglected zoonosis of worldwide occurrence. In developing countries, such as Brazil, the disease is a serious veterinary and public health problem. In the rural environment, bovine is one of the main reservoirs of *Leptospira* and the available vaccines are bacterins incapable of providing cross-protection against the different serovars of the bacterium. In this study, we evaluated the ability of two recombinant proteins (rLIC11889 and rLIC10666) to confer protection in animal model after homologous challenge. Individually or in association, proteins emulsified with oily adjuvants were able to protect 100% of challenged animals with virulent homologous strain. The findings indicate that rLIC11889 and rLIC10666 may be considered as potential vaccine candidates for the development of a recombinant vaccine against bovine leptospirosis.

**Keywords:** leptospirosis; subunit vaccine; bovine; recombinant proteins; reverse vaccinology

## Introdução

A leptospirose é uma zoonose causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* (ADLER, 2015a), sendo considerada uma doença tropical negligenciada (HOTEZ; FERRIS, 2006). A incidência da enfermidade é elevada em países com clima tropical, sendo encontrada em ambientes urbanos e rurais (REIS et al., 2008). Nos países em desenvolvimento, a leptospirose é um problema grave de saúde pública e a variedade de sintomas relacionados à doença faz com que o número real de casos seja desconhecido (KO et al., 2009). Estima-se que em 2015, a doença tenha resultado na morte de aproximadamente 60 mil pessoas no mundo (COSTA et al., 2015).

Nos bovinos, a doença causa falha reprodutiva, gerando perdas econômicas decorrentes da infertilidade e do aborto (LOUREIRO et al., 2016). No ambiente rural, o bovino é um dos principais reservatórios do agente, sendo o sorovar Hardjo o mais comumente associado nas infecções (BHARTI et al., 2003). Entretanto, a severidade da doença e das lesões apresentadas está diretamente associada ao sorovar envolvido no surto (KO et al., 2009; ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

Atualmente, as medidas disponíveis para a prevenção e controle da leptospirose em bovinos ainda são consideradas ineficazes. As vacinas disponíveis são bacterinas que induzem resposta imune humoral predominantemente contra o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), não fornecem proteção cruzada contra os diferentes sorovares da bactéria e podem causar efeitos colaterais (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; ZENG et al., 2015). Isso deve-se ao alto nível de variação encontrado no LPS, que possui diferenças significativas entre os mais de 250 sorovares de *Leptospira* (LEVETT, 2015).

A identificação de fatores de virulência da bactéria que sejam reconhecidos durante a resposta imune é de grande importância para o desenvolvimento de uma vacina recombinante para a leptospirose humana e animal (GUERREIRO, 2001; GAMBERINI et al., 2005). Nos últimos anos, proteínas da membrana externa (OMP), lipoproteínas e as *Leptospiral immunoglobulin-like proteins* (Ligs) tem sido avaliadas como candidatos vacinais em modelo animal, resultando em estratégias promissoras para a prevenção da leptospirose (SILVA et al., 2007). Neste estudo, duas proteínas

recombinantes foram emulsificadas em adjuvante oleoso e testadas em modelo animal a fim de avaliar a capacidade de proteger os hamsters ao desafio letal homólogo com leptospiros virulentas.

## Material e Métodos

**Cepas, condições de cultivo e extração de DNA.** *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 foi cultivada em meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) líquido enriquecido com suplemento comercial e mantida a 29°C em estufa bacteriológica. A extração do DNA genômico foi realizada através do kit comercial *illustra™ bacteria genomicPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare®). Para clonagem e expressão heteróloga, foram usadas as cepas *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen®) e *E. coli* BL21 Star (DE3) (Invitrogen®), cultivadas a 37°C em meio Luria-Bertani (LB).

**Escolha das sequências codificadoras e desenho dos *primers*.** A escolha das sequências codificadoras foi realizada a partir de informações genômicas disponíveis no GenBank (NCBI) e de dados sobre proteínas correspondentes, obtidas de análises realizadas no banco de dados *UniProt Knowledgebase* (UniProtKB). As sequências selecionadas para o trabalho (LIC11889 e LIC10666) parecem estar relacionadas a processos patogênicos da bactéria e não foram avaliadas quanto à imunoproteção por nosso grupo de pesquisa. O software Vector NTI11 foi utilizado para desenhar os *primers* e sítios para enzimas de restrição foram adicionados nas extremidades das sequências, permitindo a clonagem no vetor pAE de expressão heteróloga em *E. coli*.

**Clonagem e expressão das proteínas recombinantes.** A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada para amplificar as sequências escolhidas a partir do DNA genômico purificado de *L. interrogans* Copenhageni Fiocruz L1-130 com os seguintes pares de *primers*, LIC11889-F 5'-  
ACCATGGTTATCAATCACAACCTGAGTGC, LIC11889-R 5'-  
TTAGATCTGCTGCAGAAGCTT, LIC10666-F 5'-  
CGGGATCCCGCCGTAATAATTCTGG e LIC10666-R 5'-  
GGGAAGCTTTTAATTTTTTCCTGATTCATGATCT. Os produtos da PCR foram

visualizados por eletroforese em gel de agarose e clonados no plasmídeo pAE para expressão das proteínas recombinantes. As cepas transformadas de *E. coli* BL21 Star (DE3) foram cultivadas em meio LB suplementado com ampicilina e incubadas à 37°C até atingirem a fase log de crescimento. A expressão dos genes foi induzida com isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) na concentração final de 1mM. Após 3 horas, as culturas foram centrifugadas a 6.000 x *g* por 30 minutos a 4°C e os pellets foram armazenados a -20°C.

**Purificação das proteínas recombinantes.** Os pellets foram solubilizados com tampão (100mM Tris-base, 300mM NaCl, 8M uréia, 5mM Imidazol, pH 8,0), rompidos através de Sonicação e centrifugados à 10.000 x *g* por 30 minutos, numa temperatura de 4°C. O sobrenadante foi filtrado e as proteínas foram purificadas através de cromatografia de afinidade em coluna de sefarose carregada com níquel (Ni<sup>2+</sup>). Para avaliar a pureza das preparações, alíquotas das proteínas recombinantes foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%. Posteriormente, as proteínas foram dialisadas à 4°C com tampão (100mM Tris-base, 300mM NaCl) contendo concentrações decrescentes de uréia e tampão fosfato alcalino (PBS) *overnight*. As proteínas foram quantificadas utilizando o kit *BCA Protein Assay* (PIERCE®) e albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

**Imunização e desafio dos animais.** Hamsters (*Mesocricetus auratus*) fêmeas com idade de 4 semanas foram utilizadas para os ensaios de imunoproteção. Os animais foram divididos em seis grupos, sendo cada grupo composto por 6 animais, e imunizados no dia 0 (zero) e no dia 14 (tabela 1).

Tabela 1 – Delineamento para a vacinação dos hamsters com proteínas recombinantes e grupos controle.

Grupos Vacinais	Doses
PBS	300 µl
Bacterina	10 <sup>8</sup> células
PBS+adjuvante oleoso	300 µl + 50%
rLIC11889+adjuvante oleoso	50 µg + 50%
rLIC10666+adjuvante oleoso	50 µg + 50%
rLIC11889+rLIC10666+adjuvante oleoso	25 µg (de cada proteína) + 50%

As emulsões foram obtidas pela mistura da proteína recombinante com o adjuvante oleoso incompleto de Freund. Um grupo foi imunizado com uma emulsão do adjuvante incompleto de Freund com PBS (controle negativo). Todas as doses da vacina foram ajustadas para um volume final de 300µl. Amostras de sangue pré e pós-imunização foram obtidas através de flebotomia do plexo venoso retro-orbital. No 28º dia (duas semanas após a segunda dose), os animais foram desafiados pela via intraperitoneal, com 1000 leptospiras da cepa homóloga Fiocruz L1-130, referente a 20 vezes a DL50% (Silva et al., 2007).

**Aspectos Éticos.** Todos os procedimentos foram realizados conforme às diretrizes do CONCEA. Este projeto está cadastrado no COCEPE/UFPel (50502153) e possui parecer favorável para a execução (CEEA 5237).

**Análise estatística.** As análises estatísticas e os gráficos de sobrevivência foram realizados no programa *GraphPad Prisma 7 for Windows versão 7.02*. O teste de Logrank foi usado para determinar diferenças significativas na sobrevivência entre os grupos vacinados e o controle negativo. Para avaliar a mortalidade dos animais, foi usado o teste de Fisher. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## Resultados

**Amplificação das sequências codificadoras.** A amplificação dos genes a partir do DNA genômico da cepa Fiocruz L1-130 resultou em fragmentos com 855 pares de bases (pb) para LIC11889 e 338 pb para LIC10666 (Figura 1).

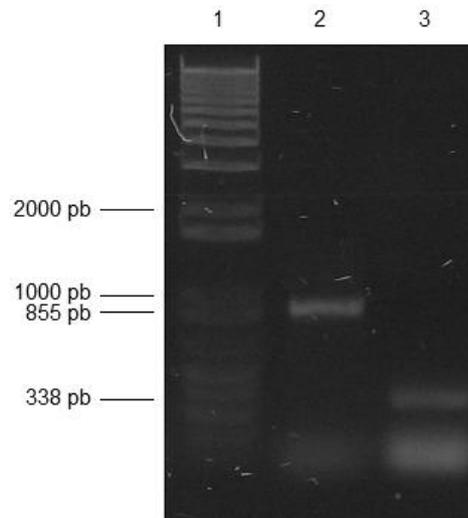


Figura 1 – Amplificação de LIC11889 e LIC10666 através de PCR. (1) Marcador de peso molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen); (2) amplificação de LIC11889 (855 pb); e (3) amplificação de LIC10666 (338 pb).

**Expressão das proteínas recombinantes.** A clonagem dos dois produtos de PCR, correspondendo à LIC11889 e LIC10666, no vetor pAE permitiram a purificação de proteínas a partir do cultivo de *E. coli* transformada (Figura 2). As proteínas foram expressas na forma de corpúsculos de inclusão, tornando a diálise necessária para obtenção de preparações solúveis.

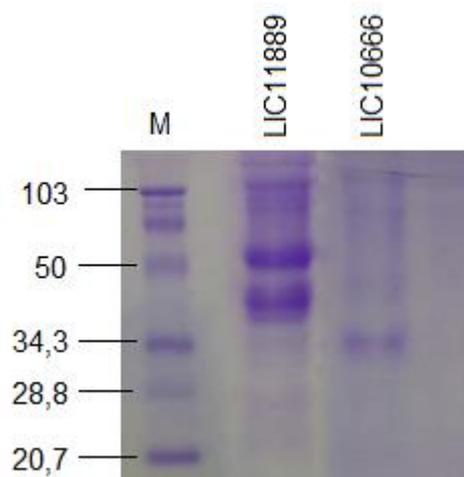


Figura 2 – Análise da pureza e aparente peso molecular das proteínas por SDS-PAGE 12%. (M) Marcador de peso molecular pré corado.

**Proteção conferida pela imunização com as proteínas recombinantes.** A imunização dos animais com as preparações de rLIC11889/adjuvante oleoso, rLIC10666/adjuvante oleoso, rLIC11889/rLIC10666/adjuvante oleoso e bacterinas (controle positivo) conferiram níveis de proteção iguais (100%) contra o desafio homólogo com dose letal. Por outro lado, nenhum dos animais nos grupos vacinados com PBS (controle negativo) e PBS/adjuvante oleoso (controle negativo) sobreviveram. A análise da mortalidade dos animais foi realizada através do teste de Fisher, comparando-se com o grupo controle negativo, a proteção conferida com significância estatística foi obtida com duas doses da bacterina (100%,  $p=0,0022$ ), duas doses de rLIC11889/adjuvante oleoso (100%,  $p=0,0022$ ), duas doses de rLIC10666/adjuvante oleoso (100%,  $p=0,0022$ ) e duas doses de rLIC11889/rLIC10666/adjuvante oleoso (100%,  $p=0,0022$ ). A análise de sobrevivência realizada através do teste de *Logrank*, revelou que os mesmos grupos de vacinas recombinantes e bacterinas conferiram proteção estatisticamente significativa aos animais ( $p=0,0162$ ), quando comparados ao grupo controle (Figura 3).

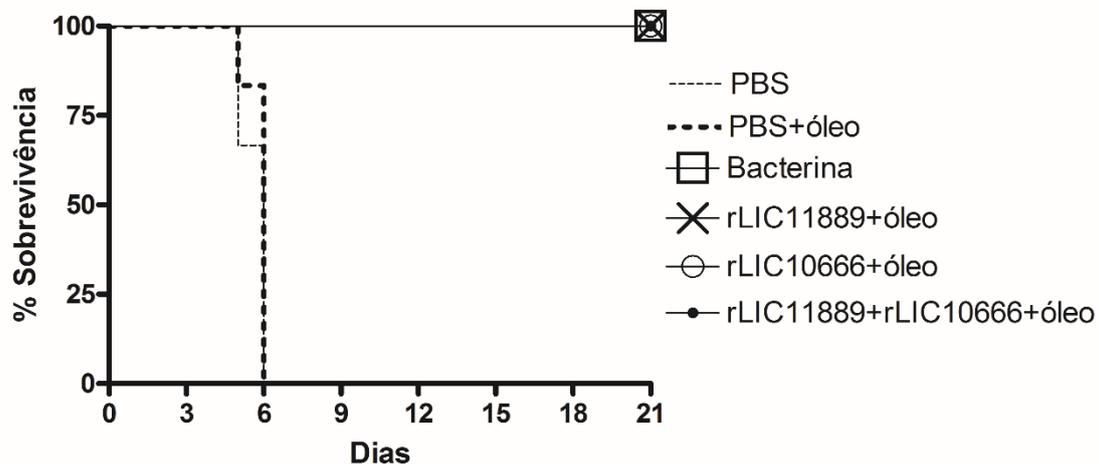


Figura 3 – Curvas de sobrevivência dos hamsters imunizados com as proteínas recombinantes e os controles após o desafio com a cepa homóloga virulenta.

## Discussão

No Brasil, apesar de ser subdiagnosticada, a leptospirose bovina é considerada como uma enfermidade endêmica e resulta em graves prejuízos para os produtores rurais. A doença que normalmente manifesta-se na forma crônica assintomática, apresenta elevados índices de abortos e animais natimortos, infertilidade de machos e fêmeas, e a redução na produção de leite (ELLIS, 2015). Além do importante impacto econômico, a doença nos bovinos é considerada como um fator de risco ocupacional para veterinários (PRESCOTT et al., 1992; LEVETT, 2001), magarefes (PRESCOTT et al., 1992; TERRY; TRENT; BARTLETT, 2000; GONÇALVES et al., 2006; DORJEE et al., 2011) e produtores rurais (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

A vacinação dos bovinos com as preparações vacinais disponíveis comercialmente visa proteger os animais e proteger os humanos que tem contato com eles (ELLIS 2015). A eficiência dos programas de vacinação em bovinos está diretamente relacionada com o conhecimento das cepas de *Leptospira* circulantes, a existência de animais domésticos suscetíveis nas propriedades, a presença de animais silvestres e as características climáticas e topográficas de cada região (CHIDEROLI et al., 2016). Além disso, as vacinas disponíveis induzem a uma imunidade de curta duração, não previnem a infecção e nem a eliminação de leptospiros através da urina pelos animais doentes (BOLIN et al., 2001).

Proteínas da membrana externa (OMP), lipoproteínas e adesinas de leptospiros são consideradas potenciais candidatos vacinais contra a enfermidade em humanos e animais (CULLEN et al., 2005; LUCAS et al., 2011). Entretanto, poucos alvos foram capazes de conferir proteção significativa em modelo animal (ADLER, 2015b). Nos últimos anos, estudos tem focado na identificação de proteínas conservadas nos diferentes sorovares de *Leptospira*, buscando um alvo capaz de conferir imunidade de amplo espectro (GAMBERINI et al., 2005).

As proteínas LipL32 e LigANI, por exemplo, foram capazes de conferir imunidade protetora em hamsters ao desafio homólogo em níveis que chegaram a 100% de proteção, porém nenhuma foi capaz de proteger animais ao desafio heterólogo (SILVA et al., 2007). As OMPs LIC10494 e LIC12730, por outro lado,

foram capazes de proteger os animais contra o desafio e aumentaram a sobrevivência de forma significativa (ATZINGEN et al., 2010). Infelizmente, a maior parte dos animais sobreviventes foi positiva para a presença de leptospirosas.

Estudos anteriores (HAAKE et al., 1999; CHANG et al., 2007) demonstraram que preparações vacinais incluindo duas ou mais proteínas podem ser mais efetivas do que aquelas incluindo apenas um componente. Embora a preparação rLIC11889/rLIC10666/adjuvante oleoso tenha sido capaz de proteger 100% dos animais testados ao final do experimento, esse foi o grupo que apresentou maior perda de peso após o desafio (dados não mostrados). Também é preciso analisar com cuidado as proteínas incluídas na preparação já que muitos fatores de virulência de *Leptospira* parecem ser redundantes (CRODA et al., 2008; MURRAY et al., 2009).

Embora o mecanismo de proteção na leptospirose ainda não seja totalmente conhecido, estudos tem demonstrado a contribuição das respostas imune humoral e celular contra a doença. Compreender a resposta imune envolvida é um passo importante para o desenvolvimento de vacinas contra a leptospirose (LUCAS et al., 2011). Em nosso estudo, as proteínas recombinantes administradas com adjuvante oleoso foram capazes de proteger os animais imunizados contra o desafio homólogo.

## Referências

- ADLER, B. History of leptospirosis and leptospira. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.387, p.1-9, 2015a.
- ADLER, B. Vaccines against leptospirosis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.387, p.251-272, 2015b.
- ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v.3-4, n.140, p.287-296, 2010.
- ATZINGEN, M. V.; GONCALES, A. P.; MORAIS, Z. M.; ARAUJO, E. R.; BRITO, T.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Characterization of leptospiral proteins that afford partial protection in hamsters against lethal challenge with *Leptospira interrogans*. **Journal of Medical Microbiology**, v.59, p.1005-1015, 2010.
- BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Diseases**, v.3, n.12, p.757-771, 2003.
- BOLIN, C. A.; ALT, D. P. Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, n.7, p.995-1000, 2001.
- CHANG, Y. F.; CHEN, C. S.; PALANIAPPAN, R. U. M.; HE, H.; MCDONOUGH, S. P.; BARR, S. C.; YAN, W.; FAISAL, S. M.; PAN, M. J.; CHANG, C. F. Immunogenicity of the recombinant leptospiral putative outer membrane proteins as a vaccine candidates. **Vaccine**, v.25, n.48, p.8190-8197, 2007.
- CHIDEROLI, R. T.; PEREIRA, U. P.; GONCALVES, D. D.; NAKAMURA, A. Y.; ALFIERI, A. A.; FREITAS, J. C. Isolation and molecular characterization of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo strain Hardjobovis in the urine of naturally infected cattle in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.15, n.1, 2016.
- COSTA, F.; HAGAN, J. E.; CALCAGNO, J.; KANE, M.; TORGERSON, P.; MARTINEZ-SILVEIRA, M. S.; STEIN, C.; ABELA-RIDDER, B.; KO, A. I. Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.9, e3898, doi:10.1371/journal.pntd.0003898, 2015.

CRODA, J.; FIGUEIRA, C. P.; WUNDER, E. A. JR.; SANTOS, C. S.; REIS, M. G.; KO, A. I.; PICARDEAU, M. Targeted mutagenesis in pathogenic leptospira species: disruption of the ligb gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. **Infection and Immunity**, v. 76, n.12, p.5826-5833, 2008.

CULLEN, P. A.; XU, X.; MATSUNAGA, J.; SANCHEZ, Y.; KO, A. I.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Surfaceome of *Leptospira* spp. **Infection and Immunity**, v.73, n.8, p.4853-4863, 2005.

DORJEE, S.; HEUER, C.; JACKSON, R.; WEST, D.M. Assessment of occupational exposure to leptospirosis in a sheep-only abattoir. **Epidemiology & Infection**, v.139, n.5, p.797-806, 2011.

ELLIS, W. A. Animal leptospirosis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.387, p.99-137, 2015.

FAINE, S. B.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. 2.ed. Melbourne, Australia: MediSci, 1999. 296p.

GAMBERINI, M.; GOMEZ, R. M.; ATZINGEN, M. V.; MARTINS, E. A. L.; VASCONCELLOS, S. A.; ROMERO, E. C.; LEITE, L. C. C.; HO, P. L.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. **FEMS Microbiology Letters**, v.244, p.305-313, 2005.

GONÇALVES, D. D.; TELES, P. S.; REIS, C. R.; LOPES, F. M. R.; FREIRE, R. L.; NAVARRO, I. T.; ALVES, L. A.; MULLER, E. E.; FREITAS, J. C. Seroepidemiology and occupational and environmental variables for leptospirosis, brucellosis and toxoplasmosis in slaughterhouse workers in the Paraná state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, n.3, p.135-140, 2006.

GUERREIRO, H.; CRODA, J.; FLANNERY, B.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; GALVAO, R. M.; LEVETT, P, N.; KO, A. I.; HAAKE, D. A. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. **Infection and Immunity**, v.69, p.4958-4968, 2001.

HAAKE, D. A.; MAZEL, M. K.; MCCOY, A. M.; MILWARD, F.; CHAO, G.; MATSUNAGA, J.; WAGAR, E. A. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. **Infection and Immunity**, v.67, n.12, p.6572-6582, 1999.

HOTEZ, P. J.; FERRIS, M. T. The antipoverty vaccines. **Vaccine**, v.24, n.31, p.5787-5799, 2006.

KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era. **Nature Reviews Microbiology**, v.7, p.736-747, 2009.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n.2, p.296-326, 2001.

LEVETT, P. N. Systematics of Leptospiraceae. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.387, p.11-20, 2015.

LOUREIRO, A. P.; HAMOND, C.; PINTO, P.; BREMONT, S.; BOURHY, P.; LILENBAUM, W. Molecular analysis of leptospires from serogroup Sejroe obtained from asymptomatic cattle in Rio de Janeiro – Brazil reveals genetic proximity to serovar Guaricura. **Research in Veterinary Science**, v.105, p.249-253, 2016.

LUCAS, D. S. D.; LO, M.; BULACH, D. M.; QUINSEY, N. S.; MURRAY, G. L.; ALLEN, A.; ADLER, B. Recombinant LipL32 stimulates interferon-gamma production in cattle vaccinated with a monovalent *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo subtype Hardjovovis vaccine. **Veterinary Microbiology**, v.169, p.163-170, 2014.

MURRAY, G. L.; MOREL, V.; CERQUEIRA, G. M.; CRODA, J.; SRIKRAM, A.; HENRY, R.; KO, A. I.; DELLAGOSTIN, O. A.; BULACH, D. M.; SERMSWAN, R. W.; ADLER, B.; PICARDEAU, M. Genome-wide transposon mutagenesis in pathogenic leptospira species. **Infection and Immunity**, v.77, n.2, p.810-816, 2009.

PRESCOTT, J.; GIGNAC, A.; NICHOLSON, V.; MARRIE, T. Prevalence of antibody to leptospiral serovars in veterinarians and slaughterhouse workers in Nova Scotia. **The Canadian Veterinary Journal**, v.33, n.4, p.276, 1992.

REIS, R. B.; RIBEIRO, G. S.; FELZEMBURGH, R. D.; SANTANA, F. S.; MOHR, S.; MELENDEZ, A. X.; QUEIROZ, A.; SANTOS, A. C.; RAVINES, R. R.; TASSINARI, W. S.; CARVALHO, M. S.; REIS, M. G.; KO, A. I. Impact of environment and social gradient on leptospira infection in urban slums. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.2, n.4, p.228, 2008.

SILVA, E. F.; MEDEIROS, M. A.; MCBRIDE, A. J.; MATSUNAGA, J.; ESTEVES, G. S.; RAMOS, J. G.; SANTOS, C. S.; CRODA, J. HOMAA, A.; DELLAGOSTIN, O. A.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. The terminal portion of Leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamsters model of leptospirosis. **Vaccine**, v.25, p.6277-6286, 2007.

TERRY, J.; TRENT, M.; BARTLETT, M. A cluster of leptospirosis among abattoir workers. **Communicable diseases intelligence**, v.24, n.6, p.158-158, 2000.

ZENG, L.; ZHUANG, X.; HUANG, L.; ZHANG, Y.; CHEN, C.; DONG, K.; ZHANG, Y.; CUI, Z.; DING, X.; CHANG, Y.; GUO, X.; ZHU, Y. Comparative subproteome analysis of three representative *Leptospira interrogans* vaccine strains reveals cross-reactive antigens and novel virulent determinants. **Journal of Proteomics**, v.112, p.27-37, 2015.

## 5 Considerações Finais

- De acordo com a revisão bibliográfica realizada em artigos dos últimos 20 anos, podemos concluir que a leptospirose bovina é uma enfermidade subdiagnosticada;
- Dos cinco alvos proteicos identificados e amplificados a partir do genoma de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130, quatro são alvos potenciais para ensaios de imunogenicidade e imunoproteção em modelo animal;
- As proteínas recombinantes rLIC11889 e rLIC10666 protegem os hamsters da leptospirose letal quando desafiados com cepa homóloga virulenta;
- A associação de rLIC11889 e rLIC10666 como preparação vacinal também protege os hamsters contra a leptospirose letal quando desafiados com cepa homóloga virulenta, mesmo utilizando-se metade da dose de avaliação individual.

## Referências

ADLER, B. Pathogenesis of leptospirosis: cellular and molecular aspects. **Veterinary Microbiology**. v.172, 2014, p. 353-358.

ADLER, B. History of leptospirosis and *Leptospira*. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.387, p.1-9, 2015a.

ADLER, B. Vaccines against leptospirosis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.387, p.251-272, 2015b.

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v.3-4, n.140, p.287-296, 2010.

ATZINGEN, M. V.; GONCALLES, A. P.; MORAIS, Z. M.; ARAUJO, E. R.; BRITO, T.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Characterization of leptospiral proteins that afford partial protection in hamsters against lethal challenge with *Leptospira interrogans*. **Journal of Medical Microbiology**, v.59, p.1005-1015, 2010.

BACKSTEDT, B. T.; BUYUKTANIR, O.; LINDOW, J.; WUNDER, E. A.; REIS, M. G.; USMANI-BROWN, S.; LEDIZET, M.; KO, A.; PAL, U. Efficient detection of pathogenic leptospires using 16S ribosomal RNA. **PLoS ONE**. v.10, n.16, p.1-18, 2015.

BALAKRISHNAN, G.; ROY, P. Comparison of efficacy of two experimental bovine leptospira vaccines under laboratory and field. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.159, p.11-15, 2014.

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICARDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Diseases**, v.3, n.12, p.757-771, 2003.

BLANCO, R. M.; SANTOS, L. F.; GALLOWAY, R. L.; ROMERO, E. C. Is the microagglutination test (MAT) good for predicting the infecting serogroup for leptospirosis in Brazil? **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**. v.44, p.34-36, 2016.

- BOLIN, C. A.; ALT, D. P. Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, n.7, p.995-1000, 2001.
- BULACH, D. M.; ZUERNER, R. L.; WILSON, P.; SEEMANN, T.; MCGRATH, A.; CULLEN, P. A.; DAVIS, J.; JOHNSON, M.; KUCZEK, E.; ALT, D. P.; PETERSON-BURCH, B.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; DAVIES, J. K.; ADLER, B. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. **PNAS**. v.103, n.39,p.14560-14565, 2006.
- BUYUTIMKIN, B.; SAIER, M. H. Comparative genomic analyses of transport proteins encoded with the genomes of *Leptospira* species. **Microbial Pathogenesis**, v.88, p.52-64. 2015.
- CAMERON, C. E. Leptospiral structure, physiology, and metabolism. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.387, p.21-42, 2015.
- CHANG, Y. F.; CHEN, C. S.; PALANIAPPAN, R. U. M.; HE, H.; MCDONOUGH, S. P.; BARR, S. C.; YAN, W.; FAISAL, S. M.; PAN, M. J.; CHANG, C. F. Immunogenicity of the recombinant leptospiral putative outer membrane proteins as a vaccine candidates. **Vaccine**, v.25, n.48, p.8190-8197, 2007.
- CHIDEROLI, R. T.; PEREIRA, U. P.; GONÇALVES, D. D.; NAKAMURA, A. Y.; ALFIERI, A. A.; FREITAS, J. C. Isolation and molecular characterization of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo strain Hardjobovis in the urine of naturally infected cattle in Brazil. **Genetics and Molecular Research**. v.15, n.1, 2016.
- COSTA, F.; HAGAN, J. E.; CALCAGNO, J.; KANE, M.; TORGERSON, P.; MARTINEZ-SILVEIRA, M. S.; STEIN, C.; ABELA-RIDDER, B.; KO, A. I. Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.9, e3898, doi:10.1371/journal.pntd.0003898, 2015.
- CRODA, J.; FIGUEIRA, C. P.; WUNDER, E. A. JR.; SANTOS, C. S.; REIS, M. G.; KO, A. I.; PICARDEAU, M. Targeted mutagenesis in pathogenic leptospira species: disruption of the *ligB* gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. **Infection and Immunity**, v. 76, n.12, p.5826-5833, 2008.
- CULLEN, P. A.; XU, X.; MATSUNAGA, J.; SANCHEZ, Y.; KO, A. I.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Surfaceome of *Leptospira* spp. **Infection and Immunity**, v.73, n.8, p.4853-4863, 2005.

DELLAGOSTIN, O. A.; GRASSMANN, A. A.; HARTWIG, D. D.; FELIX, S. R.; SILVA, E. F.; MCBRIDE, A. J. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Human Vaccine**, v.7, n.11, p.1215-1224, 2011.

DELLAGOSTIN, O. A.; GRASSMANN, A. A.; RIZZI, C.; SCHUCH, R. A.; JORGE, S.; OLIVEIRA, T. L.; MCBRIDE, A. J. A.; HARTWIG, D. D. Reverse vaccinology: an approach for identifying leptospiral vaccine candidates. **International Journal of Molecular Science**, v.18, n.1, doi:10.3390/ijms18010158, 2017.

DORJEE, S.; HEUER, C.; JACKSON, R.; WEST, D.M. Assessment of occupational exposure to leptospirosis in a sheep-only abattoir. **Epidemiology & Infection**, v.139, n.5, p.797-806, 2011.

ELLIS, W. A. Animal leptospirosis. **Current Topics in Microbiology and Immunology** v.387, p.99-137, 2015.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**, 2<sup>a</sup> edição, Melbourne, 1999.

FELIX, S. R.; HARTWIG, D. D.; ARGONDISSO, A. P.; SILVA, E. F.; SEIXAS, F. K.; NETO, A. C.; MEDEIROS, M. A.; LILENBAUM, W.; DELLAGOSTIN, O. A. Subunit approach to evaluation of the immune protective potential of leptospiral antigens. **Clinical Vaccine Immunology**, n.18, p.2026-2030, 2011.

FERNANDES, L. G.; SIQUEIRA, G. H.; TEIXEIRA, A. R. F.; SILVA, L. P.; FIGUEREDO, J. M.; COSATE, M. R.; VIEIRA, M. L.; NASCIMENTO, A. L. T. *Leptospira* spp: novel insights into host-pathogen interactions. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.176, p.50-57, 2016.

FORNAZARI, F. S.; RICHINI-PEREIRA, R. C.; BESERRA, V. B.; LUVIZOTTO, M. C.; LANGONI, H. Comparison of conventional PCR, quantitative PCR, bacteriological culture and the Warthin Starry technique to detect *Leptospira* spp. in kidney and liver samples from naturally infected sheep from Brazil. **Journal of Microbiology Methods**, v.90, p.321-326, 2012.

GAMBERINI, M.; GOMEZ, R. M.; ATZINGEN, M. V.; MARTINS, E. A. L.; VASCONCELLOS, S. A.; ROMERO, E. C.; LEITE, L. C. C.; HO, P. L.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. **FEMS Microbiology Letters**, v.244, p.305-313, 2005.

GONÇALVES, D. D.; TELES, P. S.; REIS, C. R.; LOPES, F. M. R.; FREIRE, R. L.; NAVARRO, I. T.; ALVES, L. A.; MULLER, E. E.; FREITAS, J. C. Seroepidemiology and occupational and environmental variables for leptospirosis, brucellosis and toxoplasmosis in slaughterhouse workers in the Paraná state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, n.3, p.135-140, 2006.

GRASSMANN, A. A.; FELIZ, S. R.; DOS SANTOS, C. X.; AMARAL, M. G.; SEIXAS NETO, A. C.; FAGUNDES, M. Q.; SEIXAS, F. K.; SILVA, E. F.; CONCEIÇÃO, F. R.; DELLAGOSTIN, O. A. Protection against lethal leptospirosis after vaccination with LipL32 coupled or co-administered with b subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Clinical Vaccine Immunology**, v.19, n.5, p.740-745, 2012.

GUERREIRO, H.; CRODA, J.; FLANNERY, B.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; GALVAO, R. M.; LEVETT, P, N.; KO, A. I.; HAAKE, D. A. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. **Infection and Immunity**, v.69, p.4958-4968, 2001.

HAAKE, D. A.; MAZEL, M. K.; MCCOY, A. M.; MILWARD, F.; CHAO, G.; MATSUNAGA, J.; WAGAR, E. A. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. **Infection and Immunity**, v.67, n.12, p.6572-6582, 1999.

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

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. Leptospira: a spirochaete with a hybrid outer membrane. **Molecular Microbiology**, v.77, n.4, p.805-814, 2010.

HAMOND, C.; PESTANA, C. P.; MEDEIROS, M. A.; LILENBAUM, W. Molecular characterization and serology of *Leptospira kirschneri* (serogroup Grippotyphosa) isolated from urine of a mare pos-abortion in Brazil. **Zoonosis and Public Health**. v.63, n.3, p.191-195, 2016.

HARTSKEERL, R. A.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W. A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clinical Microbiology and Infection**, v.17, n.4, p.494-501, 2011.

HOTEZ, P. J.; FERRIS, M. T. The antipoverty vaccines. **Vaccine**, v.24, n.31, p.5787-5799, 2006.

JIN, D.; OJCIUS, D. M.; SUN, D.; DONG, H.; LUO, Y.; MAO, Y.; YAN, J. *Leptospira interrogans* induces apoptosis in macrophages via caspase-8 and caspase-3-dependent pathways. **Infection and Immunity**. v.77, p.799-809, 2009.

KO, A. I.; REIS, M. R.; DOURADO, C. M. R.; JOHNSON, W. D.; RILEY, L. W.; The Salvador Leptospirosis study group urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **Lancet**. v.354, p.820-825, 1999.

KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era. **Nature Reviews Microbiology**, v.7, p.736-747, 2009.

LAMBERT, A.; PICARDEAU, M.; HAAKE, D. A.; SERMSWAN, R. W.; SRIKRAM, A.; ADLER, B.; MURRAY, G. A. 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.2019-2025, 2012.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**. v.14, n.2, p.296-326, 2001.

LEVETT, P. N. Systematics of Leptosiraceae. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. v.387, p.11-20, 2015.

LI, L.; OJCIUS, D. M.; YAN, J. Comparison of invasion of fibroblasts and macrophages by high- and low-virulence *Leptospira* strains: colonization of the host-cell nucleus and induction of necrosis by the virulent strain. **Archives Microbiology**, v.188, p.591-598, 2007.

LILENBAUM, W. Atualização em leptospiroses bovinas. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v.18, n.1, p.9-13, 1996.

LOUREIRO, A. P.; HAMOND, C.; PINTO, P.; BREMONT, S.; BOURHY, P.; LILENBAUM, W. Molecular analysis of leptospires from serogroup Sejroe obtained from asymptomatic cattle in Rio de Janeiro – Brazil reveals genetic proximity to serovar Guaricura. **Research in Veterinary Science**. v.105, p.249-253, 2016.

LUCAS, D. S. D.; LO, M.; BULACH, D. M.; QUINSEY, N. S.; MURRAY, G. L.; ALLEN, A.; ADLER, B. Recombinant LipL32 stimulates interferon-gamma production in cattle vaccinated with a monovalent *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo subtype Hardjobovis vaccine. **Veterinary Microbiology**. v.169, p.163-170, 2014.

MATSUI, M.; ROULEAU, V.; BRUYERE-OSTELLS, L. GOARANT, C. Gene expression profiles of immune mediators and histopathological findings in animal models of leptospirosis: comparison between susceptible hamsters and resistant mice. **Infection and Immunity**. v.79, p.4480-4492, 2011.

MATSUNAGA, J.; BAROCCHI, M. A.; CRODA, J.; YOUNG, T. A.; SANCHEZ, Y.; SIQUEIRA, I.; BOLIN, C. A.; REIS, M. G.; RILEY, L. W.; HAAKE, D. A.; ALBERT, K. I. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Molecular Microbiology**, v.49, p.929-945, 2003.

MURRAY, G. L.; MOREL, V.; CERQUEIRA, G. M.; CRODA, J.; SRIKRAM, A.; HENRY, R.; KO, A. I.; DELLAGOSTIN, O. A.; BULACH, D. M.; SERMSWAN, R. W.; ADLER, B.; PICARDEAU, M. Genome-wide transposon mutagenesis in pathogenic leptospira species. **Infection and Immunity**, v.77, n.2, p.810-816, 2009.

MURRAY, G. L. The lipoprotein LipL32, an enigma of leptospiral biology. **Veterinary Microbiology**, v.162, p.305-314, 2013.

NASCIMENTO, A. L.; KO, A. I.; MARTINS, E. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; HO, P. L.; HAAKE, D. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; HARTSKEERL, R. A.; MARQUES, M. V.; OLIVEIRA, M. C.; MENCK, C. F.; LEITE, L. C.; CARRER, H.; COUTINHO, L. L.; DEGRAVE, W. M.; DELLAGOSTIN, O. A.; EL-DORRY, H.; FERRO, E. S.; FERRO, M. I.; FURLAN, L. R.; GAMBERINI, M.; GIGLIOTI, E. A.; GOES-NETO, A.; GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. H.; HARAKAVA, R.; JERONIMO, S. M.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; KIMURA, E. T.; KURAMAE, E. E.; LEMOS, E. G.; LEMOS, M. V.; MARINO, C. L.; NUNES, L. R.; OLIVEIRA, R. C.; PEREIRA, R.; SCHRIEFER, A.; SIQUEIRA, W. J.; SOMMER, P.; TSAI, S. M.; SIMPSON, A. J.; FERRO, J. A.; CAMARGO, L. E.; KITAJIMA, J. P.; SETUBAL, J. C.; VAN SLUYS, M. A. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **Journal of Bacteriology**, v.186, p.2164-2172, 2004.

MUSSO, D.; SCOLA, B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge. **Journal of Microbiology, Immunology and Infect.** v.46, p.245-252, 2013.

NAIMAN, B. M.; ALT, D.; BOLIN, C. A.; ZUERNER, R.; BALDWIN, C. L. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potente Th1 immunity comprising responses by CD4 and  $\gamma$ T lymphocytes. **Infection and immunity**. v.69, n.12, p.7550-7558, 2001.

PICARDEAU, M.; BRENOT, A.; SAINT GIRONS, I. First evidence for gene replacement in *Leptospira* spp inactivation of *L. biflexa* flaB results in non-motile mutants deficiente in endoflagella. **Molecular Microbiology**, v.40, n.1, p.189-199, 2001.

PICARDEAU, M.; BERTHERAT, E.C.; JANCLOES, M.; SKOULLOUDIS, A. N.; DURSKI, K.; HARTSKEERLS, R. A rapid test for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**. v.78, p.1-8, 2014.

PINNE, M.; HAAKE, D. A. A comprehensive approach to identification of surface-exposed, outer membrane-spanning proteins of *Leptospira interrogans*. **PLoS ONE**, v.4, e6071, doi:10.1371/journal.pone.0006071, 2009.

PINTO, P. S.; LOUREIRO, A. P.; PENNA, B.; LILENBAUM, W. Usage of *Leptospira* spp. local strains as antigens increases the sensitivity of the serodiagnosis of bovine leptospirosis. **Acta Tropica**. v.149, p.163-167, 2015.

PRESCOTT, J.; GIGNAC, A.; NICHOLSON, V.; MARRIE, T. Prevalence of antibody to leptospiral serovars in veterinarians and slaughterhouse workers in Nova Scotia. **The Canadian Veterinary Journal**, v.33, n.4, p.276, 1992.

RAMOS, C. R.; ABREU, P. A.; NASCIMENTO, A. L.; HO, P. L. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, p. 1103-1109, 2004.

REIS, R. B.; RIBEIRO, G. S.; FELZEMBURGH, R. D.; SANTANA, F. S.; MOHR, S.; MELENDEZ, A. X.; QUEIROZ, A.; SANTOS, A. C.; RAVINES, R. R.; TASSINARI, W. S.; CARVALHO, M. S.; REIS, M. G.; KO, A. I. Impact of environment and social gradient on leptospira infection in urban slums. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.2, n.4, p.228, 2008.

SEIXAS, F. K.; FERNANDES, C. H.; HARTWIG, D. D.; CONCEIÇÃO, F. R.; ALEIXO, J. A.; DELLAGOSTIN, O. A. Evaluation of different ways of presenting LipL32 to the immune system with the aim of developing a recombinant vaccine against leptospirosis. **Canadian Journal of Microbiology**, v.53, n.4, p.472-479, 2007.

SETTE, A.; RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics. **Immunity**. v.33, p.530-541, 2010.

SILVA, E. F.; MEDEIROS, M. A.; MCBRIDE, A. J.; MATSUNAGA, J.; ESTEVES, G. S.; RAMOS, J. G.; SANTOS, C. S.; CRODA, J. HOMAA, A.; DELLAGOSTIN, O. A.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. The terminal portion of Leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamsters model of leptospirosis. **Vaccine**, v.25, p.6277-6286, 2007.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology Evol**, v.28, p.2731-2739, 2011.

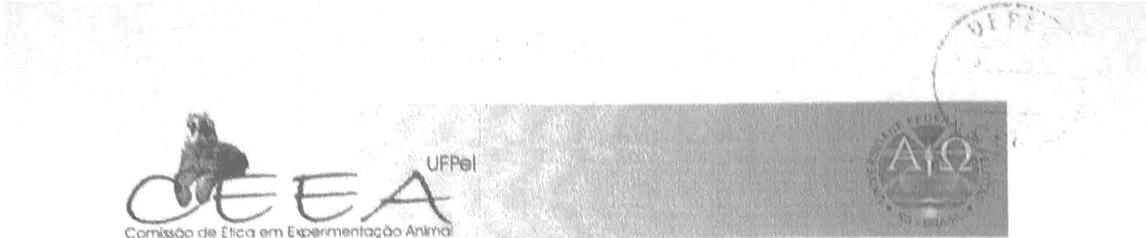
TERRY, J.; TRENT, M.; BARTLETT, M. A cluster of leptospirosis among abattoir workers. **Communicable diseases intelligence**, v.24, n.6, p.158-158, 2000.

VASCONCELLOS, S. A.; OLIVEIRA, J. C. F.; MORAIS, Z. M.; BARUSELLI, P. S.; AMARAL, R.; PINHEIRO, S. R.; FERREIRA, F.; FERREIRA, F. N. J. S.; SCHOUBERG, A.; HARTSKEERLS, R. A. Isolation of *Leptospira santarosai* serovar Guaricura from buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Vale do Ribeiro, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.32, 2001, p.298-300.

ZENG, L.; ZHUANG, X.; HUANG, L.; ZHANG, Y.; CHEN, C.; DONG, K.; ZHANG, Y.; CUI, Z.; DING, X.; CHANG, Y.; GUO, X.; ZHU, Y. Comparative subproteome analysis of three representative *Leptospira interrogans* vaccine strains reveals cross-reactive antigens and novel virulent determinants. **Journal of Proteomics**, v.112, p.27-37, 2015.

ZUERNER, R.; HAAKE, D.; ADLER, B.; SEGERS, R. Technological advances in the molecular biology of *Leptospira*. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v.2, p.455-462, 2000.

## **Anexos**

**Anexo I****Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) – UFPel**

Pelotas, 04 de Junho de 2012

**De:** Profa. Dra. Márcia de Oliveira Nobre*Vice- Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)***Para:** Professor Éverton Fagonde da Silva*Faculdade de Veterinária*

Senhor Professor:

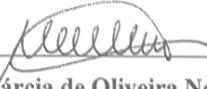
A CEEA analisou o projeto intitulado: **“Desenvolvimento de vacina recombinante contra a leptospirose bovina”**, processo nº23110.005237/2012-87, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

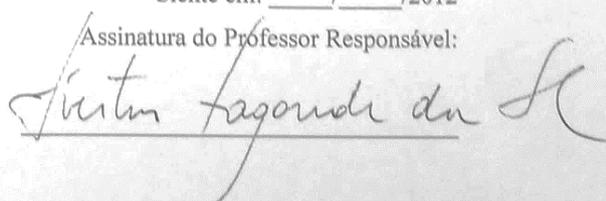
Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa e Iniciação Científica para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 5237).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

  
\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Márcia de Oliveira Nobre***Vice-Presidente da CEEA*Ciente em: 04, 06/2012

Assinatura do Professor Responsável:

  
\_\_\_\_\_  
**Éverton Fagonde da Silva**