

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Vacinas contra leptospirose: potencial
imunoprotetor do antígeno OmpL37**

Thaís Larré Oliveira

Pelotas, 2014

Thaís Larré Oliveira

Vacinas contra leptospirose: potencial imunoprotetor do antígeno OmpL37

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do Conhecimento: Biotecnologia).

Orientador: Odir Antônio Dellagostin

Coorientadora: Daiane Drawanz Hartwig

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

O48v Oliveira, Thaís Larré
 Vacinas contra leptospirose : potencial imunoprotetor do
 antígeno OmpL37 / Thaís Larré Oliveira. – 54f. : il. –
 Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em
 Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Centro de
 Desenvolvimento Tecnológico, 2014. – Orientador Odir
 Antonio Dellagostin ; coorientador Daiane Drawanz Hartwig.

 1.Biotecnologia. 2.Leptospirose. 3.Vacinologia de
 subunidade. 4.Vacina de DNA. 5.OmpL37. 6.*Prime-boost*.
 I.Dellagostin, Odir Antonio. II.Hartwig, Daiane Drawanz.
 III.Título.

CDD: 614.56

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alan John Alexander McBride (CDTec, UFPel)

Prof^a. Dr^a. Fabiana Kömmling Seixas (CDTec, UFPel)

Dr. Marco Alberto Medeiros (Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz)

Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin (Orientador - CDTec, UFPel)

Ao meu avô, Ruben, que certamente ficaria orgulhoso com a conclusão desta etapa.

Dedico.

Agradecimentos

A toda minha família, em especial aos meus pais, Cristina e Valter, e à minha irmã Júlia, pelo amor incondicional, por me incentivarem, me ouvirem com paciência e me mostrarem que sempre serão meu porto seguro.

Ao Lucas, por acreditar na minha capacidade, pela compreensão, suporte, companheirismo e por todo o amor e felicidade que traz pra minha vida.

Ao meu orientador, Odir Dellagostin, por todas as oportunidades desde a graduação, pela confiança depositada em mim, pela consideração, ensinamentos e palavras de estímulo.

À minha coorientadora Daiane Hartwig, pelo apoio, conselhos, orientação e incentivo. Ao professor Alan McBride, pela disponibilidade, ensinamentos e valiosa ajuda.

A todos que participaram deste trabalho, principalmente ao André, pela amizade, ajuda e altruísmo, não medindo esforços para auxiliar nos experimentos.

Aos colegas do laboratório de Vacinologia, do Biotério Central e da Biotecnologia como um todo, pelo apoio, excelente convívio e amizade. Entre estes, um agradecimento especial aos amigos Rodrigo, Samuel Félix, Amilton, Neida, Marcelle, Mariana Brutschin, Michele, Caroline Rizzi, Caroline Lucas e Mariana Remião.

Por fim, à Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela oportunidade de realizar o mestrado, e à CAPES pela concessão da bolsa.

Muito obrigada!

Resumo

OLIVEIRA, Thaís. **Vacinas contra leptospirose: potencial imunoprotetor do antígeno OmpL37**. 2014. 54f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A leptospirose é uma doença infecciosa emergente causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, com complicações humana e veterinária. Essa doença é transmitida através do contato direto com um animal reservatório ou com o ambiente contaminado com a urina destes animais. O desenvolvimento de vacinas seguras e multivalentes contra leptospirose, que substituam as bacterinas existentes, permanece um desafio. Bacterinas são reatogênicas e conferem imunidade sorovar-específica e de curta duração. Esforços para o desenvolvimento de vacinas recombinantes tem focado em proteínas de membrana externa (OMPs). A proteína de membrana externa OmpL37 é conservada entre diferentes sorovares de *Leptospira* e atua na adesão aos tecidos do hospedeiro. Neste estudo, nós relatamos pela primeira vez, a avaliação do potencial imunoprotetor de OmpL37 como antígeno vacinal em hamsters, sob diferentes estratégias: vacina de subunidade, vacina de DNA e *prime-boost*. A caracterização da resposta imune através de ELISA indireto e qRT-PCR demonstrou que os maiores níveis de IgG foram estimulados pela vacina de subunidade, a qual também induziu resposta inflamatória. A vacina de DNA falhou em induzir imunidade humoral, porém também estimulou TNF- α . Apesar da resposta induzida, nenhuma formulação protegeu significativamente os animais contra a doença.

Palavras-chave: leptospirose, OmpL37, vacina de subunidade, vacina de DNA, *prime-boost*.

Abstract

OLIVEIRA, Thaís. **Vaccines against leptospirosis: immunoprotective potential of the OmpL37 antigen.** 2014. 54f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Leptospirosis is an emerging infectious disease caused by pathogenic spirochetes of *Leptospira* genus, of human and veterinary concern. This infectious disease is transmitted through direct contact with an animal reservoir or an environmental contaminated with their urine. The development of safe and multivalent vaccines against leptospirosis, which replace existing bacterins, remains a challenge. Bacterins are reactogenic and afford serovar specific and short-term immunity. Efforts to develop recombinant vaccines against leptospirosis have focused on outer membrane proteins (OMPs). The outer membrane protein OmpL37 is conserved among different *Leptospira* serovars and plays a role in adherence to host tissues. In this study we report for the first time, the evaluation of OmpL37 immunoprotective potential as a vaccine antigen in hamsters, under different strategies: subunit vaccine, DNA vaccine and prime-boost. The characterization of the immune response by indirect ELISA and qRT-PCR showed that higher levels of IgG were stimulated by the vaccine subunit, which also induced an inflammatory response. The DNA vaccine failed to induce humoral immunity, but also stimulated TNF- α . Despite the induced response, no formulation significantly protected the animals against the disease.

Keywords: leptospirosis, OmpL37, subunit vaccine, DNA vaccine, *prime-boost*.

Lista de Abreviaturas

LPS – Lipopolissacarídeo

OMPs – *Outer Membrane Proteins* (Proteínas de membrana externa)

DMCs – *Dialysis Membrane Chambers* (Câmaras de membrana de diálise)

EMJH – Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris

FH – Fator H

C4BP – Proteína ligadora de C4b

TLR2 – Receptor do tipo Toll 2

TLR4 – Receptor do tipo Toll 4

MAT – Teste de aglutinação microscópica

ELISA – Ensaio imunoenzimático

PCR – Reação em cadeia da polimerase

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 A leptospirose	12
2.1.1 Agente etiológico	12
2.1.2 Patogênese	14
2.1.3. Imunidade	15
2.1.4 Epidemiologia e fontes de infecção	16
2.1.5 Sintomatologia	18
2.1.6 Diagnóstico e tratamento	18
2.2 Vacinas como medida profilática contra leptospirose	20
2.2.1 Vacinas convencionais e recombinantes	20
2.2.2 OmpL37 como alvo vacinal	21
3 HIPÓTESE E OBJETIVOS	23
3.1 Hipótese	23
3.2 Objetivo Geral	23
3.3 Objetivos Específicos	23
4 CAPÍTULOS	24
4.1 Artigo - Characterization of the Leptospira interrogans outer membrane protein OmpL37 as a potential vaccine candidate	24
5 CONCLUSÃO GERAL	49
6 REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO GERAL

A leptospirose é uma doença infecciosa causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. Apesar de ser considerada a zoonose de maior distribuição mundial, a leptospirose ainda é uma doença extremamente negligenciada devido às limitações dos métodos de diagnóstico disponíveis atualmente (Ko et al., 2009). Estima-se a ocorrência de 10 a 100 casos a cada 100 mil habitantes, com taxas de mortalidade de 10%, podendo atingir até 70% em casos de síndrome hemorrágica pulmonar, uma forma grave da doença (Hartskeerl et al., 2011). Além de representar um problema de saúde pública, a leptospirose também configura uma complicação veterinária, levando à perdas produtivas e reprodutivas nos animais (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010).

A infecção é contraída através do contato com animais carreadores da bactéria, principalmente roedores, ou com ambiente contaminado pela urina destes animais (Evangelista & Coburn, 2010). Sendo assim, países desenvolvidos e em desenvolvimento são afetados pela doença, que está associada com períodos de enchente, falta de saneamento básico, atividades ocupacionais e recreativas (Reis et al., 2008).

A medida profilática mais promissora para o controle da leptospirose, assim como de outras doenças infecciosas, é a vacinação. No entanto, as vacinas disponíveis hoje são baseadas em suspensões celulares mono ou polivalentes, inativadas por agentes químicos (fenol ou formaldeído) ou físicos (calor). Essas vacinas, as bacterinas, induzem imunidade de curta duração; estão associadas com reações adversas, sendo usadas em humanos apenas em poucos países; e não são universalmente eficazes na eliminação das leptospiras do organismo, a fim de bloquear a transmissão. O principal problema, porém, ainda é seu potencial protetor limitado aos sorovares presentes na vacina. Atualmente, são descritos cerca de 300 sorovares da bactéria, distribuídos em 20 espécies, o que dificulta a obtenção de uma vacina multivalente efetiva (Dellagostin et al., 2011).

O sequenciamento e anotação dos genomas das espécies patogênicas *L. interrogans* sorovares Lai e Copenhageni e *L. borgpetersenii* permitiu a identificação de alvos vacinais, como fatores de motilidade bacteriana, lipopolissacarídeo (LPS),

proteínas de membrana externa (OMPs) e fatores de virulência (Ko et al., 2009). Diferentes estratégias têm sido avaliadas, porém, até o momento nenhum estudo atendeu todas as características desejáveis de proteção cruzada, capacidade esterilizante e segurança vacinal. Assim, o desenvolvimento de uma vacina multivalente contra leptospirose permanece um desafio (Dellagostin et al., 2011).

OMPs são candidatas para o desenvolvimento de vacinas seguras e eficazes contra leptospirose. Em geral, são bem conservadas e podem desempenhar funções cruciais em mecanismos de virulência e na adaptação às condições ambientais (Coutinho et al., 2011). OmpL37 é conservada em sorovares patogênicos, reconhecida pelo soro de pacientes com leptospirose, tem sua expressão aumentada *in vivo* e em câmaras de membrana de diálise (DMCs) e apresenta a maior capacidade de ligação à elastina já descrita (Pinne et al., 2010; Matsui et al., 2012; Caimano et al., 2014). Portanto, sugere-se a participação desta proteína durante a patogênese, principalmente no que tange à adesão aos tecidos ricos em elastina, como paredes de vasos sanguíneos e pulmonares (Pinne et al., 2010).

As vacinas de subunidade são uma abordagem de vacinologia segura. Atualmente, já existem em uso várias vacinas de subunidade licenciadas pelos órgãos regulatórios competentes (Pertussis acelular, DT, hepatite B). Já as vacinas de DNA, são de fácil obtenção e capazes de induzir tanto resposta imune humoral quanto celular. A estratégia *prime-boost*, baseada em imunizações de DNA com uma dose reforço de proteína tem sido descrita como forma de aumentar e fortalecer a imunogenicidade (Hartwig et al., 2013).

Neste trabalho, nós avaliamos o potencial imunoprotetor de OmpL37 em três estratégias vacinais (DNA, subunidade e *prime-boost*), bem como a resposta imune humoral e celular induzida por estas formulações em hamsters.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A leptospirose

2.1.1 Agente etiológico

Espiroquetas são bactérias finas, helicoidais e de elevada motilidade, classificadas na Ordem Spirochaetales, que compreende três famílias: Brachyspiraceae, Spirochaetaceae e Leptospiraceae. Nesta última, se encontram as leptospiros, bactérias que medem cerca de 6-25 μm de comprimento e aproximadamente 0,2 μm de diâmetro e que podem ser distinguidas de outras espiroquetas pelo formato único de gancho presente nas extremidades da célula (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010).

As leptospiros apresentam uma estrutura de dupla membrana caracterizada pela forte associação entre a membrana citoplasmática e a camada de peptidoglicano - uma particularidade de bactérias Gram-positivas - as quais são envoltas por uma membrana externa composta por lipopolissacarídeo (LPS) e diversas proteínas, característica de bactérias Gram-negativas (Haake & Matsunaga, 2010). O LPS constitui o principal antígeno da leptospiro, sendo semelhante, porém menos tóxico que o encontrado em Gram-negativas. O lipídeo A leptospiral apresenta algumas características não usuais, como dissacarídeos de glucosamina os quais são fosforilados e metilados (Que-Gewirth et al., 2004). Ancorados ao peptidoglicano nas extremidades da bactéria, encontram-se dois flagelos que se prolongam pelo espaço periplasmático, entre as membranas interna e externa, e que são responsáveis pela motilidade, fundamental para a patogênese (Li et al., 2000).

O crescimento *in vitro* é fastidioso, com um tempo de geração típico de 6 a 8 h, e ocorre em condições de aerobiose obrigatória, em uma temperatura ótima de 30 °C e pH entre 7,2 e 7,6. O meio de cultivo Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), comercialmente disponível e largamente utilizado, é baseado em ácido oleico, albumina sérica bovina e polisorbato 80 (Tween), e é geralmente suplementado com soro de coelho ou suplementos comerciais (Bharti et al., 2003, Evangelista & Coburn, 2010). Em meio semi-sólido (0,1-0,2% de ágar), o crescimento é observado como um anel de células no local de tensão de oxigênio

ideal para as leptospiros, denominado disco de Dinger. A contaminação do meio pode ser inibida com a utilização de 5-fluoracil ou antibióticos como neomicina, ácido nalidíxico ou rifampicina (Levett, 2001).

Em condições adversas, de baixa concentração de nutrientes, é descrita a capacidade de formação de biofilme por algumas cepas de *Leptospira* spp. Essa característica se faz importante para a sobrevivência da bactéria fora dos limites do hospedeiro, permitindo a continuidade do seu ciclo de transmissão (Ristow et al., 2008).

Atualmente estão descritas 20 espécies para o gênero *Leptospira*, das quais 13 são patogênicas – *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii* e *L. wolffii* – e 7 saprófitas – *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. yanagawae*, *L. kmetyi*, *L. vanthielii*, *L. wolbachii* e *L. yanagawae*. Essas espécies estão agrupadas em mais de 300 sorovares, os quais estão distribuídos em 24 sorogrupos (Cerqueira & Picardeau, 2009). Esta classificação sorológica tem como base as variações antigênicas do LPS. Sorovares que contém determinantes antigênicos relacionados são reunidos em um mesmo sorogrupo (Ko et al., 2009).

O entendimento da biologia e da patogênese de *Leptospira* spp. avançou com o sequenciamento do genoma de duas espécies patogênicas - *L. interrogans* sorovares Lai e Copenhageni e duas cepas de *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo – e de uma espécie saprófita - duas cepas de *L. biflexa* sorovar Patoc. O genoma consiste em dois cromossomos circulares, com 4,3 Mb e 350 kb, com um conteúdo de GC entre 35% e 41%. *L. biflexa* apresenta, ainda, um terceiro replicon de 74 kb, envolvido com a sobrevivência da bactéria. O core do genoma leptospiral, identificado através de análise comparativa entre os genomas disponíveis, apresenta um total de 2052 genes (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010). Entre os genes únicos de espécies patogênicas, a grande maioria (> 50%) é de função desconhecida, sugerindo a existência de mecanismos de patogenicidade únicos em *Leptospira* spp. (Adler et al., 2011).

A descoberta do bacteriófago LE1 em *L. biflexa* levou ao desenvolvimento de um vetor *shuttle*, capaz de se replicar na espécie saprófita e em *Escherichia coli*, porém não nas espécies patogênicas. Estudos de mutagênese randômica, com a

utilização do transposon *Himar1 mariner*, e de mutagênese sítio-dirigida também permitiram a obtenção de mutantes importantes para elucidar a função de determinados genes e sua participação na virulência. Porém, os estudos genéticos ainda são limitados pelo crescimento fastidioso da bactéria, pela ausência de plasmídeos de ocorrência natural e em função de que os mecanismos de transferência gênica não estão elucidados (Adler et al., 2011, Evangelista & Coburn, 2010).

2.1.2 Patogênese

A morfologia privilegiada das leptospiiras permite sua entrada no organismo através da pele lesada ou membranas mucosas, seguido de sua rápida disseminação na corrente sanguínea (bacteremia), fase da doença que tem duração aproximada de 7 dias (Ko et al., 2009). A consequente migração pelos tecidos ocorre devido à capacidade da bactéria de atravessar e residir temporariamente no interior das células do hospedeiro, apesar de não ser um patógeno intracelular. Esse mecanismo favorece a evasão do sistema imune e a colonização dos órgãos do hospedeiro, como rins, pulmão e fígado (Barocchi et al., 2002).

Nesta fase inicial, a habilidade de ligação às células hospedeiras e aos componentes da matriz extracelular também contribui para a invasão e estabelecimento da doença. Diversas proteínas presentes na membrana externa já foram identificadas com propriedades de adesinas, possivelmente mediando a interação patógeno-hospedeiro. Esta redundância funcional, aliada à capacidade de variar o nível de expressão de algumas proteínas quando em diferentes condições ambientais e fisiológicas configura outra estratégia de escape da imunidade do hospedeiro a fim de estabelecer a infecção (Vieira et al., 2013).

Estudos de mutagênese demonstraram também a importância da motilidade para a patogênese de *Leptospira* spp. A inativação dos genes que codificam as proteínas FlaA e FlhY, componentes do flagelo leptospiral, levou a atenuação da virulência em modelo animal de hamster e *guinea pigs*, respectivamente (Lambert et al., 2012, Liao et al., 2009). A localização flagelar consiste em uma vantagem

evolutiva para estas bactérias, pois protege esta estrutura de variações externas e da ação de anticorpos anti-flagelares (Charon & Goldstein, 2002).

Além disso, as leptospiros podem persistir em sítios imunoprivilegiados, como os túbulos renais e câmara anterior e humor vítreo dos olhos, levando respectivamente, à sua excreção prolongada na urina e a um quadro de uveíte, mesmo meses após o contato com a bactéria (Ko et al., 2009). A colonização persistente dos túbulos renais é uma etapa essencial para a propagação e ciclo de transmissão da bactéria. Essa habilidade de sobreviver nos rins está relacionada com uma série de mecanismos, entre eles: o conteúdo aumentado do antígeno O do LPS nos rins quando comparado ao fígado; a redução da expressão de proteínas antigênicas e a formação de biofilme (Fraga et al., 2011).

Leptospiros patogênicos são, ainda, capazes de se ligar ao fator H (FH) e à proteína ligadora de C4b (C4BP), reguladores negativos das vias alternativa e clássica do sistema complemento, respectivamente (Barbosa et al., 2009, Meri et al., 2005). Segundo ensaios de ligação *in vitro* realizados até o momento, essa interação é mediada pelas seguintes proteínas de superfície: LenA, LenB, LcpA e proteínas da família Lig (Barbosa et al., 2010, Castiblanco-Valencia et al., 2012, Choy, 2012, Stevenson et al., 2007). Além disso, a secreção de proteases que inativam componentes chave dessas vias torna essas bactérias resistentes ao soro (Fraga et al., 2014).

A fim de elucidar esses diversos mecanismos de patogenicidade, outros fatores de virulência já foram identificados. Entre eles, as lipoproteínas de membrana externa Loa22 e LruA, a heme oxigenase e o LPS (Adler et al., 2011, Zhang et al., 2013).

2.1.3. Imunidade

O reconhecimento das leptospiros pelo sistema imune se dá através de receptores que reconhecem padrões moleculares associados aos patógenos, como por exemplo, o LPS. Enquanto que o LPS de Gram-negativas atua a nível de TLR4, o LPS leptospiral ativa macrófagos humanos via receptor Toll-like 2 (TLR2) (Werts et

al., 2001). Em camundongos, o reconhecimento do LPS se dá através de ambos os receptores TLR2 e TLR4, o que é essencial para o controle da leptospirose nesses animais, tornando-os resistentes à doença (Chassin et al., 2009). Ainda em relação à imunidade inata, a produção de espécies reativas de oxigênio (Murgia et al., 2002) e de peptídeos antimicrobianos (Wu et al., 1992) por neutrófilos são importantes no controle da leptospirose.

Considerando que as leptospirosas são patógenos extracelulares, a resposta imune é montada com base na produção de anticorpos e na ativação do sistema complemento. Os anticorpos produzidos durante a infecção, em sua maioria, são contra o LPS e são importantes na opsonização e na aglutinação das leptospirosas, no entanto, esta imunidade é limitada ao sorovar infectante (Fraga et al., 2011); estudos de imunização passiva com anticorpos anti-LPS demonstraram proteção contra a doença (Jost et al., 1986).

A resposta imune celular, apesar de pouco entendida, é associada à proteção contra infecção em bovinos, e envolve a produção de IFN- γ e a proliferação de linfócitos T CD4 $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ (Naiman et al., 2002). Além disso, a identificação de linfócitos T CD8 com especificidade por peptídeos derivados da proteína LigA em humanos infectados, demonstrou o envolvimento destas células na resposta imune contra leptospirose (Guo et al., 2010).

Complicações autoimunes decorrentes de inflamação local também parecem estar envolvidas em quadros clínicos de uveíte e hemorragia pulmonar. A reação cruzada de anticorpos contra as proteínas LruA e LruB de *Leptospira* spp. com proteínas dos olhos de equinos, reforça a hipótese de autoimunidade (Verma et al., 2010).

2.1.4 Epidemiologia e fontes de infecção

A leptospirose é uma doença de distribuição mundial porém, sua incidência é maior em regiões tropicais, nas quais o clima favorece a sobrevivência das leptospirosas no ambiente, variando de 10 a 100 casos a cada 100 mil habitantes (Hartskeerl et al., 2011). Em áreas endêmicas, como na Nicarágua, já foi descrito

como comum a infecção subclínica ou sem sintomas, sugerindo que uma imunidade protetora seja adquirida após infecções recorrentes nessas áreas (Bharti et al., 2003).

Nos países desenvolvidos, as atividades ocupacionais e recreativas, tais como medicina veterinária, mineração, pecuária e esportes aquáticos, configuram os principais riscos associados à leptospirose (Lim, 2011). Em países em desenvolvimento, como o Brasil, a rápida expansão das favelas produz condições ecológicas favoráveis – relacionadas ao precário sistema de saneamento básico e coleta de lixo – para a transmissão da bactéria através dos roedores (Maciel et al., 2008, Reis et al., 2008).

Estima-se a ocorrência de um milhão de casos severos de leptospirose humana ao ano, mundialmente, com uma letalidade média de 10% (Abela-Ridder et al., 2010). Ainda assim, sabe-se que a notificação dos casos, em geral, é subestimada, devido ao diagnóstico inacessível e limitado, aos sintomas generalizados na fase inicial da doença e aos serviços deficientes de vigilância sanitária, especialmente em países em desenvolvimento (Hotez et al., 2008).

A transmissão da leptospirose requer a circulação enzoótica contínua da leptospirosas entre os animais reservatórios, especialmente roedores. O estado de carreador renal nesses animais é um componente central para a persistência e epidemiologia da leptospirose. A excreção das leptospirosas na urina pode ser contínua e a concentração urinária da bactéria pode atingir até 10^8 células/mL (Ko et al., 2009).

Humanos não são fontes importantes no ciclo de transmissão da doença, e contraem a infecção através do contato direto com a urina/material biológico do animal infectado ou indireto, através do contato com o ambiente contaminado (Vijayachari et al., 2008). Associações características entre sorovares e hospedeiros específicos também são relatadas, como Canicola em cães, Bratislava em equinos e suínos e Hardjo em bovinos. Porém, estas relações não são obrigatórias nem definitivas, e suas bases moleculares não estão bem esclarecidas (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010).

2.1.5 Sintomatologia

A leptospirose segue um curso bifásico, com uma fase inicial de septicemia que dura entre 4 e 7 dias, seguido de uma fase imune, caracterizada pela produção de anticorpos específicos contra a bactéria e pelo quadro de leptospiúria. A sintomatologia da doença pode variar de acordo com a imunidade do hospedeiro, com o sorovar e com a dose infectante (Ko et al., 2009).

Muitos casos apresentam-se de forma leve e autolimitante, com sintomas comuns à outras doenças febris, como dores de cabeça, mialgia e náuseas, dificultando o diagnóstico (Bharti et al., 2003). Por outro lado, a forma severa da leptospirose, desenvolvida por 10-15% dos pacientes, pode apresentar 3 quadros principais: síndrome de Weil, envolvendo icterícia, falência renal, hemorragias, uveíte e miocardite; síndrome hemorrágica pulmonar associada à leptospirose; e meningite/meningoencefalite. As taxas de mortalidade referentes às formas graves da doença podem atingir até 50% (Vijayachari et al., 2008).

A leptospirose animal também tem um grande impacto econômico, dadas as perdas produtivas e reprodutivas nesse setor. Em bovinos e suínos, problemas reprodutivos como retenção de placenta, aborto e natimortos bem como mumificação fetal e prole fraca são sinais comuns da doença. Em equinos, uma manifestação crônica comumente encontrada é a uveíte recorrente, a qual também tem sido associada a reações auto-imunes. Em cães, já foram identificadas 4 síndromes relacionadas à leptospirose, sendo elas: hemorrágica, urêmica, ictérica e reprodutiva. A excreção das leptospiras na urina pode ocorrer por períodos prolongados, mesmo após os animais estarem recuperados da doença (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010).

2.1.6 Diagnóstico e tratamento

A inespecificidade da sintomatologia e a inexistência de lesões patognomônicas dificulta o diagnóstico clínico da leptospirose. O teste preconizado como padrão-ouro para o diagnóstico laboratorial da doença é o teste de aglutinação

microscópica (MAT), o qual consiste na reação de aglutinação entre os anticorpos presentes no soro dos pacientes e o antígeno O do LPS dos sorovares de *Leptospira* spp. No entanto, o MAT é restrito a poucos laboratórios de referência, tendo em vista a necessidade de uma bateria de culturas vivas de leptospiros, necessita de amostras de soros pareados para detectar a soroconversão, e apresenta dificuldade para interpretação dos resultados em função das reações cruzadas dos soros positivos com diferentes sorovares (McBride et al., 2005, WHO, 2003). Outro teste sorológico empregado no diagnóstico da leptospirose é o ensaio imunoenzimático (ELISA), porém, este apresenta sensibilidade e especificidade menores que o MAT e não é capaz de detectar o sorovar infectante. Ambas as técnicas, no entanto, são válidas somente a partir da segunda semana da doença, quando os anticorpos podem ser detectados (Musso & La Scola, 2013).

A técnica de PCR, por outro lado, pode ser empregada já nos primeiros dias da infecção, com alta especificidade, porém baixa sensibilidade. Além disso, a PCR convencional tem sido substituída pela variação de PCR quantitativo em tempo real, com melhores resultados, permitindo mensurar a carga leptospiral nas amostras (Ahmed et al., 2009, McBride et al., 2005). A cultura bacteriana também é um método direto e definitivo de detecção, mas não é ideal para diagnóstico de rotina em função do tempo para obtenção do resultado (Hartskeerl et al., 2011).

Testes sorológicos de triagem têm sido desenvolvidos, apresentando custos reduzidos e tempo curto para sua realização. Porém, ainda se faz necessária a confirmação do resultado com testes padronizados de maior sensibilidade (Goris et al., 2013, Picardeau et al., 2014). O valor diagnóstico das técnicas disponíveis varia de acordo com a fase da doença e sua prevalência em cada região. Sendo assim, o desenvolvimento de um teste robusto, rápido e com foco no diagnóstico da infecção ainda na fase aguda é de extrema importância para o controle e tratamento adequado da leptospirose (Picardeau, 2013).

O tratamento é realizado através da administração de antibióticos como penicilina por via intravenosa, em casos mais graves. Em casos menos severos, o uso de antibióticos via oral, como amoxicilina, ampicilina, doxiciclina ou eritromicina também é prescrito (Levett, 2001). Em casos mais graves envolvendo

comprometimento renal, tem sido descrita a utilização de diálise peritoneal com redução significativa nas taxas de mortalidade (WHO, 2003).

2.2 Vacinas como medida profilática contra leptospirose

2.2.1 Vacinas convencionais e recombinantes

As vacinas disponíveis comercialmente, chamadas bacterinas, consistem na célula inteira da bactéria inativada por calor ou formalina. Tais vacinas, apesar de serem usadas desde 1916 em animais domésticos, silvestres e em algumas populações humanas, apresentam grandes limitações (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010).

As bacterinas estão associadas com uma série de reações adversas (dor, febre e náuseas), sendo usadas em humanos em apenas poucos países; conferem uma imunidade de curta-duração; não são universalmente eficazes em prevenir a leptospirose; e são sorovares-específicas. Sendo assim, quando novos sorovares emergem numa determinada região, se faz necessária a reformulação da vacina a custos substanciais (Koizumi & Watanabe, 2005).

Diante disso, com o objetivo de desenvolver uma vacina segura e de amplo espectro, diversos estudos tem avaliado o potencial imunoprotetor de antígenos promissores de *Leptospira* spp. em diferentes abordagens vacinais (vetorizadas por adenovírus e BCG; DNA; subunidade), fazendo uso da tecnologia do DNA recombinante e focando principalmente em lipoproteínas e fatores de virulência (Dellagostin et al., 2011). Antígenos como LipL32, LigA, LigB, Loa22, LipL41 já foram estudados em modelos animais, porém nenhum deles conferiu, simultaneamente, proteção total, esterilizante e estatisticamente significativa (Ko et al., 2009).

O primeiro relato da utilização de antígenos recombinantes no desenvolvimento de vacinas contra leptospirose envolveu vesículas de membrana externa de *E. coli* contendo OmpL1 e LipL41, induzindo proteção parcial (Haake et al., 1999). A proteína LipL32 também conferiu proteção quando administrada na forma de vacina de DNA ou vetorizada por BCG ou adenovírus, porém com eficácia

variando entre 40 e 75% (Branger et al., 2005, Branger et al., 2001, Seixas et al., 2007). A porção C terminal de LigA, administrada em formulação contendo adjuvante de Freund, conferiu proteção contra mortalidade, porém sem indução de imunidade esterilizante (Silva et al., 2007).

Vacinas de DNA e de subunidade recombinante, quando administradas num mesmo esquema vacinal, configuram uma estratégia conhecida por *prime-boost*, que objetiva estimular tanto uma resposta imune humoral quanto celular. Tal estratégia já foi descrita em estudos contra leptospirose utilizando os antígenos LipL32, LipL41 e OmpL1 fusionados e, mais recentemente, com o antígeno LemA, demonstrando resultados promissores (Feng et al., 2009, Hartwig et al., 2013).

2.2.2 OmpL37 como alvo vacinal

A proteína OmpL37 apresenta 37 kDa e está presente na membrana externa de *Leptospira* spp., aumentando a acessibilidade aos fatores envolvidos na resposta imune protetora (Pinne & Haake, 2009). Além disso, é uma proteína não expressa na saprófita *L. biflexa* e conservada entre diversos sorovares patogênicos (Pinne et al., 2010), um fator importante a ser considerado no que se refere ao desenvolvimento de uma vacina que gere proteção cruzada contra diferentes sorovares da bactéria.

OmpL37 também é reconhecida pelo soro de pacientes na fase convalescente da doença, demonstrando sua antigenicidade. Sua atividade de adesina já foi demonstrada por Pinne et al. (2010), com resultados de ligação a componentes da matriz extracelular do hospedeiro, como fibronectina, fibrinogênio, laminina e elastina. Até então, apenas os domínios repetitivos conservados das proteínas LigB e LigA (LigBrep) haviam mostrado propriedade de adesão à elastina (Pinne et al., 2010).

Recentemente, foi demonstrado uma maior expressão de OmpL37 *in vivo* do que *in vitro*, tanto em modelo de hamster quanto de camundongo (Matsui et al., 2012). Além disso, também foi reportado o aumento da expressão desta proteína em DMCs implantadas na cavidade peritoneal de ratos, indicando seu possível

envolvimento na adaptação da bactéria ao hospedeiro reservatório (Caimano et al., 2014). Estas observações sugerem a participação de OmpL37 na patogênese da *Leptospira*, especialmente no que se refere à adesão aos tecidos ricos em elastina, como derme, vasos sanguíneos e pulmões.

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipótese

O antígeno OmpL37 apresenta potencial de conferir proteção contra leptospirose letal em modelo animal de hamster.

3.2 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial imunoprotetor do antígeno OmpL37 de *Leptospira interrogans*.

3.3 Objetivos Específicos

- Avaliação da presença e conservação do gene *ompL37* em diferentes espécies e sorovares de *Leptospira* patogênica;
- Obtenção e caracterização das construções pAE/*ompL37* e pTargeT/*ompL37* através de *Western blot* e imunofluorescência;
- Determinação do potencial imunoprotetor das diferentes formulações vacinais, através de desafio com cepa homóloga de *L. interrogans* em hamster;
- Avaliação da resposta imune humoral induzida nos animais vacinados através de ELISA;
- Avaliação da resposta imune celular induzida nos animais vacinados através de PCR quantitativo em tempo real.

4 CAPÍTULOS

4.1 Artigo - Characterization of the *Leptospira interrogans* outer membrane protein OmpL37 as a potential vaccine candidate

O presente artigo foi formatado de acordo com as normas do periódico *Clinical and Vaccine Immunology*

**Characterization of the *Leptospira interrogans* outer membrane protein
OmpL37 as a potential vaccine candidate**

Thaís L. Oliveira¹, André A. Grassmann¹, Rodrigo A. Schuch¹, Amilton C. P. Seixas Neto¹,
Marcelo Mendonça¹, Daiane D. Hartwig², Alan J. A. McBride¹, Odir A. Dellagostin^{1#}

¹ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico,
Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

² Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal
de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

#Corresponding author: Odir A. Dellagostin, Núcleo de Biotecnologia, Universidade
Federal de Pelotas, Campus Universitário, Caixa Postal 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS,
Brazil. Tel. +55 53 3275 7350

ABSTRACT

The identification of potential vaccine candidates against leptospirosis remains a challenge. One such potential candidate is OmpL37, it is surface-exposed and has the highest elastin-binding ability described to date, suggesting an important role during colonization of the host. In order to evaluate its ability to induce a protective immune response, prime-boost, DNA and subunit vaccine strategies were tested in the hamster model of lethal leptospirosis. The humoral response was evaluated by indirect ELISA and the cytokine profile in whole blood was determined by real-time PCR (qRT-PCR). Recombinant OmpL37 induced significant levels of IgG antibodies, unlike the DNA vaccine. Furthermore, both formulations, when individually administered, stimulated an inflammatory response characterized by induction of TNF- α . Nevertheless, none of the OmpL37 formulations or vaccination strategies induced protective immunity.

KEYWORDS: Leptospirosis; Vaccine; OmpL37.

INTRODUCTION

Leptospirosis is an emerging and neglected zoonotic disease, caused by pathogenic spirochetes of the *Leptospira* genus and is associated with inadequate sanitation, poverty and recreational or professional activities with exposure to known risk factors (1-2). More than 10,000 cases of leptospirosis are reported annually in Brazil alone (3). Transmission occurs mainly through contact with contaminated urine of reservoir animals (4). Leptospirosis is associated with a broad spectrum of symptoms, ranging from a mild influenza-like illness to multiple organ failure, with a mortality rate ranging from 10% (Weil's disease) to 70%, primarily in cases of leptospirosis-associated pulmonary haemorrhage syndrome (LPHS) (5).

More than 260 serovars of *Leptospira* spp. have been described and this antigenic diversity is related to variations in their lipopolysaccharides (LPS) (6). Commercially available vaccines are bacterin (killed whole-cells) based, they do not provide cross-protection against different *Leptospira* serovars, conferring only short-term immunity and usually fail to prevent disease transmission (5, 7). Thus, efforts to develop recombinant vaccines against leptospirosis have focused on conserved outer membrane proteins (OMPs) that represent potential targets for immunological defence mechanisms. Several leptospiral proteins have been evaluated as vaccine candidates, although to date no broadly conserved antigen has been able to induce sterilizing, long-term protective immunity, highlighting the need for characterization of new targets (8-9).

OmpL37 from *Leptospira interrogans* has been shown to be exposed on the cell surface (10). In addition, this protein binds to several extracellular matrix components, with an increased affinity for elastin. Elastin-rich tissues (e.g. skin, lungs, arteries and bladder) are highly relevant for the pathogenesis and transmission of leptospirosis (11). Furthermore, expression of OmpL37 was up-regulated during infection and within dialysis membrane chambers

(DMCs) (12-13), raising the possibility that this protein plays an important role in pathogenesis. OmpL37 is highly conserved among pathogenic *Leptospira* spp. and is recognized by patient convalescent sera (11).

DNA and subunit vaccines are potential intervention strategies for leptospirosis and have been extensively evaluated. Both are able to induce a humoral response, and DNA vaccines can confer cell-mediated immunity. The aim of this study was to characterize and evaluate the immunoprotective potential of OmpL37 from *L. interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130 using prime-boost, DNA, and recombinant protein-based vaccination strategies.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions. *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130 was cultured in Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) liquid medium (Difco; BD, Franklin Lakes, NJ, USA) supplemented with *Leptospira* enrichment EMJH (Difco) at 30°C (28). The *Escherichia coli* strains TOP10 and BL21 (DE3) Star (Invitrogen, São Paulo, Brazil) were grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) medium (with the addition of ampicillin to 100 µg.ml⁻¹).

Presence and conservation of *ompL37* in *Leptospira* spp. A PCR using the following primers: OmpL37-For (5'-AAGGATCCGATCAGATCAACTTAG) and OmpL37-Rev (5'-TGGGTACCTTAATTTGTGTTTTTG) flanking the *ompL37* gene (LIC12263), was performed with genomic DNA from 17 *Leptospira* serovars: *L. interrogans* serovars Autumnalis, Bataviae, Bratislava, Canicola, Djasiman, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Muenchen, and Pomona, *L. borgpetersenii* serovars Ballum, Castellonis, Javanica, Mini, Poi, and Sejroe, *L. kirschneri* serovars Cynopteri and Grippotyphosa, and *L. santarosai* serovar

Pomona. The *rRNA 16S* gene (positive control) was amplified using the primers fd1_F and rP2_R as previously described (14). The OmpL37 protein sequence from *L. interrogans* sv. Copenhageni L1-130 (NCBI Reference Sequence: YP_002198.1) was compared to all the published genome sequences by BlastP in order to determine the level of conservation of OmpL37 in different species and serovars, i.e., *L. interrogans* sv. Lai strain 56601 (15); *L. borgpetersenii* sv. Hardjo strain L550 (16); *L. santarosai* sv. Shermani strain LT821 (17); *L. licerasiae* sv. Varillal strain VAR010 (18); and *L. biflexa* sv. Patoc strain Patoc1 Ames (19).

Cloning of *ompL37*. The *ompL37* PCR product amplified as described above was cloned into the *E. coli* expression vector pAE for expression of OmpL37 recombinant protein with an N-terminal 6× His tag. For construction of the DNA vaccine, *ompL37* was amplified using the primers OmpL37-pTarget-For (5'-ACCATGGGAGATCAGATCAACTTAG) and OmpL37-Rev and cloned into the mammalian expression vector pTarget (Promega, Madison, WI, USA). Both plasmid constructs were confirmed by PCR, restriction digestion and DNA sequencing.

Production of recombinant OmpL37 and immunoblotting. The recombinant vector pAE/*ompL37* was used to transform *E. coli* BL21 Star (DE3) cells (Invitrogen). The 6× His-tagged recombinant OmpL37 protein was expressed, purified by affinity chromatography and characterized by Western blot as previously described (20). A pool of convalescent sera collected from severe leptospirosis patients (diluted 1:300) and an anti-human IgG peroxidase conjugate (diluted 1:2,000) were used to confirm that native OmpL37 stimulated the host immune system during infection. The concentration of rOmpL37 was determined using a bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Pierce; Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). rOmpL37 (50 µg/dose) was used for production of mouse anti-rOmpL37 serum, as previously described (21) and the serum was characterized by Western blotting.

***In vitro* expression of rOmpL37 in mammalian cells.** CHO-K1 cells were grown on microscope coverslips in 6-well plates and transfected with pTarget/ompL37 or pTarget (control), using Nanofect Transfection Reagent (Qiagen) according to the manufacturers protocol. Briefly, CHO-K1 cells were maintained in serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM). When 80% confluence was achieved, the CHO-K1 cells were transfected with 2 µg of plasmid DNA mixed with Nanofect in serum-free DMEM. Twenty-four hours after transfection, the functionality and expression of rOmpL37 were evaluated by indirect immunofluorescence (IFI) using mouse anti-OmpL37 serum (1:100 in PBS) and anti-mouse IgG-FITC conjugate (1:200 in PBS). CHO-K1 DNA was stained with Hoechst 33258. The reading was performed with a fluorescence microscope at 400× magnification.

Immunization and challenge of hamsters. Groups of 6 female hamsters, aged 4-6 weeks, were immunized in the quadriceps muscle twice, with a 21 day interval, as follows: rOmpL37-Alhydrogel (2 x 100 µg), pTarget-ompL37 (2 x 100 µg), prime-boost pTarget-ompL37 (100 µg) plus rOmpL37 (100 µg), pTarget (2 x 100 µg) and PBS-Alhydrogel. A positive control group of four hamsters were immunized with 10⁹ heat-killed whole-leptospire. Forty-two days after the first immunization, hamsters were challenged intraperitoneally with a dose of 10³ leptospire, equivalent to 5 times the 50% lethal dose (LD50) of the *L. interrogans* Copenhageni strain Fiocruz L1-130 (22). Two independent experiments were conducted. Blood samples were collected from the retro-orbital venous plexus before each immunization and challenge, and the sera were stored at -20°C. The hamsters were observed daily for morbidity and mortality. Survivors were euthanized at 30 days post challenge. The animals were manipulated in accordance with the guidelines and approval of the Federal University of Pelotas Ethics Committee in Animal Experimentation (n° 2348).

Antibody response determination by ELISA. The humoral immune response induced by the different vaccine formulations was evaluated by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using rOmpL37 as the antigen. Briefly, rOmpL37 diluted in carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6, was used in a concentration of 50 ng per well. The ELISA plates were washed three times with PBST (PBS with 0.05% [vol/vol] Tween 20) and blocked. Hamster serum was added at a 1:400 dilution for 1 h at 37°C, and then the plates were washed 3 times with PBST. Peroxidase-conjugated anti-golden Syrian hamster IgG antibody (Rockland) was added at a 1:6,000 dilution. After incubation at 37°C for 1 h, plates were washed 5 times with PBST, and the reaction was visualized with *o*-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma-Aldrich) and hydrogen peroxide. The reaction was stopped by the addition of 25 µl of 4 N H₂SO₄, and the optical densities were read at 492 nm.

Blood RNA isolation and cDNA synthesis. Total RNA was isolated from pooled blood samples using the RiboPure-Blood (Ambion), according to the manufacturers instructions. cDNA synthesis was performed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems) as described by the manufacturer.

Quantitative real-time PCR assay. Real-Time PCR (qPCR) reactions were run on a Stratagene Mx3005P Real-Time PCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The qPCR using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and primers (Table 1) was carried out in a 25 µL reaction volume (50 ng cDNA, 12.5 µL Master Mix, 0.5 µM of each primer). The cycling conditions consisted of 95 °C for 10 min (denaturation), followed by amplification of the target DNA for 45 cycles (95 °C for 5 s, 60°C or 61°C for 30 s and a variable extension time at 72°C). The melting curves were analysed immediately after amplification at a linear temperature transition rate of 0.1 °C/s from 55 to 95°C, with continuous fluorescence acquisition. The relative Ct ($\Delta\Delta C_T$) method (23) was used to quantify cytokine gene expression. Briefly, the fold change of each target gene was normalized to the

β -actin housekeeping gene C_T (ΔC_T), and compared to a calibrator sample, the same normalized gene in the control samples ($\Delta\Delta C_T$). The final value represents the relative fold increase between immunized and non-immunized hamsters.

Culture and imprint detection of leptospires. Kidney, lung and liver tissues were collected for culture and imprint of surviving hamsters. Kidney samples were used to confirm sterilizing immunity by culture as previously described (20). The direct detection of leptospires in the kidneys, lungs and liver of hamsters was evaluated by the imprint method as previously described (24).

Statistical analysis. The Fisher exact test and Log-rank test were used to determine significant differences in mortality and survival rates, respectively, among the experimental groups. The Student *t* test was used to determine significant differences among the serological assays. Differences were considered significant at a *P* value of ≤ 0.05 . The analyses were carried out with GraphPad Prism 4 software or GraphPad Software Quickcalcs (www.graphpad.com/quickcalcs/).

RESULTS

Distribution of *ompL37* among *Leptospira* spp. PCR analysis showed that the *ompL37* gene was present in *L. interrogans* (nine serovars), *L. borgpetersenii* (six serovars), *L. kirschneri* (two serovars), and *L. santarosai* (one serovar). Protein sequence analysis showed that the predicted OmpL37 sequence in *L. interrogans* sv. Copenhageni was 100% identical to the LA1495 sequence in *L. interrogans* sv. Lai. Compared to OmpL37 in *L. borgpetersenii* sv. Hardjo-bovis, *L. santarosai* sv. Shermani and *L. licerasiae* sv. Varillal, the identity was 88, 87 and 63% with a query coverage of 100%, 100% and 99%, respectively. A less conserved

protein orthologue was observed in saprophytic *L. biflexa* with an identity of 46% and 94% sequence coverage.

Subunit and DNA vaccine preparation. The OmpL37 recombinant protein was expressed in inclusion bodies in *E. coli* with the expected size of 37 kDa. A protocol for insoluble protein purification based on urea resulted in a yield of 10.4 mg.L⁻¹. The rOmpL37 was recognized by convalescent sera evaluated by WB. Mouse anti-rOmpL37 serum recognized both the recombinant and native OmpL37 proteins in *L. interrogans* Copenhageni strain Fiocruz L1-130 whole cell lysate (WCL), Fig. 1. The expression of OmpL37 in the pTarget construct was confirmed by detection of rOmpL37 in transfected CHO-K1 cells (data not shown).

Humoral immune response in vaccinated hamsters. In order to assess the specific antibody response in groups of hamsters immunized with the various rOmpL37 vaccine preparations, an indirect ELISA was performed with the sera from each animal collected on days 0 (pre-immune), 21 and 42 post-immunization (pi), using rOmpL37 as the immobilized antigen, Fig. 2. The rOmpL37 vaccine induced significantly higher antibody levels than *ompL37* DNA vaccine in both experiments ($p < 0.005$). In the group immunized with the prime-boost strategy, a significant response was only observed after injection of recombinant protein (day 42). There was no significant difference between the immune response induced by the DNA vaccine and the negative control.

Cytokine expression profile in hamsters immunized with OmpL37. The induction of IFN- γ , IL-1 α , TNF- α and TGF- β was evaluated by qRT-PCR, considering that target genes are up or down-regulated when a 2-fold change in mRNA levels is observed (25). IFN- γ (ratio = 0.41) and IL-1 α (ratio = 0.19) mRNA expression levels were down regulated in the prime-boost group at day 42. In contrast, TNF- α expression increased at day 42 in animals immunized with rOmpL37 (ratio = 2.84). Following immunization with the DNA vaccine, TNF- α was up regulated at days 21 (ratio = 6.4) and 42 (ratio = 5.6), while IL-1 α (ratio =

0.28) was down regulated at day 42. TGF- β was expressed at basal levels in vaccinated hamsters (Fig. 3).

Efficacy of the OmpL37 vaccine preparations. The protective efficacy of the OmpL37 vaccine preparations was determined. Two independent experiments were carried out, and the statistical analyses are shown in Table 2, and the survival rates are shown in Fig. 4. Considering both survival and protection against mortality, the various OmpL37 vaccine formulations failed to induce a protective immune response. The maximum efficacy induced was 25% in the prime-boost group. Furthermore, leptospire were present in the kidneys of the surviving animals, including those in the bacterin group, indicating a lack of sterilizing immunity. Imprint analysis enabled visualization of leptospire in kidney samples from surviving animals of prime-boost group, however, bacteria were not detected in the lungs of these animals.

DISCUSSION

The traditional, heat-killed, whole-cell, vaccine preparations (bacterins) for use in humans and animals present with several major limitations, including: severe side effects, short-term immunity and restricted-serovar protection. Towards improving leptospirosis vaccines, several studies have evaluated different formulations of vaccine candidates. However, the vaccine efficacy reported was variable and sterilizing immunity was not observed, emphasizing the need for novel targets (9, 26). In this study, we evaluated, for the first time, the outer membrane protein (OMP) OmpL37 from *L. interrogans* sv. Copenhageni strain Fiocruz L1-130 as a potential vaccine candidate against leptospirosis. In addition to its cellular localization as an OMP and a possible role during infection, the conservation of orthologues of the *ompL37* gene in different serovars suggested its potential as a cross-protective vaccine (10-12).

Another limitation in the field of vaccine development for leptospirosis is that of correlates of protection, these immune markers have contributed to many vaccinology studies (27-28), however, to date none have been identified for leptospirosis. Thus, the hamster model of lethal leptospirosis as previously described was adopted by this study to measure vaccine efficacy (29-30). We performed two independent experiments using different immunization strategies (subunit, DNA vaccine, and prime-boost). Considering that both humoral and cellular immune responses are important in leptospirosis (31), a protein-boost strategy was predicted to improve the immunogenicity and efficacy of a DNA vaccine, as demonstrated previously (32-33).

Despite the significant humoral response that was produced against rOmpL37, no significant protection was observed in any of the formulations evaluated. This is a recurring issue, even among the more promising antigens (34-35). Of note, survival of 25% of the animals in prime-boost group was not associated with higher IgG levels (data not shown). There is experimental evidence that immunity to leptospirosis is not only antibody-based (31) and that the adjuvant may be a crucial vaccine component in inducing protective immunity. A study using LigANI in Freund's complete adjuvant resulted in protection ranging from 63 to 100% (20). In contrast, LigANI in Alhydrogel was unable to protect hamsters against lethal leptospirosis (36). In the present study, we used Alhydrogel, which is regularly used in commercial animal vaccines and is approved for human use, unlike Freund's complete adjuvant that is highly toxic (37). The functionality of the DNA vaccine was demonstrated by the transfection assay. However, in this formulation, OmpL37 did not induce an IgG response, according to other data published by our group (33), suggesting a mechanism of action at the cellular level.

Indeed, qPCR revealed an induction of TNF- α in blood of hamsters vaccinated with rOmpL37 (day 42) and the DNA vaccine (days 21 and 42). Delayed and sustained TNF- α production

has been associated with a poor prognosis during infection (38). Conversely, IL1- α , which is also related with severity of the disease, was down regulated in groups that received prime-boost and DNA vaccine. Higher levels of TNF- α and IL1- α were reported in hamsters infected with virulent leptospires compared to those infected with an avirulent strain (25). IFN- γ production seems to be related with protection in cattle vaccinated with monovalent serovar Hardjo vaccines (39). Nevertheless, these cytokine levels were also reduced in prime-boost group at day 42. In fact, the role of the cytokine profile in protection remains poorly understood and needs to be further investigated. Due the lack of reagents to measure the serum concentrations of these immune effectors, studies have been limited to determining cytokine profiles at the transcriptional level (25, 40).

The presence of leptospires was detected by imprint in kidney samples from the surviving animals in the prime-boost group, and this was further confirmed by renal culture. These animals did not present leptospires in lung samples, possibly due to OmpL37 role in adhesion to elastin-rich tissues such as the lungs (11). Immunity conferred by bacterin was not sterilizing. Fifty per cent of animals immunized with bacterin were culture positive. Failure in prevent bacterial shedding has been already reported in others studies (39, 41).

E. coli-based expression systems are broadly used, although they are unable to make post-translational modifications, such as glycosilation, methylation and acetylation (42). However, there is evidence that pathogenic leptospires use protein modification systems (43). Lipidation seems to improve the immunogenicity of recombinant antigens, such as OspA from *Borrelia burgdorferi* and LigAni from *L. interrogans* (44-45). Altered immunogenic properties may have affected the folding of rOmpL37, explaining the lack of protection in this study.

In summary, we report that OmpL37, although sharing some of the characteristics seen in other proteins such as LipL32, LigA and LigB, failed to induce a protective immune response

against leptospirosis. At the most, immunization with OmpL37 inhibited adherence to lung tissues. Consequently, this protein may have a potential clinical application in cases of pulmonary haemorrhage, however, this observation requires further investigation.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Michele dos Santos for technical assistance. This work was supported by Brazilian funding agencies CAPES, CNPq and FAPERGS.

REFERENCES

1. **Adler B, de la Peña Moctezuma A.** 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology* **140**:287-296.
2. **Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM.** 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases* **3**:757-771.
3. **McBride AJ, Athanazio DA, Reis MG, Ko AI.** 2005. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis* **18**:376-386.
4. **Reis RB, Ribeiro GS, Felzemburgh RD, Santana FS, Mohr S, Melendez AX, Queiroz A, Santos AC, Ravines RR, Tassinari WS, Carvalho MS, Reis MG, Ko AI.** 2008. Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. *PLoS Negl Trop Dis* **2**:e228.
5. **Ko AI, Goarant C, Picardeau M.** 2009. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol* **7**:736-747.

6. **Bulach DM, Kalambaheti T, de la Pena-Moctezuma A, Adler B.** 2000. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Leptospira*. J Mol Microbiol Biotechnol **2**:375-380.
7. **Gonzalez A, Rodriguez Y, Batista N, Valdes Y, Nunez JF, Mirabal M, Gonzalez M.** 2005. Immunogenicity and protective capacity of leptospiral whole-cell monovalent serogroup Ballum vaccines in hamsters. Rev Argent Microbiol **37**:169-175.
8. **Haake DA, Matsunaga J.** 2010. Leptospira: a spirochaete with a hybrid outer membrane. Mol Microbiol.
9. **Dellagostin OA, Grassmann AA, Hartwig DD, Felix SR, da Silva EF, McBride AJ.** 2011. Recombinant vaccines against leptospirosis. Hum Vaccin **7**:1215-1224.
10. **Pinne M, Haake DA.** 2009. A comprehensive approach to identification of surface-exposed, outer membrane-spanning proteins of *Leptospira interrogans*. PLoS One **4**:e6071.
11. **Pinne M, Choy HA, Haake DA.** 2010. The OmpL37 surface-exposed protein is expressed by pathogenic *Leptospira* during infection and binds skin and vascular elastin. PLoS Negl Trop Dis **4**:e815.
12. **Matsui M, Soupe ME, Becam J, Goarant C.** 2012. Differential in vivo gene expression of major *Leptospira* proteins in resistant or susceptible animal models. Appl Environ Microbiol **78**:6372-6376.
13. **Caimano MJ, Sivasankaran SK, Allard A, Hurley D, Hokamp K, Grassmann AA, Hinton JC, Nally JE.** 2014. A Model System for Studying the Transcriptomic and Physiological Changes Associated with Mammalian Host-Adaptation by *Leptospira interrogans* Serovar Copenhageni. PLoS Pathog **10**:e1004004.

14. **Morey RE, Galloway RL, Bragg SL, Steigerwalt AG, Mayer LW, Levett PN.** 2006. Species-specific identification of Leptospiraceae by 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol* **44**:3510-3516.
15. **Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, Zhang YX, Xiong H, Lu G, Lu LF, Jiang HQ, Jia J, Tu YF, Jiang JX, Gu WY, Zhang YQ, Cai Z, Sheng HH, Yin HF, Zhang Y, Zhu GF, Wan M, Huang HL, Qian Z, Wang SY, Ma W, Yao ZJ, Shen Y, Qiang BQ, Xia QC, Guo XK, Danchin A, Saint Girons I, Somerville RL, Wen YM, Shi MH, Chen Z, Xu JG, Zhao GP.** 2003. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature* **422**:888-893.
16. **Bulach DM, Zuerner RL, Wilson P, Seemann T, McGrath A, Cullen PA, Davis J, Johnson M, Kuczek E, Alt DP, Peterson-Burch B, Coppel RL, Rood JI, Davies JK, Adler B.** 2006. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:14560-14565.
17. **Chou LF, Chen YT, Lu CW, Ko YC, Tang CY, Pan MJ, Tian YC, Chiu CH, Hung CC, Yang CW.** 2012. Sequence of *Leptospira santarosai* serovar Shermani genome and prediction of virulence-associated genes. *Gene* **511**:364-370.
18. **Ricaldi JN, Fouts DE, Selengut JD, Harkins DM, Patra KP, Moreno A, Lehmann JS, Purushe J, Sanka R, Torres M, Webster NJ, Vinetz JM, Matthias MA.** 2012. Whole genome analysis of *Leptospira licerasiae* provides insight into leptospiral evolution and pathogenicity. *PLoS Negl Trop Dis* **6**:e1853.
19. **Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, Zuerner RL, Zidane N, Wilson PJ, Creno S, Kuczek ES, Bommezzadri S, Davis JC, McGrath A, Johnson MJ, Boursaux-Eude C, Seemann T, Rouy Z, Coppel RL, Rood JI, Lajus A, Davies JK, Medigue C, Adler B.** 2008. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides

- insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. PLoS One **3**:e1607.
20. **Silva EF, Medeiros MA, McBride AJ, Matsunaga J, Esteves GS, Ramos JG, Santos CS, Croda J, Homma A, Dellagostin OA, Haake DA, Reis MG, Ko AI.** 2007. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. Vaccine **25**:6277-6286.
 21. **Fernandes CP, Seixas FK, Coutinho ML, Vasconcellos FA, Seyffert N, Croda J, McBride AJ, Ko AI, Dellagostin OA, Aleixo JA.** 2007. Monoclonal antibodies against LipL32, the major outer membrane protein of pathogenic *Leptospira*: production, characterization, and testing in diagnostic applications. Hybridoma (Larchmt) **26**:35-41.
 22. **Grassmann AA, Felix SR, dos Santos CX, Amaral MG, Seixas Neto AC, Fagundes MQ, Seixas FK, da Silva EF, Conceicao FR, Dellagostin OA.** 2012. Protection against lethal leptospirosis after vaccination with LipL32 coupled or coadministered with the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. Clin Vaccine Immunol **19**:740-745.
 23. **Vernel-Pauillac F, Merien F.** 2006. Proinflammatory and immunomodulatory cytokine mRNA time course profiles in hamsters infected with a virulent variant of *Leptospira interrogans*. Infect Immun **74**:4172-4179.
 24. **Chagas-Junior AD, McBride AJ, Athanazio DA, Figueira CP, Medeiros MA, Reis MG, Ko AI, McBride FW.** 2009. An imprint method for detecting leptospires in the hamster model of vaccine-mediated immunity for leptospirosis. J Med Microbiol **58**:1632-1637.

25. **Vernel-Pauillac F, Goarant C.** 2010. Differential cytokine gene expression according to outcome in a hamster model of leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis* **4**:e582.
26. **Koizumi N, Watanabe H.** 2005. Leptospirosis vaccines: past, present, and future. *J Postgrad Med* **51**:210-214.
27. **Pizza M, Scarlato V, Masignani V, Giuliani MM, Arico B, Comanducci M, Jennings GT, Baldi L, Bartolini E, Capecchi B, Galeotti CL, Luzzi E, Manetti R, Marchetti E, Mora M, Nuti S, Ratti G, Santini L, Savino S, Scarselli M, Storni E, Zuo P, Broeker M, Hundt E, Knapp B, Blair E, Mason T, Tettelin H, Hood DW, Jeffries AC, Saunders NJ, Granoff DM, Venter JC, Moxon ER, Grandi G, Rappuoli R.** 2000. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science* **287**:1816-1820.
28. **Etz H, Minh DB, Henics T, Dryla A, Winkler B, Triska C, Boyd AP, Sollner J, Schmidt W, von Ahsen U, Buschle M, Gill SR, Kolonay J, Khalak H, Fraser CM, von Gabain A, Nagy E, Meinke A.** 2002. Identification of in vivo expressed vaccine candidate antigens from *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:6573-6578.
29. **Haake DA.** 2006. Hamster model of leptospirosis. *Curr Protoc Microbiol* **Chapter 12**:Unit 12E 12.
30. **Evangelista KV, Coburn J.** 2010. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol* **5**:1413-1425.
31. **Fraga TR, Barbosa AS, Isaac L.** 2011. Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. *Scand J Immunol* **73**:408-419.

32. **Feng CY, Li QT, Zhang XY, Dong K, Hu BY, Guo XK.** 2009. Immune strategies using single-component LipL32 and multi-component recombinant LipL32-41-OmpL1 vaccines against leptospira. *Braz J Med Biol Res* **42**:796-803.
33. **Hartwig DD, Forster KM, Oliveira TL, Amaral M, McBride AJ, Dellagostin OA.** 2013. A prime-boost strategy using the novel vaccine candidate, LemA, protects hamsters against leptospirosis. *Clin Vaccine Immunol* **20**:747-752.
34. **Lucas DS, Cullen PA, Lo M, Srikram A, Sermswan RW, Adler B.** 2011. Recombinant LipL32 and LigA from *Leptospira* are unable to stimulate protective immunity against leptospirosis in the hamster model. *Vaccine* **29**:3413-3418.
35. **Murray GL, Lo M, Bulach DM, Srikram A, Seemann T, Quinsey NS, Sermswan RW, Allen A, Adler B.** 2013. Evaluation of 238 antigens of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo for protection against kidney colonisation. *Vaccine* **31**:495-499.
36. **Palaniappan RU, McDonough SP, Divers TJ, Chen CS, Pan MJ, Matsumoto M, Chang YF.** 2006. Immunoprotection of recombinant leptospiral immunoglobulin-like protein A against *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection. *Infect Immun* **74**:1745-1750.
37. **Petrovsky N, Aguilar JC.** 2004. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol Cell Biol* **82**:488-496.
38. **Chirathaworn C, Kongpan S.** 2014. Immune responses to *Leptospira* infection: roles as biomarkers for disease severity. *Braz J Infect Dis* **18**:77-81.
39. **Zuerner RL, Alt DP, Palmer MV, Thacker TC, Olsen SC.** 2011. A *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo vaccine induces a Th1 response, activates NK cells, and reduces renal colonization. *Clin Vaccine Immunol* **18**:684-691.

40. **Cavaillon JM, Munoz C, Fitting C, Misset B, Carlet J.** 1992. Circulating cytokines: the tip of the iceberg? *Circ Shock* **38**:145-152.
41. **Coutinho ML, Choy HA, Kelley MM, Matsunaga J, Babbitt JT, Lewis MS, Aleixo JAG, Haake DA.** 2011. A LigA Three-Domain Region Protects Hamsters from Lethal Infection by *Leptospira interrogans*. *PLoS Negl Trop Dis* **5**:e1422.
42. **Sorensen HP.** 2010. Towards universal systems for recombinant gene expression. *Microb Cell Fact* **9**:27.
43. **Cao XJ, Dai J, Xu H, Nie S, Chang X, Hu BY, Sheng QH, Wang LS, Ning ZB, Li YX, Guo XK, Zhao GP, Zeng R.** 2010. High-coverage proteome analysis reveals the first insight of protein modification systems in the pathogenic spirochete *Leptospira interrogans*. *Cell Res* **20**:197-210.
44. **del Rio B, Seegers JF, Gomes-Solecki M.** 2010. Immune response to *Lactobacillus plantarum* expressing *Borrelia burgdorferi* OspA is modulated by the lipid modification of the antigen. *PLoS One* **5**:e11199.
45. **Lourdault K, Wang LC, Vieira A, Matsunaga J, Melo R, Lewis MS, Haake DA, Gomes-Solecki M.** 2014. Oral immunization with *Escherichia coli* expressing a lipidated form of LigA protects hamsters against challenge with *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Infect Immun* **82**:893-902.

Table 1: Detailed primers and conditions used for real-time PCR assays

Cytokine/Housekeeping gene	Primer sequence ^a	Annealing temp (°C)	T_m (°C) ^b	Amplicon length (bp) ^a	Nucleotide
					sequence
					accession numbers
TNF- α	F: AACGGCATGTCTCTCAA	60	50.4	278	AF046215
	R: AGTCGGTCACCTTTCT		49.2		
IFN- γ	F: GACAACCAGGCCATCC	60	54.3	226	AF034482
	R: CAAAACAGCACCGACT		49.2		
TGF- β	F: ACGGAGAAGAAGCTGCT	60	42.9	245	AF046214
	R: ACGTAGTACACGATGGG		52.8		
IL-1 α	F: AGTTCGTCCTGAATGATTCC	61	58.4	202	AB028235
	R: TGGTCTTCACCCTGAGC		59.6		
β -Actin	F: TCTACAACGAGCTGCG	60	51.7	357	AJ312092
	R: CAATTTCCCTCTCGGC		51.7		

^aVernel-Pauillac and Merien, 2006/Vernel-Pauillac and Goarant, 2010.

^bMelting temperature.

Table 2. Prophylactic efficacy of OmpL37 vaccines in hamsters.

Treatment group	No. survivors/total (% protection)			% Culture positive
	#Exp 1	#Exp 2	#Total	
rOmpL37	0/6 (0)	0/6 (0)	0/12	ND
pTargeT/ <i>ompL37</i>	0/6 (0)	0/6 (0)	0/12	ND
Prime-boost	3/6 (50)	0/6 (0)	3/12 (25)	3/3 (100%)
pTargeT	0/6 (0)	0/6 (0)	0/12	ND
PBS-Alhydrogel	1/6 (16.6)	0/6 (0)	1/12 (8.3)	1/1 (100%)
Killed-whole leptospire	4/4 (100)	4/4 (100)	8/8 (100)	4/8 (50%)

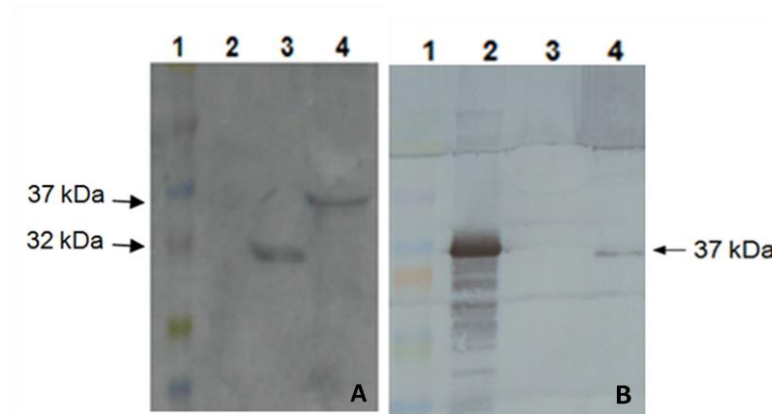


Figure 1. Immunoblotting of recombinant and native OmpL37 proteins. A: rOmpL37 characterization with convalescent human sera. (1) Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker (GE Healthcare); (2) Negative control (BSA); (3) Positive control (rLipL32); (4) rOmpL37. B: Anti-rOmpL37 serum characterization. (1) Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker (GE Healthcare); (2) rOmpL37; (3) Negative control (BSA); (4) *L. interrogans* serovar Copenhageni Fiocruz L1-130 WCL.

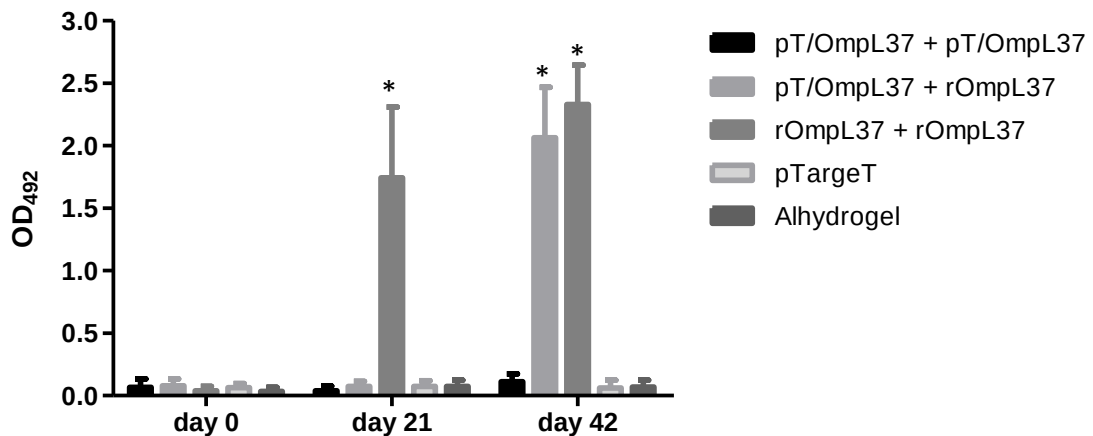


Figure 2. Systemic antibody levels in hamsters inoculated with different vaccine formulations. Recombinant rOmpL37 expressed by *E. coli* was used as the antigen in ELISA. Mean values were calculated from serum samples assayed in triplicate. Results are expressed as the mean absorbance $\pm$ standard deviation. OD₄₉₂, optical density at 492 nm. Significant differences, at a *P* value of 0.001 in comparison to the control group, are shown by an asterisk.

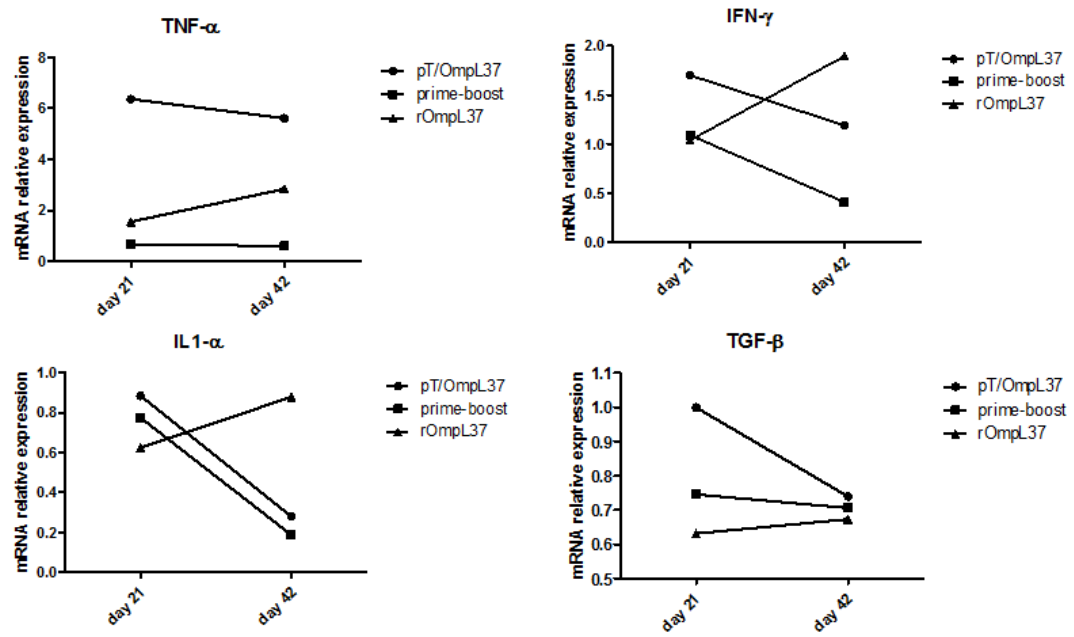


Figure 3. Relative expression of IFN- γ , TNF- α , IL1- α and TGF- β in pooled hamster whole-blood samples, accessed by quantitative real-time PCR using SYBR Green PCR Master Mix (grouped results of two independent experiments). The relative Ct ($\Delta\Delta\text{CT}$) method was used to quantify cytokine gene expression: Cts were normalized against the β -actin gene Ct (ΔCT) and then compared to the same normalized gene in the respective control groups (calibrator), set to 1.

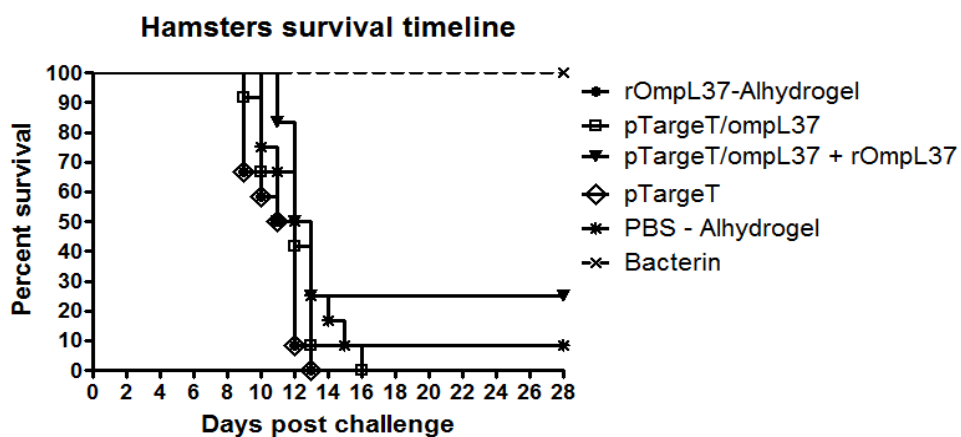


Figure 4. Hamster survival timeline (grouped results of two independent experiments). Statistical analyses and graph generation were carried out with GraphPad Prism 4 software systems (GraphPad Software).

5 CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho, demonstramos que apesar da resposta imune induzida pelo antígeno OmpL37 e das suas características promissoras como alvo vacinal - entre elas sua conservação entre diferentes sorovares de *Leptospira* spp. - as formulações avaliadas falharam em conferir proteção contra a infecção letal em hamsters. No entanto, em concordância com outros estudos, nossos resultados sugerem a potencial participação desta proteína em casos severos de leptospirose envolvendo hemorragia pulmonar. Outras estratégias vacinais, envolvendo diferentes adjuvantes, sinergismo de antígenos e outros sistemas de expressão de antígenos heterólogos podem configurar alternativas para indução de uma resposta imune protetora.

6 REFERÊNCIAS

- ABELA-RIDDER, B., SIKKEMA, R. & HARTSKEERL, R. A. (2010). Estimating the burden of human leptospirosis. *Int J Antimicrob Agents*. 36. p. S5–7.
- ADLER, B. & DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. (2010). *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*. 140. p. 287-296.
- ADLER, B., LO, M., SEEMANN, T. & MURRAY, G. L. (2011). Pathogenesis of leptospirosis: the influence of genomics. *Vet Microbiol*. 153. p. 73-81.
- AHMED, A., ENGELBERTS, M. F., BOER, K. R., AHMED, N. & HARTSKEERL, R. A. (2009). Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic *Leptospira* species in clinical materials. *PLoS One*. 4. p. e7093.
- BARBOSA, A. S., ABREU, P. A., VASCONCELLOS, S. A., MORAIS, Z. M., GONCALES, A. P., SILVA, A. S., DAHA, M. R. & ISAAC, L. (2009). Immune evasion of *Leptospira* species by acquisition of human complement regulator C4BP. *Infect Immun*. 77. p. 1137-1143.
- BARBOSA, A. S., MONARIS, D., SILVA, L. B., MORAIS, Z. M., VASCONCELLOS, S. A., CIANCIARULLO, A. M., ISAAC, L. & ABREU, P. A. (2010). Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of *Leptospira* spp. that binds the human complement regulator C4BP. *Infect Immun*. 78. p. 3207-3216.
- BAROCCHI, M. A., KO, A. I., REIS, M. G., MCDONALD, K. L. & RILEY, L. W. (2002). Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. *Infect Immun*. 70. p. 6926-6932.
- 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. (2003). Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*. 3. p. 757-771.
- BRANGER, C., CHATRENET, B., GAUVRIT, A., AVIAT, F., AUBERT, A., BACH, J. M. & ANDRE-FONTAINE, G. (2005). Protection against *Leptospira interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. *Infect Immun*. 73. p. 4062-4069.
- BRANGER, C., SONRIER, C., CHATRENET, B., KLONJKOWSKI, B., RUVOEN-CLOUET, N., AUBERT, A., ANDRE-FONTAINE, G. & ELOIT, M. (2001). Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. *Infect Immun*. 69. p. 6831-6838.
- CAIMANO, M. J., SIVASANKARAN, S. K., ALLARD, A., HURLEY, D., HOKAMP, K., GRASSMANN, A. A., HINTON, J. C. & NALLY, J. E. (2014). A Model System for Studying the Transcriptomic and Physiological Changes Associated with Mammalian Host-Adaptation by *Leptospira interrogans* Serovar Copenhageni. *PLoS Pathog*. 10. p. e1004004.
- CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M., FRAGA, T. R., SILVA, L. B., MONARIS, D., ABREU, P. A., STROBEL, S., JOZSI, M., ISAAC, L. & BARBOSA, A. S.

- (2012). Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with human complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. *J Infect Dis.* 205. p. 995-1004.
- CERQUEIRA, G. M. & PICARDEAU, M. (2009). A century of *Leptospira* strain typing. *Infect Genet Evol.* 9. p. 760-768.
- CHARON, N. W. & GOLDSTEIN, S. F. (2002). Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes. *Annu Rev Genet.* 36. p. 47-73.
- CHASSIN, C., PICARDEAU, M., GOUJON, J. M., BOURHY, P., QUELLARD, N., DANCHE, S., BADELL, E., D'ANDON, M. F., WINTER, N., LACROIX-LAMANDE, S., BUZONI-GATEL, D., VANDEWALLE, A. & WERTS, C. (2009). TLR4- and TLR2-mediated B cell responses control the clearance of the bacterial pathogen, *Leptospira interrogans*. *J Immunol.* 183. p. 2669-2677.
- CHOY, H. A. (2012). Multiple activities of LigB potentiate virulence of *Leptospira interrogans*: inhibition of alternative and classical pathways of complement. *PLoS One.* 7. p. e41566.
- COUTINHO, M. L., CHOY, H. A., KELLEY, M. M., MATSUNAGA, J., BABBITT, J. T., LEWIS, M. S., ALEIXO, J. A. G. & HAAKE, D. A. (2011). A LigA Three-Domain Region Protects Hamsters from Lethal Infection by *Leptospira interrogans*. *PLoS Negl Trop Dis.* 5. p. e1422.
- DELLAGOSTIN, O. A., GRASSMANN, A. A., HARTWIG, D. D., FELIX, S. R., DA SILVA, E. F. & MCBRIDE, A. J. (2011). Recombinant vaccines against leptospirosis. *Hum Vaccin.* 7. p. 1215-1224.
- EVANGELISTA, K. V. & COBURN, J. (2010). *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol.* 5. p. 1413-1425.
- FENG, C. Y., LI, Q. T., ZHANG, X. Y., DONG, K., HU, B. Y. & GUO, X. K. (2009). Immune strategies using single-component LipL32 and multi-component recombinant LipL32-41-OmpL1 vaccines against *Leptospira*. *Braz J Med Biol Res.* 42. p. 796-803.
- FRAGA, T. R., BARBOSA, A. S. & ISAAC, L. (2011). Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. *Scand J Immunol.* 73. p. 408-419.
- FRAGA, T. R., COURROL DDOS, S., CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M., HIRATA, I. Y., VASCONCELLOS, S. A., JULIANO, L., BARBOSA, A. S. & ISAAC, L. (2014). Immune Evasion by Pathogenic *Leptospira* Strains: The Secretion of Proteases that Directly Cleave Complement Proteins. *J Infect Dis.* 209. p. 876-886.
- GORIS, M. G., LEEFLANG, M. M., LODEN, M., WAGENAAR, J. F., KLATSER, P. R., HARTSKEERL, R. A. & BOER, K. R. (2013). Prospective evaluation of three rapid diagnostic tests for diagnosis of human leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 7. p. e2290.
- GUO, Y. J., WANG, K. Y. & SUN, S. H. (2010). Identification of an HLA-A*0201-restricted CD8(+) T-cell epitope encoded within Leptospiral immunoglobulin-like protein A. *Microbes Infect.* 12. p. 364-373.

- HAAKE, D. A., MAZEL, M. K., MCCOY, A. M., MILWARD, F., CHAO, G., MATSUNAGA, J., WAGAR, E. A. (1999) Leptospiral Outer Membrane Proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infection and Immunity*. 67. p.6572-6582.
- HAAKE, D. A. & MATSUNAGA, J. (2010). *Leptospira*: a spirochaete with a hybrid outer membrane. *Mol Microbiol*. p.
- HARTSKEERL, R. A., COLLARES-PEREIRA, M. & ELLIS, W. A. (2011). Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect*. 17. p. 494-501.
- HARTWIG, D. D., FORSTER, K. M., OLIVEIRA, T. L., AMARAL, M., MCBRIDE, A. J. & DELLAGOSTIN, O. A. (2013). A prime-boost strategy using the novel vaccine candidate, LemA, protects hamsters against leptospirosis. *Clin Vaccine Immunol*. 20. p. 747-752.
- HOTEZ, P. J., BOTTAZZI, M. E., FRANCO-PAREDES, C., AULT, S. K. & PERIAGO, M. R. (2008). The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Negl Trop Dis*. 2. p. e300.
- JOST, B. H., ADLER, B., VINH, T. & FAINE, S. (1986). A monoclonal antibody reacting with a determinant on leptospiral lipopolysaccharide protects guinea pigs against leptospirosis. *J Med Microbiol*. 22. p. 269-275.
- KO, A. I., GOARANT, C. & PICARDEAU, M. (2009). *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 7. p. 736-747.
- KOIZUMI, N. & WATANABE, H. (2005). Leptospirosis vaccines: past, present, and future. *J Postgrad Med*. 51. p. 210-214.
- LAMBERT, A., PICARDEAU, M., HAAKE, D. A., SERMSWAN, R. W., SRIKRAM, A., ADLER, B. & MURRAY, G. A. (2012). FlaA proteins in *Leptospira interrogans* are essential for motility and virulence but are not required for formation of the flagellum sheath. *Infect Immun*. 80. p. 2019-2025.
- LEVETT, P. N. (2001). Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*. 14. p. 296-326.
- LI, C., MOTAEB, A., SAL, M., GOLDSTEIN, S. F. & CHARON, N. W. (2000). Spirochete periplasmic flagella and motility. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2. p. 345-354.
- LIAO, S., SUN, A., OJCIUS, D. M., WU, S., ZHAO, J. & YAN, J. (2009). Inactivation of the fliY gene encoding a flagellar motor switch protein attenuates mobility and virulence of *Leptospira interrogans* strain Lai. *BMC Microbiol*. 9. p. 253.
- LIM, V. K. (2011). Leptospirosis: a re-emerging infection. *Malays J Pathol*. 33. p. 1-5.
- MACIEL, E. A., DE CARVALHO, A. L., NASCIMENTO, S. F., DE MATOS, R. B., GOUVEIA, E. L., REIS, M. G. & KO, A. I. (2008). Household transmission of *Leptospira* infection in urban slum communities. *PLoS Negl Trop Dis*. 2. p. e154.
- MATSUI, M., SOUPE, M. E., BECAM, J. & GOARANT, C. (2012). Differential in vivo gene expression of major *Leptospira* proteins in resistant or susceptible animal models. *Appl Environ Microbiol*. 78. p. 6372-6376.

- MCBRIDE, A. J., ATHANAZIO, D. A., REIS, M. G. & KO, A. I. (2005). Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis.* 18. p. 376-386.
- MERI, T., MURGIA, R., STEFANEL, P., MERI, S. & CINCO, M. (2005). Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospires. *Microb Pathog.* 39. p. 139-147.
- MURGIA, R., GARCIA, R. & CINCO, M. (2002). Leptospire are killed in vitro by both oxygen-dependent and -independent reactions. *Infect Immun.* 70. p. 7172-7175.
- MUSSO, D. & LA SCOLA, B. (2013). Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge. *J Microbiol Immunol Infect.* 46. p. 245-252.
- NAIMAN, B. M., BLUMERMAN, S., ALT, D., BOLIN, C. A., BROWN, R., ZUERNER, R. & BALDWIN, C. L. (2002). Evaluation of type 1 immune response in naive and vaccinated animals following challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo: involvement of WC1(+) gammadelta and CD4 T cells. *Infect Immun.* 70. p. 6147-6157.
- PICARDEAU, M. (2013). Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med Mal Infect.* 43. p. 1-9.
- PICARDEAU, M., BERTHERAT, E., JANCLOES, M., SKOULOUDIS, A. N., DURSKI, K. & HARTSKEERL, R. A. (2014). Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 78. p. 1-8.
- PINNE, M., CHOY, H. A. & HAAKE, D. A. (2010). The OmpL37 surface-exposed protein is expressed by pathogenic *Leptospira* during infection and binds skin and vascular elastin. *PLoS Negl Trop Dis.* 4. p. e815.
- PINNE, M. & HAAKE, D. A. (2009). A comprehensive approach to identification of surface-exposed, outer membrane-spanning proteins of *Leptospira interrogans*. *PLoS One.* 4. p. e6071.
- QUE-GEWIRTH, N. L., RIBEIRO, A. A., KALB, S. R., COTTER, R. J., BULACH, D. M., ADLER, B., GIRON, I. S., WERTS, C. & RAETZ, C. R. (2004). A methylated phosphate group and four amide-linked acyl chains in *Leptospira interrogans* lipid A. The membrane anchor of an unusual lipopolysaccharide that activates TLR2. *J Biol Chem.* 279. p. 25420-25429.
- 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. (2008). Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. *PLoS Negl Trop Dis.* 2. p. e228.
- RISTOW, P., BOURHY, P., KERNEIS, S., SCHMITT, C., PREVOST, M. C., LILENBAUM, W. & PICARDEAU, M. (2008). Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. *Microbiology.* 154. p. 1309-1317.
- SEIXAS, F. K., DA SILVA, E. F., HARTWIG, D. D., CERQUEIRA, G. M., AMARAL, M., FAGUNDES, M. Q., DOSSA, R. G. & DELLAGOSTIN, O. A. (2007). Recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. *Vaccine.* 26. p. 88-95.

- SILVA, E. F., MEDEIROS, M. A., MCBRIDE, A. J., MATSUNAGA, J., ESTEVES, G. S., RAMOS, J. G., SANTOS, C. S., CRODA, J., HOMMA, A., DELLAGOSTIN, O. A., HAAKE, D. A., REIS, M. G. & KO, A. I. (2007). The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. *Vaccine*. 25. p. 6277-6286.
- STEVENSON, B., CHOY, H. A., PINNE, M., ROTONDI, M. L., MILLER, M. C., DEMOLL, E., KRAICZY, P., COOLEY, A. E., CREAMER, T. P., SUCHARD, M. A., BRISSETTE, C. A., VERMA, A. & HAAKE, D. A. (2007). *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. *PLoS One*. 2. p. e1188.
- VERMA, A., KUMAR, P., BABB, K., TIMONEY, J. F. & STEVENSON, B. (2010). Cross-reactivity of antibodies against leptospiral recurrent uveitis-associated proteins A and B (LruA and LruB) with eye proteins. *PLoS Negl Trop Dis*. 4. p. e778.
- VIEIRA, M. L., FERNANDES, L. G., DOMINGOS, R. F., OLIVEIRA, R., SIQUEIRA, G. H., SOUZA, N. M., TEIXEIRA, A. R., ATZINGEN, M. V. & NASCIMENTO, A. L. (2013). Leptospiral extracellular matrix adhesins as mediators of pathogen-host interactions. *FEMS Microbiol Lett*. p. 129-139.
- VIJAYACHARI, P., SUGUNAN, A. P. & SHRIRAM, A. N. (2008). Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J Biosci*. 33. p. 557-569.
- WERTS, C., TAPPING, R. I., MATHISON, J. C., CHUANG, T. H., KRAVCHENKO, V., SAINT GIRONS, I., HAAKE, D. A., GODOWSKI, P. J., HAYASHI, F., OZINSKY, A., UNDERHILL, D. M., KIRSCHNING, C. J., WAGNER, H., ADEREM, A., TOBIAS, P. S. & ULEVITCH, R. J. (2001). Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol*. 2. p. 346-352.
- WHO. 2003. *Human leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control*.
- WU, Q., XU, L., WANG, X., LI, S. & WANG, B. (1992). Investigation of microbicidal activity of neutrophil defensins against leptospires. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 23. p. 126-129.
- ZHANG, K., MURRAY, G. L., SEEMANN, T., SRIKRAM, A., BARTPHO, T., SERMSWAN, R. W., ADLER, B. & HOKE, D. E. (2013). Leptospiral LruA is required for virulence and modulates an interaction with mammalian apolipoprotein AI. *Infect Immun*. 81. p. 3872-3879.
- ZUERNER, R. L., ALT, D. P., PALMER, M. V., THACKER, T. C. & OLSEN, S. C. (2011). A *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo vaccine induces a Th1 response, activates NK cells, and reduces renal colonization. *Clin Vaccine Immunol*. 18. p. 684-691.