

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Expressão de antígenos de *Leptospira interrogans*
em *Mycobacterium bovis* BCG e avaliação como
vacina recombinante contra leptospirose**

Jessica Dorneles

Pelotas, 2020

Jessica Dorneles

**Expressão de antígenos de *Leptospira interrogans* em *Mycobacterium bovis*
BCG e avaliação como vacina recombinante contra leptospirose**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Ciências (áreas do Conhecimento: Biologia Molecular e Imunologia).

Orientador: Odir Antônio Dellagostin

Coorientadora: Thaís Larré Oliveira

Pelotas, 2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

D713e Dorneles, Jessica

Expressão de antígenos de *Leptospira interrogans* em *Mycobacterium bovis* BCG e avaliação como vacina recombinante contra leptospirose / Jessica Dorneles ; Odir Antônio Dellagostin, orientador ; Thais Larré Oliveira, coorientadora. — Pelotas, 2020.

55 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Proteínas leptospirais. 2. Porções. 3. Vetor vacinal. 4. Micobactéria. 5. Proteção. I. Dellagostin, Odir Antônio, orient. II. Oliveira, Thais Larré, coorient. III. Título.

CDD : 614.56

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

BANCA EXAMINADORA

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

Prof.^a Dr.^a Sibeles Borsuk (CDTec, UFPel)

Prof.^a Dr.^a Caroline Rizzi (Faculdade de Medicina, UFFS)

Prof.^a Dr.^a Thaís Larré Oliveira (coorientadora – CDTec, UFPel)

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

À minha mãe Luisa Helena, por toda ajuda, amor e dedicação
Com carinho dedico.

Agradecimentos

À minha mãe Luisa Helena, por todos seus esforços, dedicação e carinho;

Ao meu namorado Patrick, por todo amor, carinho e compreensão;

À minha família, por todo apoio e incentivo;

À Universidade Federal de Pelotas, por oferecer ensino público de qualidade, e disponibilizar o Centro de Biotecnologia, com professores qualificados e renomados que possuem entusiasmo e amor para compartilhar conhecimento;

Ao meu orientador Odir Dellagostin, por toda oportunidade de crescimento profissional, e por disponibilizar todos os recursos para o desenvolvimento dos experimentos;

À minha coorientadora Thaís Oliveira, por toda ajuda, disponibilidade, incentivo, ensinamentos;

À Caroline Rizzi, pela amizade e por todo auxílio no começo dos experimentos.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Vacinologia, por toda colaboração, compartilhamento de matérias, por proporcionar um ambiente de trabalho mais animado, em especial a Janaína, Andriele, Amilton, Amanda e Everton pelo auxílio no desenvolvimento dos experimentos;

Aos órgãos de fomento CAPES, FAPERGS E CNPq, pelo financiamento do projeto e a CAPES pela bolsa disponibilizada (o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001).

Muito obrigada!

Resumo

DORNELES, Jessica. **Expressão de antígenos de *Leptospira interrogans* em *Mycobacterium bovis* BCG e avaliação como vacina recombinante contra leptospirose.** 2020. 55f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Mycobacterium bovis BCG é uma vacina viva atenuada, utilizada como vacina contra a tuberculose humana. Dentre várias características atrativas, ela apresenta propriedades adjuvantes, tornando-a um vetor vacinal de alta relevância para expressão de antígenos heterólogos de diversos micro-organismos, incluindo de *Leptospira* spp., agente etiológico da leptospirose. Esta doença infecciosa acomete animais e seres humanos em todo o mundo. O contágio se dá através do contato direto com água ou solo contaminados com leptospirosas patogênicas. As leptospirosas são classificadas em mais de 300 sorovares. Esta diversidade antigênica impossibilita que as bacterinas (vacinas produzidas com bactérias inativadas) disponíveis confirmem uma proteção de amplo espectro. Visando a produção de uma única vacina protetora contra a leptospirose, estudos são realizados com proteínas comuns a todos os sorovares, estão expostas na membrana externa das leptospirosas patogênicas, ou que são expressas no momento da infecção, sendo LipL32, LemA e LigAni, proteínas que possuem tais características. A inserção de genes em um vetor de expressão, é facilitada pelo Padrão BioBricks®, que consiste em uma estratégia que permite a construção de moléculas biológicas compatíveis entre si, onde a clonagem é realizada de forma simples, reprodutível e padronizada. Neste trabalho, quatro porções - P₁ (*lipL32*), P₂ (*ligAni*), P₃ (*lemA:ligAni*) e P₄ (*lipL32:lemA*) – de uma quimera recombinante previamente construída, foram clonadas utilizando a estratégia BioBricks® no plasmídeo pUP500/P_{PAN}. Estas construções foram transformadas em *M. bovis* BCG cepa Pasteur, e a expressão das proteínas foi detectada por *Western blot*, onde para detectar as porções 1 e 4 foi utilizado o anticorpo primário anti-LipL32, e anticorpo secundário, anti-IgG de hamster. Para detectar as porções 2 e 3, foi utilizado anticorpo primário anti-LigAni e anticorpo secundário anti-IgG de coelho. Para a inoculação, foram utilizados 5 grupos de dez hamsters sírios cada com idade de 4-6 semanas, sendo estes: grupo 1, rBCG(LipL32); grupo 2, rBCG(LigAni); grupo 3, rBCG(LemA:LigAni); grupo 4, (LipL32:LemA); grupo 5, BCG Pasteur não transformado (controle negativo). Foram administradas duas doses de cada formulação vacinal e do controle negativo, contendo 10⁶ UFC com intervalo de 21 dias, e o desafio foi realizado com 5 x DL₅₀ de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1130. Os animais foram acompanhados por 30 dias após o desafio. Os sintomas de leptospirose foram observados apenas no grupo controle negativo. As formulações vacinais contendo os rBCGs conferiram 100% de proteção, com imunidade esterilizante. Níveis significativos de anticorpos contra as proteínas LipL32, LemA e LigAni, não foram detectados nos soros dos hamsters. Com este trabalho, conclui-se que as vacinas recombinantes de *M. bovis* BCG possuem potencial para conferir proteção significativa com imunidade esterilizante contra a leptospirose em desafio homólogo em hamsters, sendo o BCG um vetor vacinal de alta relevância.

Palavras-chave: Proteínas leptospirais; porções; vetor vacinal; micobactéria; proteção.

Abstract

DORNELES, Jessica. **Cloning of *Leptospira interrogans* antigens by the BioBricks® method and evaluation as a vaccine vectored by *Mycobacterium bovis* BCG against animal leptospirosis.** 2020. 55f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Mycobacterium bovis BCG is a live attenuated vaccine, used as a vaccine against human tuberculosis. Among several attractive features, it has adjuvant properties, making it a highly relevant vaccine vector for expression of heterologous antigens from several microorganisms, including *Leptospira* spp., the etiological agent of leptospirosis. This infectious disease affects animals and humans worldwide. Infection occurs through direct contact with water or soil contaminated with pathogenic leptospires. Leptospires are classified into more than 300 serovars. This antigenic diversity makes it impossible for the available bacterins (vaccines produced with inactivated bacteria) to provide broad spectrum protection. Aiming at producing a single protective vaccine against leptospirosis, studies are performed with proteins common to all serovars, are exposed on the outer membrane of pathogenic leptospires, or are expressed at the time of infection, being LipL32, LemA and LigAni, proteins that have such characteristics. The insertion of genes in an expression vector is facilitated by the BioBricks® Standard, which consists of a strategy that allows the construction of biological molecules compatible with each other, where cloning is performed in a simple, reproducible and standardized way. In this work, four portions - P₁ (*lipL32*), P₂ (*ligAni*), P₃ (*lemA:ligAni*) and P₄ (*lipL32:lemA*) - of a recombinant chimera previously built, were cloned using the BioBricks® strategy in plasmid pUP500/P_{pAN}. These constructs were transformed into *M. bovis* BCG strain Pasteur, and the expression of the proteins was detected by Western blot, where to detect portions 1 and 4 the primary antibody anti-LipL32 was used, and secondary antibody, anti-hamster IgG. To detect portions 2 and 3, primary anti-LigAni antibody and secondary anti-rabbit IgG antibody were used. For inoculation, 5 groups of ten Syrian hamsters each aged 4-6 weeks were used, being these: group 1, rBCG (LipL32); group 2, rBCG (LigAni); group 3, rBCG (LemA:LigAni); group 4, (LipL32:LemA); group 5, BCG Pasteur unprocessed (negative control). Two doses of each vaccine formulation and negative control were administered, containing 10⁶ CFU with an interval of 21 days, and the challenge was performed with 5 x LD₅₀ of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1130. The animals were followed up for 30 days after the challenge. Symptoms of leptospirosis were observed only in the negative control group. Vaccine formulations containing rBCGs provided 100% protection, with sterilizing immunity. Significant levels of antibodies against the proteins LipL32, LemA and LigAni, were not detected in the hamsters' sera. With this work, we conclude that recombinant vaccines of *M. bovis* BCG have the potential to provide significant protection with sterilizing immunity against leptospirosis in a homologous challenge in hamsters, with BCG being a highly relevant vaccine vector.

Keywords: Leptospiral proteins; chimera; vaccine vector; *Mycobacterium*; protection.

Lista de abreviaturas

APC - Célula apresentadora de antígenos
BCG - Bacilo Calmette-Guérin
BSA - Albumina sérica bovina
CDS - Sequência codificadora de DNA
CONCEA - Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal
DO - Densidade Óptica
ELISA - Ensaio imunoenzimático
EMJH - Meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris
LD50/DL50 - Dose letal a 50% dos animais
IL - Interleucina
LPS - Lipopolissacarídeo
MIT - Instituto de Tecnologia de Massachusetts
NET - Armadilha extracelular de neutrófilos
OMP - Proteínas de membrana externa
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
PBS - Tampão Salina de Fosfato
Q1 - Quimera 1
qPCR - PCR quantitativo em tempo real
rBCG - BCG recombinante
RBS - sítio de ligação ao ribossomo
SDS-PAGE - Eletroforese em gel de acrilamida – dodecil sulfato de sódio
TB - Tuberculose
TBDR - Receptores dependentes de TonB
TLR - Receptor do tipo Toll
TNF - Fator de necrose tumoral
UFC - Unidades formadoras de colônia

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1. Leptospirose.....	11
2.1.1 <i>Leptospira</i> spp.....	11
2.1.2 Epidemiologia, transmissão e manifestações clínicas.....	12
2.1.3 Indução do sistema imune e profilaxia	13
2.1.4 Genômica	14
2.2 Antígenos Vacinais.....	15
2.2.1 LipL32.....	15
2.2.2 LemA.....	16
2.2.3 LigAni	16
2.3 Micobactérias	17
2.3.1 <i>Mycobacterim bovis</i> BCG	17
2.3.2 Utilização de rBCG para a expressão de antígenos heterólogos	17
3 HIPÓTESE E OBJETIVOS	20
3.1 Hipótese	20
3.2 Objetivo Geral	20
3.3 Objetivos Específicos	20
4 CAPÍTULO	21
4.1 Manuscrito - Protection against leptospirosis conferred by <i>Mycobacterium bovis</i> BCG expressing antigens from <i>Leptospira interrogans</i>	21
5 CONCLUSÃO GERAL.....	43
6 REFERÊNCIAS.....	44
ANEXOS	50

1 INTRODUÇÃO GERAL

Mycobacterium bovis BCG é utilizado para controle da tuberculose humana (Zhu et al., 2018). É um excelente vetor vacinal para prevenção de outras doenças infecciosas por apresentar vantagens importantes, como replicar-se em células apresentadoras de antígenos (APC), tornando-a capaz de conferir proteção de longa duração, induzindo imunidade Th1 e Th2 (Ohara et. al, 2001). Além disso, a parede celular de micobactérias é um dos mais potentes adjuvantes imunológicos conhecidos (adjuvante de Freund completo). Diversos estudos já constataram a eficiente capacidade do BCG em expressar antígenos heterólogos de vários microrganismos, incluindo de *Leptospira* spp. (Seixas et. al, 2007; Oliveira et. al, 2019a).

Espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* são o agente etiológico da leptospirose, uma zoonose negligenciada de distribuição mundial que atinge aproximadamente 1 milhão de casos anuais e 60 mil mortes em humanos (Costa et al., 2015). O contágio se dá através da exposição a água ou solo contaminados com a urina de animais portadores da bactéria, especialmente em períodos de chuva intensa, e em situações de falta de saneamento básico e superpopulação, as quais favorecem a disseminação da espiroqueta (Adler e de la Peña Moctezuma, 2010). Atualmente estima-se que existam mais de 300 sorovares de leptospira (Guglielmini et al., 2019). Esta divisão impossibilita as bacterinas (vacinas constituídas de bactérias inativadas) de conferir ampla proteção, pois sua estratégia é induzir anticorpos contra o antígeno O que compõe o LPS (lipopolissacarídeo presente na membrana externa), sendo este distinto em cada sorovar (Cameron, 2015). Estas vacinas também induzem imunidade de curta duração e reatogenicidade para humanos, sendo permitido o uso humano apenas em poucos países, como China, Cuba, Japão e Vietnã (Dellagostin et al., 2011).

Diversos estudos já foram realizados com diferentes alvos vacinais a fim de desenvolver uma vacina capaz de conferir ampla proteção. Dentre os alvos, temos a proteína LigA, que é expressa somente na superfície da membrana externa de leptospiros patogênicas e apresenta capacidade de ligação à componentes da matriz extracelular (Matsunaga et al., 2003). A proteína LipL32 também apresenta as características supracitadas e é altamente expressa durante a infecção em mamíferos (Haake et al., 2000). A proteína LemA está ancorada à membrana externa com a

porção N-terminal no meio extracelular, porém sua exata função ainda não foi identificada (Hartwig et al., 2011).

A clonagem de uma sequência gênica em um vetor de expressão torna-se mais simples e padronizada com a utilização do padrão BioBricks®. Tal abordagem consiste na utilização de sequências prefixo (que apresentam sítios para as enzimas de restrição *EcoRI* e *XbaI*) e sequências sufixo (sítios para *SpeI* e *PstI*) que flanqueiam o fragmento alvo nas regiões terminais 5' e 3' de uma molécula de DNA de interesse, respectivamente. As sequências que são digeridas pelas enzimas de restrição *SpeI* e *XbaI* passam a conter extremidades compatíveis entre si. A ligação das partes a montante e a jusante produz uma região de 6 pb "mista" ou "resíduo" de sequência entre as duas partes, que não podem mais ser digeridas, pois deixam de ser reconhecidas por qualquer uma das enzimas. Uma vez obtida a molécula clonada, essa ainda pode ser novamente digerida com *XbaI* ou *SpeI* em etapas subsequentes de montagem. Assim, o mesmo processo, iterativo de digestão e de ligação pode ser usado para montar várias sequências num sistema biológico sintético (Shetty et al., 2008). Sendo assim, o padrão BioBricks® facilita a clonagem de sequências de DNA compatíveis entre si, de forma padronizada e reproduzível.

Os experimentos realizados neste trabalho visaram o desenvolvimento de vacinas recombinantes contra a leptospirose através da utilização de *M. bovis* BCG como vetor vacinal, expressando individualmente as porções P₁ (*lipL32*), P₂ (*ligAni*), P₃ (*lemA:ligAni*) e P₄ (*lipL32:lemA*) da quimera recombinante 1 (Oliveira et al., 2019), clonados no vetor de expressão pUP500/P_{DAN} através do padrão BioBricks®. Além disso, o presente trabalho também objetivou avaliar qual porção apresenta maiores taxas de proteção contra a leptospirose em hamsters sírios.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Leptospirose

2.1.1 *Leptospira* spp.

Leptospiras são bactérias pertencentes à Ordem Spirochaetales, sendo descritas 35 espécies do gênero *Leptospira*, e mais de 300 sorovares. Atualmente as leptospiras estão classificadas em três grupos devido as análises filogenéticas: saprófitas, intermediárias e patogênicas (Thibeaux et al., 2018). As espécies patogênicas possuem fatores de virulência capazes de desencadear a doença no hospedeiro. As intermediárias compartilham um ancestral quase comum com as espécies patogênicas e apresentam patogenicidade moderada em humanos e animais. As saprófitas não causam doença e sobrevivem no meio ambiente, em solo úmido e água doce por semanas (Vincent et.al, 2019). O ciclo de vida da bactéria envolve diversos fatores, como a sua liberação na urina de hospedeiros infectados e a capacidade de persistir no meio ambiente úmido por vários dias. Além disso, a facilidade de penetração através da pele e mucosas injuriadas, permite sua entrada em um novo hospedeiro, bem como a capacidade de se disseminar no sangue e colonizar os túbulos renais, onde escapam do sistema imune (Adler e de la Peña Moctezuma, 2010).

Leptospira spp. possuem forma helicoidal e extremidades em forma de gancho, o que as difere de outras espiroquetas. Medem de 10-20 µm de comprimento, e 0,15 µm de diâmetro (Picardeau, 2017). Sua parede celular possui características semelhantes as bactérias Gram negativas, apresentando membrana dupla. Os lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas e proteínas integrais transmembrana constituem a membrana externa da bactéria. Cada sorovar possui o LPS distinto, devido a estrutura de seu antígeno O, que se estende para o exterior da célula, ser diferenciada. Esta característica é um fator de virulência para a bactéria e também utilizada para o teste microscópico de aglutinação, diagnóstico padrão para confirmação dos casos de leptospirose (Nally, et. al, 2005).

Aeróbias e fastidiosas, as leptospiras necessitam de 16 h para replicação *in vitro* à temperatura de 28-30 °C, e em pH ótimo de 7,2-7,6, em meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), geralmente suplementado com soro de coelho e

albumina sérica bovina (BSA) (Cameron, 2015). O meio também precisa conter fontes de carbono, provenientes de ácidos graxos de cadeia longa; nitrogênio, proveniente exclusivamente de íons amônia; além da presença de nutrientes específicos, como fosfatos, cálcio, magnésio e ferro (Herman et al., 2016).

2.1.2 Epidemiologia, transmissão e manifestações clínicas

A leptospirose é uma zoonose complexa com múltiplos modos de transmissão, amplo espectro de hospedeiros, uma infinidade de sorovares infectantes, manifestação clínica inespecífica e diagnóstico difícil. Estima-se que o número de casos graves chegue a 1 milhão e 60 mil mortes anualmente. Por ser uma doença com mais incidência em países tropicais subdesenvolvidos, onde a vigilância sanitária é limitada, e por causar sintomas semelhantes aos de outras doenças infecciosas, acredita-se que estes dados sejam subestimados (Picardeau, 2015).

A transmissão ocorre através do contato direto com a urina de animais que carregam as espiroquetas. A forma indireta, sendo a forma mais comum de infecção, está associada a atividades ocupacionais e recreacionais em países desenvolvidos, assim como, à falta de saneamento básico e a ocorrência de enchentes em países em desenvolvimento (Adler e de la Peña Moctezuma, 2010). Os seres humanos são hospedeiros acidentais, devido à proximidade com animais, principalmente domésticos, como os cães. Diferentes sorovares são encontrados em animais selvagens e mamíferos (Adler, 2015a). Os ratos e os camundongos, são os reservatórios mais importantes no ciclo da doença, sendo hospedeiros não suscetíveis, possuindo assim papel fundamental na disseminação do patógeno (Haaake and Levett, 2015).

A leptospirose varia em gravidade, de uma doença febril leve a uma doença que causa a morte do paciente. Apresenta duas fases: leptospirêmica/aguda – leptospiplas circulantes no sangue, causando febre e mialgia – e leptospiúrica/convalescente – passam a colonizar os órgãos causando diferentes danos (Costa et al., 2015). Os rins são imunoprevilegiados, fato este que explica a preferência das leptospiplas pelos túbulos proximais e causam insuficiência renal, necrose do epitélio e edema intersticial (Yang, 2018). Nos pulmões os sintomas variam de tosse a hemorragia pulmonar, levando a falência respiratória (Adler, 2015a). Através da destruição das junções dos hepatócitos, ao captarem ferro da

hemoglobina, causam a icterícia (Miyahara et al., 2014). O desencadeamento de citocinas de forma exagerada pelo sistema imune para combater a infecção pode desempenhar um papel considerável no desenvolvimento de leptospirose grave (Cagliero et al., 2018). Outros órgãos ainda podem ser atingidos, como o cérebro, causando meningite asséptica (Wang et al., 2016). Miocardites, arritmias e falhas cardíacas com potenciais desfechos letais são também relatados por Shah et al. (Shah et al., 2010)

A leptospirose traz também grandes perdas econômicas no setor pecuário, principalmente ao infectar bovinos, causando aborto, natimorto, parto prematuro e nascimento de bezerros fracos. Nos suínos e búfalos há o surgimento de hemorragia, hematúria, icterícia e sinais de insuficiência renal, em alguns casos levando ao óbito. Já em equinos a maioria das infecções é subclínica, porém quando há a manifestação da infecção aguda, os sintomas observados são os mesmos que em infecção grave de outras espécies, como hemoglobinúria, icterícia e função renal comprometida. Aborto, natimorto e nascimento de potros infectados que podem mostrar graves sinais clínicos são sequelas comuns de infecção (Ellis, 2015).

2.1.3 Indução do sistema imune e profilaxia

A presença de *Leptospira* spp. no organismo estimula o sistema imunológico a produzir citocinas pró-inflamatórias por macrófagos, incluindo IL-1b, IL-6, IL-8 e TNF- α (Werts et al., 2018). A correlação entre os níveis de IL-10 e TNF- α tem sido constantemente avaliada e relacionada com o curso da leptospirose (Mikulski et al., 2015). Altos níveis de TNF- α indicam danos severos no hospedeiro como hemorragia pulmonar e morte (Kyriakidis et al., 2011), bem como a atividade anti-inflamatória da IL-10 é relevante no controle da progressão da doença (Mikulski et al., 2015). Após a liberação dos componentes inflamatórios, os neutrófilos são atraídos até o local da infecção e liberam agentes antimicrobianos e suas armadilhas extracelulares (NETs), auxiliando no combate à doença (Scharrig et al., 2015). Estudos demonstram que camundongos deficientes de neutrófilos apresentam maior concentração da bactéria nos rins (Scharrig et al., 2015). Os Toll Like Receptors são receptores de reconhecimento de padrões de componentes microbianos conservados, como o LPS, e desencadeiam uma resposta inata no combate ao patógeno. O LPS leptospiral sinaliza por TLR2 em células humanas (hospedeiro suscetível), mas é reconhecido

por TLR4 e TLR2 em células murinas (hospedeiro não suscetível), devido ao reconhecimento diferencial da fração lipídica A atípica do LPS leptospiral (Werts et al. 2001; Chassin et al., 2009). Em hospedeiros não suscetíveis, a ativação do TLR4 se mostra necessária para uma rápida produção de imunoglobulinas e a remoção das leptospiros do sangue (Chassin et al., 2009).

Vacinas bacterinas são utilizadas como profilaxia para a leptospirose. São produzidas com bactérias mortas, através de métodos como calor, formalina, fenol, etanol, descongelamento e irradiação (Adler, 2015b). Elas possuem várias desvantagens, sendo administradas apenas em bovinos, suínos e cães, pois em humanos causa reatogenicidade devido a constituintes do meio de crescimento das bactérias (Adler, 2015b). A imunidade por elas conferida é sorovar específica, o que requer conhecimento sobre os sorovares circulantes nas regiões, além de formulações multivalentes. Por fim, a imunidade é direcionada principalmente contra o lipopolissacarídeo leptospiral (LPS), um antígeno T-independente e, portanto, envolve apenas os anticorpos IgM, o que não gera uma resposta de memória, sendo necessários reforços anuais (Adler, 2015b).

2.1.4 Genômica

O genoma de leptospiros começou a ser analisados em 2003, onde dois sorvares de *L. interrogans*, Lai (Ren et al., 2003) e Copenhageni (Nascimento et al., 2004), foram sequenciados. Ambos sorovares possuem um grande cromossomo circular (4.277 kb, 35% molar de GC) e um replicon menor (350 kb, 35% molar de GC). A maioria dos cromossomos de *L. interrogans* é colinear, exceto algumas lacunas e uma grande inversão no cromossomo grande (Nascimento et al. 2004).

Em um estudo recente, foi realizada a análise comparativa do genoma inteiro de 20 espécies do gênero *Leptospira* spp. Os resultados obtidos descreveram o genoma de *Leptospira* spp. contendo aproximadamente 4,26 Mpb, sendo constituído de dois cromossomos, o maior possuindo mais de 3,6 Mpb e o menor contando com aproximadamente 300 Kpb. (Fouts et al., 2016). Possuem conteúdo G+C médio de 40,7%, variando de 35,5% em *L. noguchii* a 45,6% em *L. wolffii*. Os genomas demonstram codificar para uma média de 4.197 proteínas. Aproximadamente 1.764 genes mostraram pertencer ao *core-genoma* da bactéria, sendo compartilhado entre as espécies, enquanto que 17.477 genes compõem o *pan-genoma*. Espécies

patogênicas demonstram ainda possuir um número maior de genes específicos (Fouts et al., 2016).

O genoma de *L. interrogans* contém 4 fatores sigma para a regulação de expressão gênica: o fator *housekeeping* $\sigma 70$ sigma (RpoD) e os fatores sigma alternativos $\sigma 28$ (RpoF), $\sigma 54$ (RpoN), e $\sigma 24$ (RpoE) que proporcionam a especificidade de reconhecimento de promotor para a polimerase e contribuem para a adaptação ambiental da bactéria (Zhukova et al., 2017). Sabe-se que as *Leptospiras* spp realizam modificações pós traducionais. Recentemente, foram identificadas 32 proteínas fosforiladas, 46 acetiladas e 155 metiladas, que confirmaram múltiplas modificações em procariontes, e também sugerem que *L. interrogans* compartilha semelhanças significativas com os sistemas de modificação de proteínas em eucariotos (Cao et al., 2010; Nally et al., 2017).

2.2 Antígenos Vacinais

Vacinas recombinantes que contenham em sua formulação antígenos comuns a todas espécies patogênicas de *Leptospira*, capazes de estimular o sistema imunológico, são a alternativa mais promissora para se ter uma vacina universal contra a leptospirose. Buscam alvos vacinais expostos ao meio extracelular (localizados na membrana externa), conservados entre as espécies e sorovares patogênicos, e expressos durante a infecção (Dellagostin et al., 2017). Com tais características, destacam-se as proteínas LipL32, LemA e LigAni.

2.2.1 LipL32

A LipL32 é uma lipoproteína altamente conservada, imunogênica, presente apenas na superfície da membrana de leptospiras patogênicas (Murray et al., 2013), induz sinais inflamatórios através do componente imune inato, receptor TLR2 (Hsu et al., 2010). Estudos também demonstram a interação de LipL32 com proteínas da matriz extracelular, como colágeno I, colágeno V, laminina (Hoke et. al, 2008), colágeno IV e fibronectina (Hauk et al., 2008), o que permite a ligação, arraste e parada de leptospiras no endotélio dos vasos sanguíneos do hospedeiro, fator importante para a virulência do patógeno (Murray, 2015). A eficácia de vacinas

baseadas em LipL32 contra leptospirose nas construções de DNA, BCG ou Adenovírus é baixa e variável (38–72%) e as vacinas de subunidade recombinante não conferiram nenhuma proteção significativa em modelos animais (Dellagostin et al., 2011).

2.2.2 LemA

A lipoproteína LemA possui uma hélice transmembrana, com um terminal amino extracelular, e sua modificação subsequente forma um epítipo que é apresentado na superfície dos fagócitos. A função biológica desta proteína permanece desconhecida (Hartwig et al., 2013). A ligação de LemA recombinante à laminina, fibrinogênio e colágeno tipo IV indica um possível papel dessa proteína como uma adesina na patogênese de *Leptospira* spp. (Oliveira et al., 2018). A vacinação com rLemA, associada ao Alhydrogel, conferiu 50% de sobrevivência em hamsters, sem diferença significativa em comparação com o grupo controle, e não proporcionou imunidade esterilizante (Hartwig et al., 2013). O uso de AddaVax como adjuvante na vacina de subunidade baseada em rLemA aumentou a sobrevivência para 87,5%, não sendo detectada a presença de leptospiras na cultura renal (Oliveira et al., 2018).

2.2.3 LigAni

A proteína LigA consiste em 13 domínios semelhantes a imunoglobulina e possui repetições em tandem, sendo exposta na superfície apenas de sorovares patogênicos de *Leptospira* spp. e expressa durante infecção aguda (Matsunaga et al., 2003). Estudos relatam que a indução osmótica de LigA recombinante é acompanhada por aumentos de 1,6 a 2,5 vezes na adesão leptospiral à matriz extracelular imobilizada. As proteínas plasmáticas, colágenos I e IV, laminina e, principalmente, fibronectina e fibrinogênio, sugerem que estas adesinas podem estar envolvidas nos estágios iniciais de colonização e disseminação da bactéria (Choy et al., 2007). Estudos demonstraram que formas recombinantes de LigA servem como vacinas eficazes contra a leptospirose em modelos animais, porém não conferem imunidade esterilizante (Palaniappan et al., 2006; Silva et al., 2007).

Recentemente em um estudo realizado por Oliveira et al. (2019a), avaliou a imunoproteção conferida por uma quimera recombinante composta pelos genes

lipL32, *lemA* e *ligAni*, como vacina vetorizada por *Mycobacterium bovis* BCG em hamsters. Esta quimera recombinante foi clonada no vetor pUP500 construído com o promotor de micobactéria pAN. Ao final do experimento obteve-se proteção de 100%, onde as análises através de cultura renal e PCR em tempo real não detectaram carga leptospiral, indicando uma imunidade esterilizante (Oliveira et al., 2019a).

2.3 Micobactérias

2.3.1 *Mycobacterim bovis* BCG

As micobactérias pertencem à ordem *Actinomycetales* e à família *Mycobacteriaceae*, possuindo um único gênero denominado *Mycobacterium*. Estas bactérias são caracterizadas por um envelope celular complexo composto pelos ácidos micólicos, ácidos graxos de cadeia longa, que permitem a caracterização do gênero através da coloração de Ziehl-Neelsen. Estes ácidos graxos incomuns conferem baixa permeabilidade à parede celular micobacteriana. Os bacilos são resistentes à ação de agentes químicos e alguns antibióticos, mas sensíveis aos agentes físicos, como a radiação ultravioleta e calor. As micobactérias são aeróbicas, não formam esporos e podem ser de crescimento rápido ou lento, sendo que esta última característica se restringe às patogênicas (Kim et al., 2013).

Mycobacterium bovis Bacilo Calmette-Guérin é uma vacina viva atenuada que foi desenvolvida por Léon Charles Albert Calmette e Jean-Marie Camille Guérin no Instituto Pasteur, França. A atenuação de uma cepa de *M. bovis* patogênica foi possível após 230 passagens sucessivas no laboratório, entre os anos de 1908 e 1921 (Nieuwenhuizen et al., 2018). Estudos posteriores demonstraram que, mesmo depois da sua completa atenuação, o BCG ainda apresentava infectividade quando inoculado em diversos modelos animais experimentais. O BCG é a única vacina utilizada contra tuberculose humana (TB) desde 1928, quando foi recomendado pela Liga das Nações como vacina oficial contra a TB (Calmette, 1931).

2.3.2 Utilização de rBCG para a expressão de antígenos heterólogos

Vacinas vivas vetorizadas por *M. bovis* BCG são altamente eficazes para

expressar antígenos heterólogos, pois apresentam a capacidade de replicação e persistência no organismo, estimulando constantemente o sistema imune do hospedeiro. Capazes de fornecer múltiplos antígenos, podem gerar vacinas polivalentes capazes de proteger contra vários patógenos, com uma única dose (Oliveira et al., 2017). O BCG possui potencial para ser utilizado como vetor vacinal, por apresentar as vantagens de ser segura, estável, não necessita de acondicionamento refrigerado e apresenta propriedades adjuvantes, já que sua parede celular é um dos potencializadores imunológicos mais conhecido e amplamente utilizado (adjuvante de Freund completo) (Tran et al., 2014). Sua replicação no interior de macrófagos, também facilita a estimulação do sistema imunológico, promovendo proteção de longa duração induzindo imunidade Th1 e Th2 (Ohara et al., 2001; Matsuo; Yasutomi, 2011).

Sistemas para a manipulação e expressão de genes heterólogos em micobactérias foram desenvolvidos, permitindo a avaliação do BCG recombinante (rBCG) como um veículo para uma variedade de antígenos (Seixas et al., 2007; Rizzi et al., 2012; Arnold et al., 2018; Oliveira et al., 2019a). Um dos sistemas mais promissores emprega um mutante de BCG Pasteur auxotrófico para leucina (BCG Pasteur $\Delta leuD$). O vetor replicativo (pUP410) suplementa esta mutação (Borsuk et al., 2007), proporcionando seleção ativa *in vivo*, eliminando a necessidade de utilização de um gene de resistência a antibiótico e, assim, aumentando a segurança e estabilidade vacinal (Borsuk et al., 2007; Seixas et al., 2010).

Os promotores micobacterianos afetam diretamente a expressão de proteínas recombinantes em BCG, pois a expressão de um gene alvo é inicialmente regulada na transcrição e parcialmente determinada pela força do promotor (Newton-Foot, Pittius, 2013). Uma característica útil de um promotor ativo de BCG recombinante seria expressar em níveis elevados durante o crescimento intracelular de rBCG nas células apresentadoras de antígenos, induzindo a expressão do antígeno quando uma resposta imune é necessária (Oliveira et al., 2017).

Existem diversos promotores de micobactérias, sendo um dos mais efetivos para expressão heteróloga, o promotor pAN de *M. paratuberculosis*, que é capaz de comandar a expressão de antígenos heterólogos em *M. bovis* BCG (Medeiros et al. 2002), apresenta sequências homólogas nos principais grupos patogênicos de micobactérias (Gormley et al. 1997). A β galactosidase expressa em BCG sob o controle do promotor da pAN, induz imunidade humoral e celular em camundongos

(Murray et al. 1992). Em dois estudos, uma comparação de vetores que continham diferentes promotores revelou que a estabilidade do BCG era superior quando o promotor pAN foi utilizado (Medeiros et al. 2002; Seixas et al. 2007). Em dois estudos, comparando diferentes promotores, observou-se maiores níveis de expressão de antígenos, gerando superior estabilidade da expressão, ao se utilizar a sequência promotora pAN (Medeiros et al. 2002; Seixas et al. 2007). Oliveira et al. (2019b) verificaram que as formulações vacinais vetorizadas por BCG, expressando antígenos sob o comando deste mesmo promotor, conferiram maiores taxas de proteção contra leptospirose em hamsters.

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipótese

Vacinas recombinantes vetorizadas por *M. bovis* BCG expressando individualmente as porções P₁ (*lipL32*), P₂ (*ligAni*), P₃ (*lemA:ligAni*) e P₄ (*lipL32:lemA*) de uma quimera previamente construída composta pelos genes *lipL32*, *lemA* e *ligAni* de *Leptospira interrogans*, são capazes de conferir proteção contra a leptospirose em hamsters e imunidade esterilizante.

3.2 Objetivo Geral

Desenvolver candidatos vacinais contra a leptospirose contendo antígenos recombinantes de *Leptospira interrogans*, clonados através da estratégia BioBricks®, utilizando *Mycobacterium bovis* BCG como vetor vacinal.

3.3 Objetivos Específicos

- Obter as porções P₁ (*lipL32*), P₂ (*ligAni*), P₃ (*lemA:ligAni*) e P₄ (*lipL32:lemA*) da quimera recombinante (Quimera 1), e cloná-las no plasmídeo pUP500/P_{pAN} utilizando o padrão BioBricks®;
- Obter quatro cepas de rBCG expressando individualmente as quatro porções da quimera 1;
- Imunizar hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*) com as cepas de rBCG construídas para avaliar qual porção da quimera 1 apresenta maior taxa de proteção contra a leptospirose;
- Avaliar a resposta imune gerada pela imunização contra desafio homólogo em hamsters, bem como analisar os danos causados pelas leptospirosas em fígado, rim e pulmão dos animais.

4 CAPÍTULO

4.1 Manuscrito - Protection against leptospirosis conferred by *Mycobacterium bovis* BCG expressing antigens from *Leptospira interrogans*

Este manuscrito foi formatado de acordo com as normas do periódico Vaccine.

Protection against leptospirosis conferred by *Mycobacterium bovis* BCG expressing antigens from *Leptospira interrogans*

Jessica Dorneles¹, Andriele Bonemann Madruga¹, Amilton Clair Pinto Seixas Neto¹, Caroline Rizzi¹, Everton Bulamarque Bettin¹, Amanda Silva Hecktheuer¹, Clarissa Caetano de Castro², Cristina Gevehr Fernandes², Thaís Larré Oliveira¹, Odir Antônio Dellagostin^{1*}.

Affiliations:

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

² Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Departamento de Patologia Animal, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

***Corresponding Author:**

Odir Antônio Dellagostin, Centro de Desenvolvimento Tecnológico – Núcleo de Biotecnologia; Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, Caixa Postal 354, CEP 96010–900, Pelotas, RS, Brazil. Tel. +55 53 3275 7616; Email: odirad@ufpel.edu.br

Abstract

Leptospirosis is a zoonotic disease worldwide and caused by the pathogenic spirochetes of the genus *Leptospira*. Bacterins make up the vaccines used against leptospirosis, but they only succeed in providing short-term and serovar-specific protection. The use of *Mycobacterium bovis* BCG as a live vaccine vector expressing leptospiral antigens is a promising alternative, particularly due to its adjuvant properties. Four distinct portions P₁ (*lipL32*), P₂ (*ligAni*), P₃ (*lemA:ligAni*) and P₄ (*lipL32:lemA*) of a recombinant chimera composed of the *lipL32*, *lemA* and *ligANI* genes from *Leptospira interrogans* were cloned according to the BioBricks® strategy in the plasmid pUP500/P_{pAN}. These constructions were transformed into a BCG Pasteur strain, and protein expression was detected by Western blot. For vaccination, 5 groups of 10 Golden Syrian hamsters were used, aged 4–6 weeks – group 1, rBCG (LipL32); group 2, rBCG (LigAni); group 3, rBCG (LemA:LigAni); group 4, (LipL32:LemA); group 5, BCG Pasteur wild-type (negative control). Two doses containing 10⁶ CFU of rBCG were administered subcutaneously, the challenge was performed with 5 x LD₅₀ of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni L1-130, and the animals were observed for a 30-day period until the endpoint was reached. Humoral immunity was assessed via indirect ELISA, while renal colonisation was assessed by culture and quantitative real-time PCR. All vaccinated groups were protected against a lethal challenge and sterilising immunity was observed for comparisons with the negative control group ($P < 0.05$). Recombinant vaccines were not effective at inducing significant humoral immunity, which suggests the induction of cellular immunity – a characteristic of *M. bovis* BCG. In conclusion, all formulations provide 100% significant protection against leptospirosis in hamsters with sterilising immunity. The use of rBCG as a vaccine vector represents a promising alternative for the control of animal leptospirosis, allowing for protection against clinical signs of leptospirosis and renal colonisation.

Keywords: vectored vaccine, BioBricks, chimera, LipL32, LigAni, LemA

1. Introduction

Leptospirosis is a multi-species zoonosis that occurs in tropical and subtropical countries, with approximately 1 million cases annually – although this figure is likely underestimated [1-2]. Caused by pathogenic spirochetes of the genus *Leptospira*, leptospirosis is transmitted through direct contact with water, soil, or food contaminated with the bacteria [3]. Whole-cell inactivated vaccines are used as prophylaxis, but they only provide sorovar-specific and short-term protection, so require annual boosting [4].

Recombinant vectored live vaccines are a potential alternative that might prove effective for increasing the spectrum of protection and providing a sustained immune system stimulation [5] through the presentation of antigens common to all pathogenic leptospires. *Mycobacterium bovis* BCG is a live attenuated vaccine that presents numerous advantages, such as stability, safety, low production cost, adjuvant capacity, and induction of cellular immunity, as well as successfully expressing heterologous antigens [6].

The LigAni, LemA and LipL32 proteins are relatively well-conserved among pathogenic leptospires, surface-exposed, and expressed at the time of infection [7-8-9]. Moreover, their partial efficacy in protecting against leptospirosis has already been demonstrated through the use of these antigens in subunit recombinant vaccines, although none of these antigens were able to prevent the kidney colonisation of infected animals [10-11-12]. Consequently, a recent study focused on evaluating the protective capacity of a chimera containing segments of these three fused antigens expressed by BCG as a vaccine vector. This vaccine provided 100% protection and sterilising immunity in hamsters [13]. However, it is well-known that antigen size can lead to metabolic overload for BCG, resulting in plasmid loss and vaccine instability [14].

The cloning of DNA sequences may be facilitated and standardised by using the BioBricks®

standard; a strategy that allows for the construction of different DNA molecules that become compatible with each other. Our group was able to clone different mycobacterial promoters in the expression vector pUP500 – a shuttle vector with the origin of replication in *Escherichia coli* and mycobacterium [15] – in order to allow for the expression of heterologous antigens by *M. bovis* BCG. In this study, we have evaluated the immune protective potential of the portions: P₁ (lipL32), P₂ (ligAni), P₃ (lemA: ligAni) and P₄ (lipL32: lemA) of recombinant chimera 1 [15], seeking to identify which portion is most immunoprotective against leptospirosis, in addition to conferring sterilising immunity when expressed by *M. bovis* BCG in hamsters.

2. Materials and methods

2.1. Ethical aspects

All procedures involving animal experimentation were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee (CEEa) of the Federal University of Pelotas under number 4646-2015.

2.2. Strains and growth conditions

Mycobacterium bovis BCG (Pasteur strain) was grown at 37° C in 7H9 broth (Difco, BD, São Paulo, SP, Brazil) supplemented with 0.5% glycerol, 0.05% Tween 80 and 10% OADC or in 7H10 agar (Difco, BD, São Paulo, SP, Brazil) supplemented with 10% OADC. When necessary, kanamycin was added at a concentration of 25 µg.mL⁻¹. *Escherichia coli* DH5α was used for plasmid maintenance and cloning, grown at 37° C in Luria-Bertani medium (Difco, BD, São Paulo, SP, Brazil) (1% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 0.5% NaCl) under the agitation of 200 rpm or plus 1.5% agar and, when necessary, supplemented with 50 µg.mL⁻¹ of kanamycin. *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130 was maintained at 30° C in Ellinghausen–McCullough–Johnson–Harris (EMJH) liquid supplemented with *Leptospira* EMJH enrichment (Difco, BD, São Paulo, SP, Brazil).

2.3. Molecular cloning by BioBricks® standard

Four portions, P₁ (*lipL32*), P₂ (*ligAni*), P₃ (*lemA:ligAni*) and P₄ (*lipL32:lemA*) of the chimeric gene Q1 (Figure 1), constructed with the *Leptospira interrogans* genes *lipL32*, *lemA* and *ligAni* [15] (Table 1), were amplified by PCR using pAE/Q1 as a template DNA and utilising the oligonucleotides described in Table 2. Digestion was performed with restriction enzymes *Xba*I and *Pst*I and cloned individually into the pUP500/P_{pAN} plasmid previously digested with restriction enzymes *Spe*I and *Pst*I. This plasmid contained origins of replication in *E. coli* and *M. bovis* BCG, a kanamycin-resistant gene, a multiple cloning site compatible with the BioBricks® Standard and the mycobacterial promoter pAN [15]. The four constructs were inserted into electrocompetent *E. coli* DH5 α and the recombinant clones were confirmed by digestion with restriction enzymes *Eco*RI *Pst*I and PCR.

2.4. BCG transformation and expression analysis

Recombinant plasmids pUP500/P_{pAN}:P₁, pUP500/P_{pAN}:P₂, pUP500/P_{pAN}:P₃, and pUP500/P_{pAN}:P₄ were transformed into electrocompetent *M. bovis* BCG Pasteur by electroporation. Recombinant BCG strains were plated with kanamycin 7H10 medium and selected colonies were inoculated on selective 7H9 medium. After a 7-day growth period, protein expression was confirmed by Western blot. The cells were centrifuged at 4,000 $\times$ g for 10 min, suspended in 1 ml of 100 mM Tris, pH 8.0, lysed by sonication (Cole – Parmer, Illinois, USA), with 10 pulses of 40 MHz for 15 s with 0.1 mm glass beads and centrifuged 10,000 rpm for 10 min. The pellet was suspended in 1 ml of Tris HCl buffer 100 mM pH 8.0. Protein was separated on 12% SDS-PAGE and electrotransferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Illinois, United States). Primary antibodies anti-lipL32 (at 1:50 dilution), anti-ligAni (at 1:50 dilution); and secondary rabbit anti-IgG (at 1:5,000 dilution) or hamster anti-IgG (at 1:5,000 dilution) were used. Reactions were revealed by chemiluminescence using the Western Blotting Amersham ECL Prime (GE Healthcare, Illinois, USA) detection reagent.

2.5. Vaccination and challenge in hamsters

Male hamsters aged 4–6 weeks were segregated into 5 groups consisting of 10 animals each – group 1, rBCG (LipL32); group 2, rBCG (LigAni); group 3, rBCG (LemA:LigAni); group 4, (LipL32:LemA); group 5, BCG Pasteur wild-type (negative control). Animals were subcutaneously immunised on days 0 and 21 with vaccines containing 10^6 CFU of rBCG or BCG Pasteur wild-type. The positive control group containing 4 animals received the bacterin vaccine (10^9 cells of *L. interrogans* serovar Copenhageni strain L1-130) intramuscularly. Fifty-one days after the first dose, the animals were challenged with 5 times the 50% lethal dose (LD_{50}) of *L. interrogans* serovar Copenhageni strain L1-130 (Figure 2). The animals were monitored daily for clinical signs of leptospirosis and, when reaching endpoint criteria, were euthanised with CO₂ gas according to the rules and regulations of the Animal Experimentation Ethics Committee. The criteria adopted for the determination of euthanasia were 10% loss of maximum weight, prostration, bristling, apathy and lack of appetite. Peripheral blood samples were collected through the retroocular venous plexus on days 0, 21 and 51, using 0.5% proximetacaine hydrochloride as an anesthetic eye drop. The surviving animals were euthanised 30 days after the challenge. This experiment was performed in two independent repetitions.

2.6. Humoral immune response determination

The humoral immune response was evaluated by indirect ELISA using the purified proteins rLipL32, rLemA and rLigAni individually as antigens. The plates were coated with 250 ng per well of each protein diluted in carbonate bicarbonate buffer (pH 9.6) for 16–18 h at 4 °C. The plates were blocked with 5% skimmed milk powder diluted in PBST for 1 h at 37 °C. The sera from the animals were diluted 1:50 in PBS-T with 2.5% milk powder and incubated for 1 h at 37°C followed by incubation with the secondary antibody anti-IgG peroxidase-conjugated hamster (Sigma; 1:5,000 diluted in PBST with 2.5% milk powder), which was added and incubated for 1 h at 37 °C. Three washes with 200 µL of PBST were performed between each

step. Reactions were developed with o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD – Sigma-Aldrich) and hydrogen peroxide, and stopped with the addition of 25 µL of H₂SO₄ 4 N. Absorbance was determined on a plate reader at a wavelength of 492 nm.

2.7. Histopathology

Renal, pulmonary and hepatic tissues were aseptically collected for histopathological analysis, fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Sections of 3 µm were performed and stained with hematoxylin-eosin and observed using an optical microscope [16]. Liver congestion, lung edema, circulatory alterations and kidney tubular degeneration were analysed.

2.8. Load leptospiral detection in the kidneys

The analysis of leptospire in renal samples from surviving animals was evaluated by culture and quantitative real-time PCR (qPCR). The leptospiral genomic DNA in kidney samples was quantified by qPCR using a LightCycler 96 system (Roche, Basel, Switzerland). Samples were prepared by dicing 100–200 mg of renal tissue and suspending it in PBS, followed by homogenising the tissue for two cycles of 20 s using a Ribolyser (Hybaid, Kalletal, Germany). Genomic DNA was extracted from approximately 40 mg of tissue using the SV Genomic DNA Purification Kit (Promega, Brazil). The reactions were performed in triplicate, with each containing 200 ng of total DNA, 0.4 µM of each primer (Table 1), 5 µl SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, São Paulo, SP, Brazil) and nuclease-free water (Invitrogen) was also added to a final volume of 10 µl. The qPCR protocol consisted of an initial incubation step of 95 °C for 10 min, followed by 45 cycles of amplification (95 °C for 15 s, 58 °C for 15 s and 72 °C for 15 s).

The number of leptospire was determined in comparison with the number of hamster cells in the sample, then quantified by copies of the *lipL32* gene, respectively. To determine culture, one kidney from each surviving animal was collected and inoculated in a supplemented EMJH

medium. During an eight-week incubation period, dark-field microscopy was performed to identify positive cultures.

2.9. Statistical analysis

The levels of protection against mortality and survival rates were determined using Fisher's exact test and log-rank test, respectively. Significant differences between the serological assays were determined by analysis of variance (ANOVA). $P \leq 0.05$ was considered to be statistically significant. To compare the differences in histopathological analyses, a one-way ANOVA test was performed, with $P \leq 0.05$ considered significant. Statistical analysis was carried out using the GraphPad Prism 7 and Statistix 8 software packages.

3. Results

3.1. Recombinant BCG strains expressing *Leptospira interrogans* antigens

The cloning of the genes in the pUP500/P_{pAN} vector generated the construction of 4 recombinant plasmids: pUP500/P_{pAN}:P₁, pUP500/P_{pAN}:P₂, pUP500/P_{pAN}:P₃, and pUP500/P_{pAN}:P₄. Protein expression by rBCG was detected by Western blot (Figure 3). An anti-rLipL32 polyclonal antibody was able to detect P₁ (28 kDa) and P₄ (44 kDa), while anti-rLigAni was able to detect P₂ (30 kDa) and P₃ (45 kDa), and wild BCG extract was used as a negative control and not detected in any reaction.

3.2. Humoral immune response induced by rBCG vaccines

The humoral immune response was evaluated by indirect ELISA. Sera from day 0 (pre-immune) and day 51 (post-immune) were used. Antibody levels induced by rBCG vaccines expressing the four portions individually were not significant when compared to sera from day 0 (pre-immune) ($P < 0.05$).

3.3. Protection conferred by rBCG vaccines

After the challenge, the animals were monitored for 30 days. The rBCG strains expressing the portions P₁ (LipL32), P₂ (LigAni), P₃ (LemA:LigAni) and P₄ (LipL32:LemA) afforded 100%

protection ($P < 0.05$) against leptospirosis in the context of a homologous challenge in hamsters. The results of mortality and survival are shown in Figure 4 and Table 3. All animals vaccinated with bacterin (positive control) survived after the challenge. The endpoint criteria were observed in all negative control animals that received the BCG Pasteur wild strain, including the loss of 10% of total weight (Figure 5).

3.4. Histopathological Analysis

Histopathological analyses were performed on the kidney, liver and lung. The damage observed in the renal tissue did not show any significant difference among vaccinated groups. In the lungs, a difference ($P = 0.0038$) in the damage score was observed only between the group vaccinated with P₄ (lipL32:lemA) and the negative control group (BCG Pasteur). In the renal tissue, however, a significant difference was clear between the vaccinated groups when compared to the negative control group ($P < 0.0001$) (Figure 6).

3.5. Sterilising Immunity

The sterilising immunity conferred by vaccines, determined by the lack of *leptospiras* in kidney samples, was evaluated by utilising culture and qPCR. In the first experiment, the presence of leptospires was not detected in the kidney cultures of hamsters vaccinated separately with the four portions. In the second experiment, the same result was observed with the exception of the group vaccinated with portion 1 (LipL32), where the presence of leptospires was detected in the kidney culture of one animal that reached the endpoint criteria. The qPCR confirmed the observed culture results (Table 2).

4. Discussion

Mycobacterium bovis BCG is a live attenuated vaccine that has been shown to be effective for expressing different microorganisms' heterologous antigens, including *Leptospira* spp. [13-17]. Its characteristics are very advantageous due to its ability to replicate in antigen-presenting

cells. This facilitates the stimulation of the host's immune system, therefore, conferring long-term protection and inducing Th1 and Th2 immunity. Plus, the mycobacterial cell wall is known to be one of the most potent immunological adjuvants (complete Freund's adjuvant [CFA]). All of these qualities make BCG extremely attractive for the development of a vaccine vector [18].

By immunising Syrian hamsters with vaccine formulations containing rBCG strains and, after 51 days, challenging them with 5 x LD₅₀ of *L. interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130, this research was able to achieve 100% protection and significant sterilising immunity. Any clinical signs of leptospirosis were only observed in animals inoculated with wild BCG Pasteur strain (negative control) in both performed experiments.

The leptospires serovars differ due to the antigen O, which makes up the lipopolysaccharides of the external membrane. This means that structures are differentiated [19], which makes bacterial vaccines impossible to confer the broad spectrum of protection. Faced with this significant disadvantage, several studies seek a vaccine target that is common to all pathogenic leptospires, with the most promising examples being those proteins that are exposed to the extracellular environment and anchored to the external membrane, or those expressed at the time of infection. The immunoprotective potential of the LipL32, LemA and LigAni proteins, as a recombinant vaccine, has already been highlighted by several studies, however, the use of these isolated antigens did not confer significant sterilising immunity [10-11-12]. Nevertheless, a recent study excluded this problem, within which a recombinant chimera composed of these three proteins, and vectorised by *Mycobacterium bovis* BCG, conferred 100% protection with sterilising immunity [13].

The use of larger-sized antigens can generate a metabolic overload for BCG [14], which may impair vaccine stability. Faced with this possibility, this study sought to fractionate the recombinant chimera [13] into four distinct portions: P₁ (*lipL32*), P₂ (*ligAni*), P₃ (*lemA:ligAni*) and P₄ (*lipL32:lemA*), as well as cloning them individually into the expression vector pUP500

– constructed by our research group according to the BioBricks® Standard. This vector has an origin of replication in *E. coli* and mycobacteria, together with sites for the restriction enzymes used in BioBricks® [15]. For the effectiveness of the expression, using a mycobacterial promoter sequence is necessary, with pAN being the promoter associated with higher rates of vaccine stability and better levels of antigen expression [20]. By utilising western blot technique, it was possible to detect the expression of the four portions by the recombinant BCG strains.

The immune response required for protection against leptospirosis is not yet well understood, although it is known that the humoral response is of paramount importance because research has shown that anti-LPS antibodies, induced by commercial bacterial vaccines, protect animals from disease [21] but, in some hosts, cellular immunity is equally important [13-21]. *M. bovis* BCG is an efficient vaccine vector, being intracellular, able to replicate inside macrophages, inducing a cellular immune response and, because it is a live vaccine, this stimulation is constant [22]. Humoral immunity was evaluated by ELISA, and no significant levels of antibodies were obtained, suggesting that cellular immunity is fundamental to conferring protection against leptospirosis in hamsters. Such a result is expected in BCG vectored vaccines, as this is an intracellular microorganism that has the ability to replicate within antigen-presenting cells [23].

Pathogenic leptospiras generate a systemic infection when they cross the skin or mucous membranes – the process of which is facilitated by their spiral and fine form [24] – then enter the bloodstream and quickly arrive in highly vascularised tissues, such as the lung, liver and kidney, with the latter being the organ of the greatest significance for the dissemination of the environment's bacteria [25]. The histopathological analyses of this study show that the tested vaccines were not able to prevent tissue damage in the lungs and kidneys of vaccinated animals. This is a fact that can possibly be explained by the induction of an inflammatory response to

combat this pathogen [26], considering that the analyses performed by culture and qPCR did not detect leptospiral load in the animals' kidneys, conferring a sterilising immunity.

Although the use of *M. bovis* BCG is promising, there are some disadvantages in its application for humans and cattle. In most countries, the Bacillus Calmette Guérin (BCG) vaccine is administered to newborn babies so that human tuberculosis can be prevented by stimulating the immune system. It is known that doing so produces a robust Th1 response, in turn, resulting in a cell-mediated immune response [27]. The moment a person receives another vaccine containing BCG, the immune system is already sensitised, which may cause vaccine instability [28]. The cattle are not vaccinated against tuberculosis because the vaccine influences the result of the tuberculin skin test (Mantoux) based on the DPP, where it is not possible to distinguish between tuberculosis infection and vaccination with *M. bovis* BCG or exposure to environmental mycobacteria [28]. It is, therefore, necessary to develop a new alternative test to tuberculin, since tuberculosis and leptospirosis are diseases that cause great economic losses for agriculture [29], so a single vaccine that protects against both diseases would be very advantageous.

In this work, all four portions of chimera 1, expressed by BCG, were able to provide 100% protection against leptospirosis in hamsters with sterilising immunity. The BCG proved to be a highly efficient vaccine vector for expression of BioBricks® constructions – pUP500/P_{pAN}:P₁, pUP500/P_{pAN}:P₂, pUP500/P_{pAN}:P₃, pUP500/P_{pAN}:P₄ – and was possibly able to stimulate the cellular immune system in the fight against leptospirosis.

5. Conclusion

The experiments performed in this study demonstrate the potential of recombinant BCG vaccines by providing significant protection against leptospirosis in hamsters, together with sterilising immunity. Although humoral immunity was not significant, it is believed that a

cellular immune response has been generated and found effective in fighting the disease. Other experiments should be performed to evaluate cellular immunity as well as the stability of these vaccines in vitro and in vivo.

Acknowledgements

We thank the researchers and the techniques of the Vaccinology Laboratory for all the help provided, as well as the team from the Animal House of the Federal University of Pelotas for the management and care of the animals. We are also grateful to the funding agencies CAPES, CNPq and FAPERGS for the project grants and scholarships.

References

- [1] Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, et al. Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 2015;1–19.
- [2] WHO. Leptospirosis an emerging public health problem. *Wkly Epidemiol Rec* 2011; 86:45–50.
- [3] Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7:736-47.
- [4] Adler B, de la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol* 2010; 140:287–96.
- [5] Francis MJ. Recent Advances in Vaccine Technologies. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 2018; 48:231–241.
- [6] Nasser Eddine A, Kaufmann SH. Improved protection by recombinant BCG. *Microbes Infect* 2005; 7:939-46.
- [7] Matsunaga J, Barocchi MA, Croda J, Young TA, Sanchez Y, Siqueira I, Bolin CA, Reis MA, Riley LW, Haake DA, Ko AI. Pathogenic *Leptospira* Species Express Surface-Exposed

Proteins Belonging to the Bacterial Immunoglobulin Superfamily. *Mol Microbiol* 2003; 49:929-45.

[8] Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun* 2000; 68(4):2276-85.

[9] Hartwig DD, Seixas FK, Cerqueira GM, McBride AJ, Dellagostin OA. Characterization of the immunogenic and antigenic potential of putative lipoproteins from *Leptospira interrogans*. *Curr Microbiol*. 2011; 62(4):1337-41.

[10] Silva EF, Medeiros MA, McBride AJA, Matsunaga J, Esteves GS, Ramos JGR, Santos CS, Croda J, Homma A, Dellagostin OA, Haake DA, Reis MG, and Koa AI. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. *Vaccine* 2007; 25(33): 6277–6286.

[11] Dellagostin OA , Grassmann AA , Hartwig DD , Félix SR , da Silva EF , McBride AJA. Recombinant vaccines against Leptospirosis. *Hum Vaccin* 2011; 7(11):1215-24.

[12] Hartwig DD, Forster KM, Oliveira TL, Amaral M, McBride AJA, Dellagostin OA. A Prime-Boost Strategy Using the Novel Vaccine Candidate, LemA, Protects Hamsters Against Leptospirosis. *Clin Vaccine Immunol* 2013; 20 (5):747-52.

[13] Oliveira TL, Rizzi C, Da Cunha CEP, Dorneles J, Seixas Neto ACP, Amaral MG, Hartwig DD, Dellagostin O.A. Recombinant BCG strains expressing chimeric proteins derived from *Leptospira* protect hamsters against leptospirosis. *Vaccine* 2019; 37: 776-782.

[14] Lofthouse EK, Wheeler PR, Beste DJV, Khatri BL, Wu H, Mendum TA, Kierzek AM, McFadden J. Systems-based Approaches to Probing Metabolic Variation Within the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *PLoS One* 2013; 8 (9): e75913.

- [15] Oliveira TL, Stedman A, Rizzi C, Dorneles J, da Cunha CEP, Varela Junior AS, Dellagostin OA, McFadden J. A Standardized BioBrick Toolbox for the Assembly of Sequences in Mycobacteria. *Tuberculosis (Edinb)* 2019; 119:101851.
- [16] Caoa Y, Faisala SM, Yana W, Changa Y-C, McDonoughc SP, Zhangb N, Akeya BL, Changa Y-F. 2011. Evaluation of novel fusion proteins derived from extracellular matrix binding domains of LigB as vaccine candidates against leptospirosis in a hamster model. *Vaccine*. 29, 7379– 7386.
- [17] Bastos RG, Borsuk S, Seixas FK, Dellagostin OA. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG. *Vaccine* 2009; 27 (47): 6495-503.
- [18] Ohara N, Yamada T. Recombinant BCG vaccines. *Vaccine*, 2001; 19:4089-4098.
- [19] Nally JE, Chow E, Fishbein MC, Blanco DR, and Lovett M. Changes in Lipopolysaccharide O Antigen Distinguish Acute versus Chronic *Leptospira interrogans* Infections. *Infect Immun*. 2005 Jun; 73(6): 3251–3260.
- [20] Oliveira TL, Rizzi C; Dellagostin OA. Recombinant BCG vaccines: molecular features and their influence in the expression of foreign genes. *Appl Microbiol Biotechnol* 2017; 101 (18): 6865- 6877.
- [21] Zuerner RL. Host Response to *Leptospira* Infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 2015; 387: 223-50.
- [22] Singh VK, Srivastava R, Srivastava BS. Manipulation of BCG vaccine: a double-edged sword. *Eur J Clin Microbiol infect dis* 2016; 35(4):535–543.
- [23] Tanner R, Ramos BV, Vordermeier HM, McShane H. The Humoral Immune Response to BCG Vaccination. *Front Immunol* 2019; 10:1317.
- [24] Adler B. History of Leptospirosis and *Leptospira*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015; 387:1-9.

- [25] Wunder EA, Jr, Figueira CP, Santos GR, Lourdault K, Matthias MA, Vinetz JM, Ramos E, Haake DA, Picardeau M, Dos Reis MG, et al. Real-time PCR reveals rapid dissemination of *Leptospira interrogans* after intraperitoneal and conjunctival inoculation of hamsters. *Infect and Immun*. 2016; 84(7):2105–2115.
- [26] Vieira ML, Naudin C, Mörgelin M, Romero EC, Nascimento ATO, Herwald H. Modulation of Hemostatic and Inflammatory Responses by *Leptospira* Spp. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(5): e0004713.
- [27] Dockrell HM, Smith SG. What Have We Learnt about BCG Vaccination in the Last 20 Years? *Front Immunol*. 2017; 8:1134.
- [28] Srinivasan S, Jones G, Veerasami M, Steinbach S, Holder T, Zewude A, Fromsa A, Ameni G, Easterling L, Bakker D, Juleff N, Gifford G, Hewinson RG, Vordermeier HM, Kapur V. A defined antigen skin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Science Advances*, 2019 5(7), eaax4899.
- [29] Borsuk S, Kommling Seixas F; Ramos DF; Mendum T; McFadden J; Dellagostin O. 2012 Rational design of diagnostic and vaccination strategies for tuberculosis. *Braz J Infect Dis* vol.16 no.1

Table 1. Fragments amplified from the recombinant chimeric antigen composed by genes from *L.interrogans*

Fragments	Size (pb)
Portion 1 (<i>lipL32</i>)	795 pb
Portion 2 (<i>ligAni</i>)	882 pb
Portion 3 (<i>lemA: ligAni</i>)	1290 pb
Portion 4 (<i>lipL32: lemA</i>)	1224 pb

Table 2. Nucleotide sequences of primers used in this work.

Primer	Sequence (5'-3')
<i>lipL32 forward</i>	CCGGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGGTGGTCTGCCAAGCCTAA
<i>lipL32 reverse</i>	TGCACTGCAGCGGCCGCTACTAGTTTATCTAGGAGAGCCGCCACCCTT
<i>ligAni forward</i>	CCGGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAATGCCTAGCAGAATA
<i>ligAni reverse</i>	TGCACTGCAGCGGCCGCTACTAGTTTATGGCTCCGTTT
<i>lemA:ligAni forward</i>	CCGGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAATGAGCATTCAAGAAGAAGAT
<i>lemA:ligAni reverse</i>	TGCACTGCAGCGGCCGCTACTAGTTTATGGCTCCGTTT
<i>lipL32 forward*</i>	CTGAGCGAGGACACAATC
<i>lipL32 reverse*</i>	ATTACGGCAGGAATCCAA

*Primers used in qPCR

Table 3. Protection conferred by different rBCG-vectorized vaccines against lethal challenge in the hamster model of leptospirosis.

Immunogen	% Protection (survivors/total)	<i>P</i> value	Renal culture (positive/survivors)	qPCR (positive/survivors)
rBCG (LipL32) - P ₁	100 (10/10); 90 (9/10)**	< 0.0001*	0/10; 1/10**	0/10; 1/10**
rBCG (LigAni) - P ₂	100 (10/10)*	< 0.0001*	0/10*	1/10; 0/10**
rBCG (LemA:LigAni) - P ₃	100 (10/10)*	< 0.0001*	0/10*	0/10*
rBCG (LipL32:LemA) - P ₄	100 (10/10)*	< 0.0001*	0/10*	0/10*
Bacterin (positive control)	100 (4/4)*	0.0010*	0/4*	0/4*
BCG Pasteur (negative control)	0 (0/10)*	-	10/10*	10/10*

Expression vector pUP500/P_{pAN}

* Result obtained in both experiments

** Result obtained in the second experiment

Figures



Figure 1: **Schematic drawing of recombinant chimera 1.** Recombinant chimera composed of the genes *lipL32*, *lemA* and *ligAni* of *Leptospira interrogans*, with 75.1 kDa. Source: Oliveira et al., 2019a.

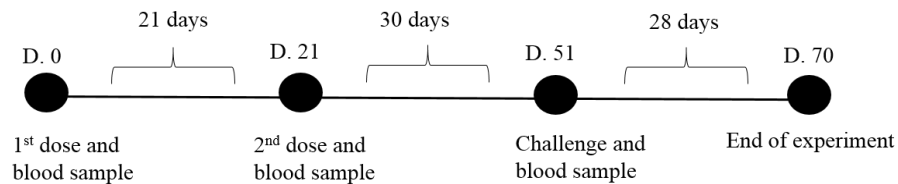


Figure 2. **Immunisation timeline.** The hamsters were immunised on day 0 and day 21 and challenged on day 51. The collection of blood through the ocular plexus was also performed during these three days.

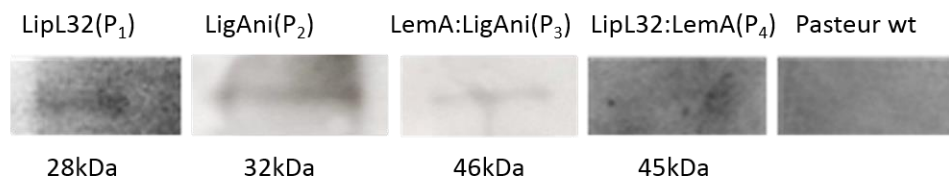


Figure 3. **Evaluation of recombinant antigen expression in *M. bovis* BCG by Western blot.** **LipL32 (P₁)**, anti-lipL32 and anti-hamster IgG; **LigAni (P₂)**, anti-ligAni and anti-rabbit IgG; **LemA:LigAni (P₃)**, anti-ligAni and anti-rabbit IgG; **LipL32:LemA (P₄)**, anti-ligAni and anti-hamster IgG; **Pasteur wild-type**, untransformed BCG (negative control).

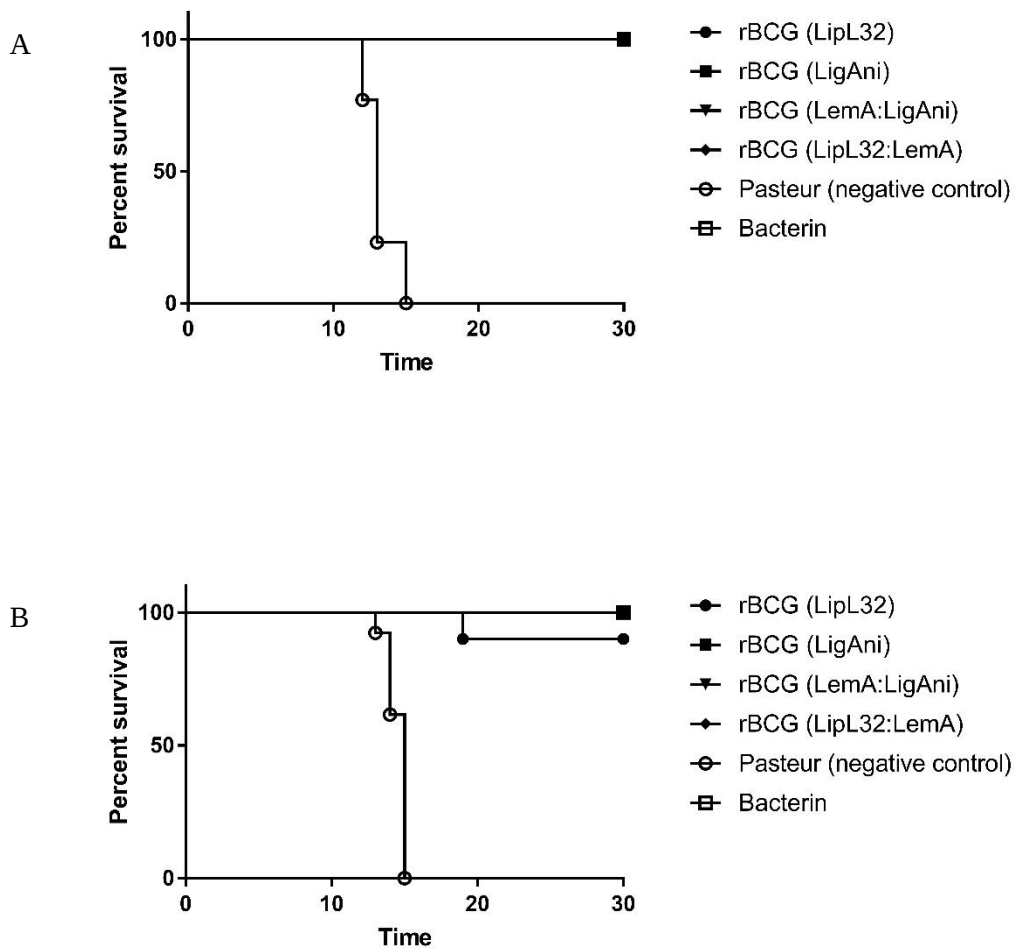
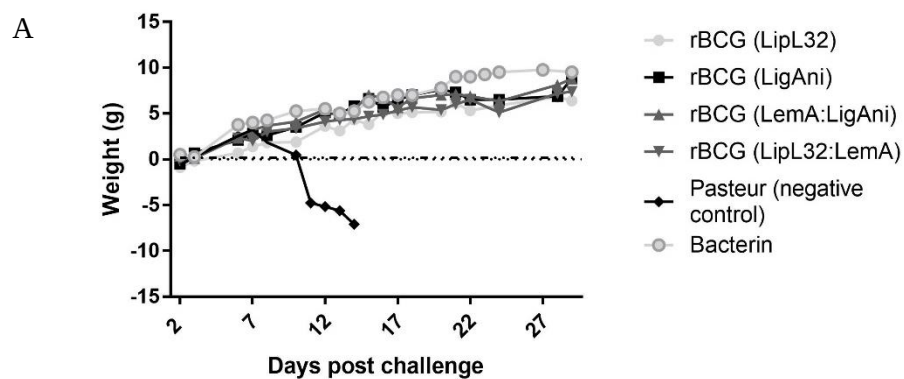


Figure 4. Survival of rBCG-immunised hamsters after lethal challenge. Survival of hamsters vaccinated with rBCG strains, bacterin, or BCG Pasteur after administration of a lethal inoculum of *L. interrogans* serovar Copenhageni, Fiocruz L1-130 strain in two independent experiments (A and B).



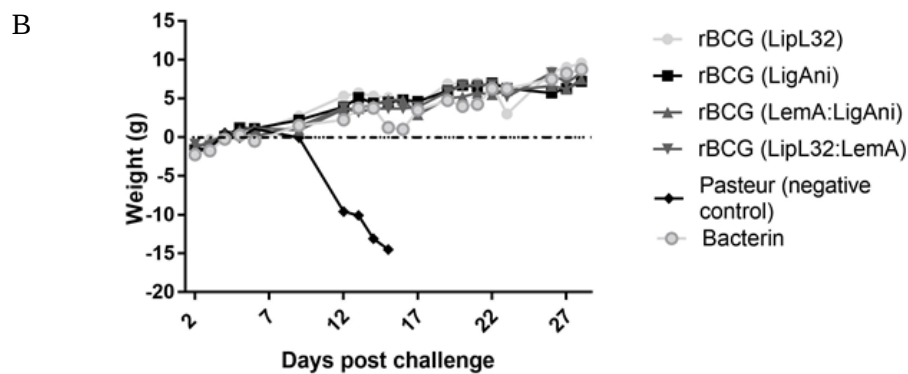
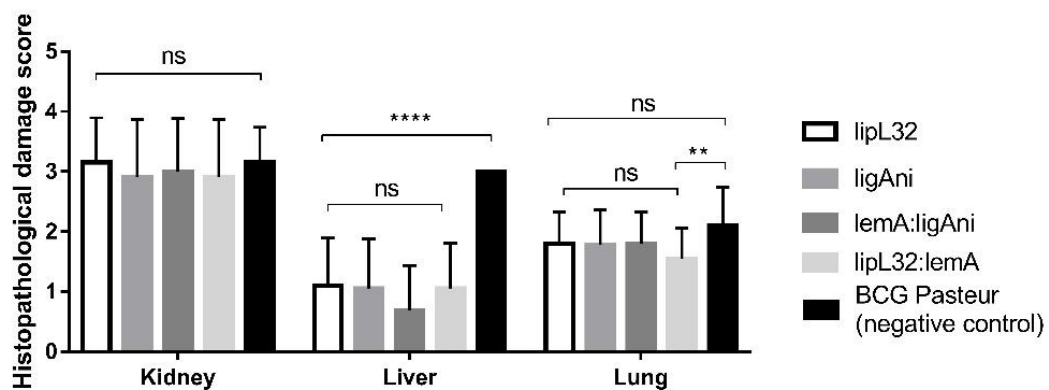


Figure 5. **Weight loss in hamsters immunised with rBCG strains after lethal challenge.** Weight variation among hamsters vaccinated with rBCG strains, bacterin, or BCG Pasteur after administration of a lethal inoculum of *L. interrogans* serovar Copenhageni, Fiocruz L1-130 strain in two independent experiments (A and B).



*** $P < 0.0001$

** $P = 0.038$

ns = no significant

Figure 6. **Histopathological analyses of hamsters' kidney, liver and lung tissues.** Comparison between vaccinated groups and between each vaccinated group and negative control (BCG Pasteur) of the damage caused in kidney, liver and lung. The damages were scored from 1 to 5 – the lightest to the most severe. Kidney: there was no significant difference between all groups. Liver: there was a significant difference ($P < 0.0001$) only between each vaccinated group and the negative control. There was no difference between the vaccinated groups. Lung damage showed a difference with the value of $P = 0.038$ only between the group vaccinated with portion 4 (lipL32: lemA) and the negative control.

5 CONCLUSÃO GERAL

- As quatro formulações vacinais baseadas nos rBCGs (pUP500/P_{pAN}:LipL32, pUP500/P_{pAN}:LigAni, pUP500/P_{pAN}:LemA:LigAni, pUP500/P_{pAN}:LipL32:LemA), conferem 100% de proteção significativa e imunidade esterilizante contra a leptospirose animal frente ao desafio homólogo em hamsters.
- Os danos histopatológicos encontrados nos tecidos pulmonar e renal dos grupos vacinados, indicam a indução da resposta inflamatória gerada pelo sistema imune no combate à infecção por *Leptospira*.

6 REFERÊNCIAS

- ADLER, B. & DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. 2010. Leptospira and leptospirosis. *Vet Microbiol*, 140, 287-96.
- ADLER, B. 2015a. History of leptospirosis and leptospira. *Curr Top Microbiol Immunol*, 387, 1-9.
- ADLER B. 2015b. Vaccines Against Leptospirosis. *Curr Top Microbiol Immunol*, 387, 251-72.
- ARNOLD, F. M., HOHL, M., REMM S., BRANDL H. K., ADENAU, S., CHUSRI, S., SANDER, P., HILBI, H. & SEEGER, M. A. 2018. A Uniform Cloning Platform for Mycobacterial Genetics and Protein Production. *Sci Rep*, 8 (1), 9539.
- BASTOS, R. G., BORSUK, S., SEIXAS, F. K. & DELLAGOSTIN, O. A. 2009. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG. *Vaccine*, 27, 6495-6503.
- BORSUK S.; MENDUM T.A.; FAGUNDES M.Q.; MICHELON M.; CUNHA C.W.; MCFADDEN J., DELLAGOSTIN O.A. 2007. Auxotrophic complementation as a selectable marker for stable expression of foreign antigens in *Mycobacterium bovis* BCG. *Tuberculosis*, 87,74-480.
- CAGLIERO, J., VILLANUEVA, S. Y. A. M. & MATSUI M. 2018. Leptospirosis Pathophysiology: Into the Storm of Cytokines. *Front Cell Infect Microbiol*, 8, 204.
- CALMETTE, A. 1931. Preventive Vaccination Against Tuberculosis With BCG. *Proc R Soc Med*, 24 (11), 1481-90.
- CAMERON, C. E. 2015. Leptospiral structure, physiology, and metabolism. *Curr Top Microbiol Immunol*, 387, 21-41.
- CAO, X. J., DAI, J., XU, H., NIE, S., CHANG, X., HU, B. Y., SHENG, Q. H., WANG, L. S., NING, Z. B., LI, Y. X., GUO, X. K., ZHAO, G. P. & 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.
- CHASSIN, C., PICARDEAU, M., GOUJON, J. M., BOURHY, P., QUELLARD, N., DARCHE, S., BADELL, E., D'ANDON, M. F., WINTER, N., LACROIXLAMANDÉ, 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*.
- CHOY, H. A., KELLEY, M. M., CHEN, T. L., MOLLER, A. K., MATSUNAGA, J. & HAAKE, D. A. 2007. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infect Immun*, 75, 2441-50.
- CLAASSEN, E., LEEUW, W. de, GREEVE, P. de, HENDRIKSEN, C., & BOERSMA, W. 1992. Freund's complete adjuvant: an effective but disagreeable formula. *Research in Immunology*, 143(5), 478-483.
- COSTA, F., HAGAN, J. E., CALCAGNO, J., KANE, M., TORGERSON, P., MARTINEZSILVEIRA, M. S., STEIN, C., ABELA-RIDDER, B. & KO, A. I. 2015. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis*, 9.

- 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, 1215-24.
- DELLAGOSTIN, O. A., GRASSMANAN, A. A., RIZZI, C., SCHUCH, R. A., JORGE, S. & OLIVEIRA, T. L. 2017. Reverse vaccinology: an approach for identifying leptospiral vaccine candidates. *Int J Mol Sci*, 18.
- ELLIS, W. A. Animal Leptospirosis. 2015. *Curr Top Microbiol Immunol*, 387, 99-137.
- FOUTS, D. E., MATTHIAS, M. A., ADHIKARLA, H., ADLER, B., AMORIM-SANTOS, L., BERG, D. E., BULACH, D., BUSCHIAZZO, A., CHANG, Y. F., GALLOWAY, R. L., HAAKE, D. A., HAFT, D. H., HARTSKEERL, R., KO, A. I., LEVETT, P. N., MATSUNAGA, J., MECHALY, A. E., MONK, J. M., NASCIMENTO, A. L., NELSON, K. E., PALSSON, B., PEACOCK, S. J., PICARDEAU, M., RICARDI, J. N., THAIPANDUNGPANIT, J., WUNDER, E. A., JR., YANG, X. F., ZHANG, J. J. & VINETZ, J. M. 2016. What Makes a Bacterial Species Pathogenic?: Comparative Genomic Analysis of the Genus *Leptospira*. *PLoS Negl Trop Dis*, 10.
- GORMLEY, E., SANDALL, L., HONG, C., LAWTON, D. & MURRAY, A. 1997. Identification and differentiation of mycobacteria using the PAN promoter sequence from *Mycobacterium paratuberculosis* as a DNA probe. *FEMS Microbiol Lett* 147(1):63–68.
- GUGLIELMINI, J., BOURTHY, P., SCHIETTEKATTE, O., ZININI, F., BRISSE, S. & PICARDEAU, M. 2019. Genus-wide *Leptospira* Core Genome Multilocus Sequence Typing for Strain Taxonomy and Global Surveillance. *PLoS Negl Trop Dis*, 13 (4), e0007374.
- HAAKE, D. A., CHAO, G., ZUERNER, R. L., BARNETT, J. K., BARNETT, D., MAZEL, M., MATSUNAGA, J., LEVETT, P. N. & BOLIN, C. A. 2000. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun*, 68, 2276-85.
- HAAKE, D. A. & LEVETT, P. N. 2015. Leptospirosis in humans. *Curr Top Microbiol Immunol*, 387, 65-97.
- HARTWIG, D. D., SEIXAS, F. K., CERQUEIRA, G. M., MCBRIDE, A. J. & DELLAGOSTIN O. A. 2011. Characterization of the immunogenic and antigenic potential of putative lipoproteins from *Leptospira interrogans*. *Curr Microbiol*, 62(4), 1337-41.
- 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, 747-52.
- HAUK, P., MACEDO, F., ROMERO, E. C., VASCONCELLOS, S. A., de MORAIS, Z. M., BARBOSA, A. S. & Ho, P. L. 2008. In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. *Infect. Immun*. 76, 2642–2650.

- HERMAN, H. S., MEHTA, S., CARDENAS, W. B., STEWART-IBARRA, A. M. & FINKELSTEIN, J. L. 2016. Micronutrients and Leptospirosis: A Review of the Current Evidence. *PLoS Negl Trop Dis*, 10, e0004652.
- HOKE, D. E., EGAN, S., CULLEN, P. A. & ADLER, B. 2008. LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata*. *Infect Immun*, 76, 2063-9.
- HSU, S. H., LO, Y. Y., TUNG, J. Y., KO, Y. C., SUN, Y. J., HUNG, C. C., YANG, C. W., TSENG, F. G., FU, C. C. & PAN, R. L. 2010. Leptospiral Outer Membrane Lipoprotein LipL32 Binding on Toll-Like Receptor 2 of Renal Cells as Determined With an Atomic Force Microscope. *Biochemistry*, 49 (26), 5408-17.
- KIM, C.-J., KIM, N.-H., SONG, K.-H., CHOE, P. G., KIM, E. S., PARK, S. W., KIM H.-B., KIM, N.-J., KIM, E.-C., PARK, W. B., OH, M.-D. 2013. Differentiating rapid- and slow-growing mycobacteria by difference in time to growth detection in liquid media. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 75(1), 73–76.
- KYRIAKIDIS, I., SAMARA, P. & PAPA, A. 2011. Serum TNF-alpha, sTNFR1, IL-6, IL8 and IL-10 levels in Weil's syndrome. *Cytokine*, 54 (2), 117-20.
- LEWES T. 2013. De Bricolage a BioBricks™: Biologia Sintética e Design Racional. *Stud Hist Philos Biol Biomed Sci*, 44 (4 Pt B), 641-8.
- MATSUNAGADA, 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. & KO, A. I. 2003. Pathogenic *Leptospira* Species Express Surface-Exposed Proteins Belonging to the Bacterial Immunoglobulin Superfamily. *Mol Microbiol*, 49 (4), 929-45.
- MATSUO, K. & YASUTOMI, Y. 2011. *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin as a Vaccine Vector for Global Infectious Disease Control. *Tuberc Res Treat*, 2011, 574591.
- MEDEIROS, M. A., DELLAGOSTIN, O. A., ARMOA, G. R., DEGRAVE, W. M., DE MENDONCA-LIMA, L., LOPES, M. Q., COSTA, J. F., MCFADDEN, J. & MCINTOSH, D. 2002. Comparative evaluation of *Mycobacterium vaccae* as a surrogate cloning host for use in the study of mycobacterial genetics. *Microbiol*, 148, 7, 1999-2009.
- MIKULSKI, M., BOISIER, P., LACASSIN, F., SOUPE-GILBERT, M. E., MAURON, C., BRUYERE-OSTELLS, L., BONTE, D., BARGUIL, Y., GOURINAT, A. C., MATSUI, M., VERNEL-PAUILLAC, F. & GOARANT, C. 2015. Severity markers in severe leptospirosis: a cohort study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 34, 687-95.
- MIYAHARA, S., SAITO, M., KANEMARU, T., VILLANUEVA, S. Y., GLORIANI, N. G. & YOSHIDA, S. 2014. Destruction of the hepatocyte junction by intercellular invasion of *Leptospira* causes jaundice in a hamster model of Weil's disease. *Int J Exp Pathol*, 95, 271-81.
- MURRAY, A., WINTER, N., LAGRANDERIE, M., HILL, D. F., RAUZIER, J., TIMM, J., LECLERC, C., MORIARTY, K. M., GHEORGHIU, M. & GICQUEL, B. 1992. Expression of *Escherichia coli* beta-galactosidase in *Mycobacterium bovis* BCG using an expression system isolated from *Mycobacterium paratuberculosis*

- which induced humoral and cellular immune responses. *Mol Microbiol* 6(22):3331–3342
- MURRAY, G. L., LO, M., BULACH, D. M., SRIKRAM, A., SEEMANN, T., QUINSEY, N. S., SERMSWAN, R. W., ALLEN, A. & ADLER, B. 2013. Evaluation of 238 antigens of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo for protection against kidney colonisation. *Vaccine*, 31, 495-9.
- MURRAY, G. L. 2015 The Molecular Basis of Leptospiral Pathogenesis *Curr Top Microbiol Immunol*, 387, 139-85.
- NALLY, J. E., CHOW, E., FISHBEIN, M.C., BLANCO, D. R. & LOVETT, M. 2005. Changes in Lipopolysaccharide O Antigen Distinguish Acute versus Chronic *Leptospira interrogans* Infections. *Infect Immun.*, 73(6), 3251–3260.
- NALLY, J. E., GRASSMANN, A. A., PLANCHON, S., SERGEANT, K., RENAUT, J., SESHU, J., MCBRIDE, A. J. & CAIMANO, M. J. 2017. Pathogenic Leptospire Modulate Protein Expression and Post-translational Modifications in Response to Mammalian Host Signals. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7.
- NASCIMENTO, A. L., VERJOVSKI-ALMEIDA, S., VAN, S. M. A., MONTEIRO-VITORELLO, C. B., CAMARGO, L. E., DIGIAMPIETRI, L. A., HARSTKEERL, R. A., HO, P. L., MARQUES, M. V., OLIVEIRA, M. C., SETUBAL, J. C., HAAKE, D. A. & MARTINS, E. A. 2004. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Braz J Med Biol Res*, 37, 459-77.
- NEWTON-FOOT, M. & PITTIUS, N. C. G. V. 2013. The Complex Architecture of Mycobacterial Promoters. *Tuberculosis (Edinb)*, 93 (1), 60-74
- NIEUWENHUIZEN, N. E., & KAUFMANN, S. H. E. 2018. Next-Generation Vaccines Based on Bacille Calmette-Guérin *Front Immunol*, 9, 121.
- OHARA, N. & YAMADA, T. 2001. Recombinant BCG vaccines. *Vaccine*, 19, 4089-4098.
- OLIVEIRA, T. L., RIZZI, C. & DELLAGOSTIN O. A. 2017. Recombinant BCG vaccines: molecular features and their influence in the expression of foreign genes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 101 (18), 6865- 6877.
- OLIVEIRA, T. L., SCHUCH, R. A., INDA, G. R., ROLOFF, B. C., SEIXAS NETO A. C. P., AMARAL, M., DELLAGOSTIN, O. A. & Daiane Drawanz Hartwig. 2018. LemA and Erp Y-like Recombinant Proteins From *Leptospira Interrogans* Protect Hamsters From Challenge Using AddaVax™ as Adjuvant. *Vaccine*, 36 (19), 2574-2580.
- OLIVEIRA, T. L., RIZZI, C., DA CUNHA, C. E. P., DORNELES, J., SEIXAS NETO, A. C. P., AMARAL, M. G., HARTWIG, D. D. & DELLAGOSTIN, O. A. 2019a. Recombinant BCG strains expressing chimeric proteins derived from *Leptospira* protect hamsters against leptospirosis. *Vaccine*, 37, 776-782.
- OLIVEIRA, T.L., STEDMAN, A., RIZZI, C., DORNELES, J., da CUNHA, C. E. P., VARELA JUNIOR, A. S. & Dellagostin, O. A., McFadden J.A. 2019. Standardized BioBrick Toolbox for the Assembly of Sequences in Mycobacteria. *Tuberculosis (Edinb)*, 119:101851.
- PALANIAPPAN, R. U., MCDONOUGH, S. P., DIVERS, T. J., CHEN, C. S., PAN, M. J., MATSUMOTO, M. & CHANG, Y. F. 2006. Immunoprotection of Recombinant

- Leptospiral Immunoglobulin-Like Protein A Against *Leptospira Interrogans* Serovar Pomona Infection. *Infect Immun*, 74 (3), 1745-50.
- PALOMINO, J.C.; LEÃO, S.C.; RITACOO, V. *Tuberculosis 2007: from basic science to patient care*. Disponível em <www.tuberculosistextbook.com>
- PIARDEAU, M. 2015. Leptospirose: atualizando o quadro global de uma doença negligenciada emergente . *Neg PLoS Trop Dis*, 9, e0004039.
- PICARDEAU, M. 2017. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? *Nat Rev Microbiol*, 15, 297-307.
- REN, S. X., FU, G., JIANG, X. G., ZENG, R., MIAO, Y. G., XU, H., ZHANG, Y. X., XIONG, H., LU, G., LU, L. F., JIANG, H. Q., JIA, J., TU, Y. F., JIANG, J. X., GU, W. Y., ZHANG, Y. Q., CAI, Z., SHENG, H. H., YIN, H. F., ZHANG, Y., ZHU, G. F., WAN, M., HUANG, H. L., QIAN, Z., WANG, S. Y., MA, W., YAO, Z. J., SHEN, Y., QIANG, B. Q., XIA, Q. C., GUO, X. K., DANCHIN, A., SAINT GIRONS, I., SOMERVILLE, R. L., WEN, Y. M., SHI, M. H., CHEN, Z., XU, J. G. & ZHAO, G. P. 2003. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature*, 422, 888-93.
- RIZZI, C., BIANCO, M. V., BLANCO, F. C., SORIA, M., GRAVISACO, M. J., MONTENEGRO, V., VAGNONI, L., BUDDLE, B., GARBACCIO, S., DELGADO, F., LEAL, K. S., CATALDI, A. A., DELLAGOSTIN, O. A., & BIGI, F. 2012. Vaccination with a BCG strain overexpressing Ag85B protects cattle against *Mycobacterium bovis* challenge. *PLoS One* 7:e51396.
- 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, 88-95.
- SEIXAS, F.K., BORSUK, S., FAGUNDES, M. Q. HARTWIG, D. D., DA SILVA, E. F., CERQUEIRA, G. M. & DELLAGOSTIN, O. A. 2010. Stable expression of *Leptospira interrogans* antigens in auxotrophic *Mycobacterium bovis* BCG. *Biological Research*, 43 (1), 13-8.
- SHAH, K., AMONKAR, G. P., KAMAT, R. N. & DESHPANDE, J. R. 2010. Cardiac findings in leptospirosis. *J Clin Pathol*, 63, 119-23.
- SCHARRIG, E., CARESTIA, A., FERRER, M. F., CEDOLA, M., PRETR.E, G., DRUT, R., PICARDEAU, M., SCHATTNER, M. & GOMEZ, R. M. 2015. Neutrophil Extracellular Traps are Involved in the Innate Immune Response to Infection with *Leptospira*. *PLoS Negl Trop Dis*, 9, e0003927.
- SHETTY, R. P., ENDY, D., KNIGHT, T. F. J. 2008. Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. *J Biol Eng*, 2, 5.
- 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, 6277-86.
- TANNER, R., RAMOS, B. V., VORDERMEIER, H. M. & MCSHANE, H. 2019. The Humoral Immune Response to BCG Vaccination. *Front Immunol*, 10:1317.

- THIBEAUX, R., GIRAULT, D., BIERQUE, E., GILBERT, M. E. S., RETTINGER, A., DOUYÈRE, A., MEYER, M., IRAOLA, G., PICARDEAU, M. & GOARANT, C. 2018. Biodiversity of Environmental *Leptospira*: Improving Identification and Revisiting the Diagnosis. *Front Microbiol*, 9, 816.
- TRAN, V., LIU, J., & BEHR, M. A. 2014. BCG Vaccines. *Microbiol Spectr*, 2 (1).
- VIEIRA, M. L., NAUDIN, C., MÖRGELIN, M., ROMERO, E. C., NASCIMENTO, A. T. O. & HERWALD, H. 2016. Modulation of Hemostatic and Inflammatory Responses by *Leptospira* Spp. *PLoS Negl Trop Dis*, 10(5): e0004713.
- VINCENT, A. T., SCHIETTEKATE, O., GOARANT, C., NEELA, V. K., BERNET, E., THIBEAUX, R., ISMAIL, N., KHALID M. K. N., AMRAN, F., MASUZAWA, T., NAKAO, R., KORBA, A. A., BOURHY, P., VEYRIER, F. J. & PICARDEAU, M. 2019. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Negl Trop Dis*, 13 (5), e0007270.
- WANG, N., HAN, Y-H., SUNG, J-Y., LEE, W-S & OU, T-Y. 2016. Atypical Leptospirosis: An Overlooked Cause of Aseptic Meningitis. *BMC Res Notes*, 9, 154.
- WERTS, C., TAPPING, R. I., MATHISON, J. C., CHUANG, T. H., KRAVCHENKO, V., SAINT, G. 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*. 2:346–352.
- WERTS, C. 2018. Interaction of *Leptospira* With the Innate Immune System. *Curr Top Microbiol Immunol*, 415, 163-187.
- YANG, C. W. 2018. Leptospirosis Renal Disease: Emerging Culprit of Chronic Kidney Disease Unknown Etiology. *Nephron*, 138 (2), 129-136.
- ZHU, B., DOCKRELL, H. M., OTTENHOFF, T. H. M., EVANS, T. G., ZHANG, Y. 2018. Tuberculosis Vaccines: Opportunities and Challenges. *Respirology*, 23 (4), 359-368.
- ZHUKOVA, A., FERNANDES, L. G., HUGON, P., PAPPAS, C. J., SISMEIRO, O., COPPEE, J. Y., BECAVIN, C., MALABAT, C., ESHGHI, A., ZHANG, J. J., YANG, F. X. & PICARDEAU, M. 2017. Genome-Wide Transcriptional Start Site Mapping and sRNA Identification in the Pathogen *Leptospira interrogans*. *Front Cell Infect Microbiol*, 7.

ANEXOS

Anexo 1. Aprovação do comitê de Ética e Experimentação Animal para utilização de hamsters sírios (CEEA 4646-2015) nos experimentos descritos nesta dissertação.

UFFPEL
CEEA
COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

UFFPEL
F.L.S. 4
RE
CEN

COP

Pelotas, 10 de agosto de 2015

De: M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Para: Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin
Biociências – Centro de Desenvolvimento Tecnológico

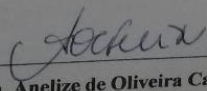
Senhor Professor:

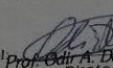
A CEEA analisou o projeto intitulado: “**Construção de quimeras de antígenos de *Leptospira interrogans* pelo método BioBricks® e expressão em BCG como vacina multivalente contra leptospirose animal**”, processo nº23110.004646/2015-17 que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, pois está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

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

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao COBALTO para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 4646-2015).

Vigência do Projeto: 10/08/2015 a 28/05/2018
Espécie/Linhagem: *Mus musculus* Balb/c e *Mesocricetus auratus* Golden Syrian
Nº de animais: 32 camundongos e 312 hamster
Idade: 6 semanas (camundongos) e 4 semanas (hamster)
Sexo: Fêmeas (camundongos) e Machos (hamster)
Origem: Biotério Central/UFFPEL


M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix
Presidente da CEEA

Assinatura do Professor Responsável:  Ciente em: 26/10/2015
Prof. Odir A. Dellagostin
Diretor
Centro de Desenvolvimento Tecnológico

Anexo 2. Solicitação do adendo para prorrogação do CEEA 4646-2015.

11/05/2020

SEI/UFPEL - 0313776 - CEEA: modelo de adendo



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Comissão de Ética em Experimentação Animal

FORMULÁRIO PARA SOLICITAÇÃO DE ADENDO E/OU MUDANÇA EM PROJETO

Título do Projeto: Construção de quimeras de antígenos de *Leptospira interrogans* pelo método BioBricks e expressão em BCG como vacina multivalente contra leptospirose animal

Nº de registro na CEEA: 4646-2015

Pesquisador responsável: Odir Antônio Dellagostin

Adendo ou modificação a ser executada na metodologia original (UTILIZE O ESPAÇO QUE FOR NECESSÁRIO):

O presente projeto intitulado "Construção de quimeras de antígenos de *Leptospira interrogans* pelo método BioBricks e expressão em BCG como vacina multivalente contra leptospirose animal", aprovado pelo CEEA sob número 4646-2015 previa a utilização de 312 hamsters para avaliação de vacinas recombinantes vetorizadas por *Mycobacterium bovis* BCG contra leptospirose. Deste total, apenas 80 animais foram solicitados para os ensaios.

Estes 80 animais foram utilizados para avaliação de uma vacina vetorizada por BCG, cujo antígeno alvo foi uma proteína quimérica recombinante, composta pelos antígenos LipL32, LemA e LigANI de *Leptospira interrogans*. Os resultados obtidos nesse trabalho foram promissores, e 100% de proteção foi observada nos grupos que receberam as cepas de BCG recombinante expressando a quimera sob o comando de 4 promotores micobacterianos diferentes. Todos os animais do grupo controle negativo vieram a óbito, e um grupo que recebeu uma cepa de BCG recombinante expressando a quimera na forma secretada apresentou taxa de 80% de proteção. Além disso, os resultados obtidos por PCR quantitativo em tempo real demonstraram proteção contra colonização renal dos animais. Estes dados estão agrupados em um manuscrito recentemente submetido para o periódico *Vaccine*.

Para dar seguimento a este projeto, pretendemos avaliar 5 porções antigênicas desta quimera, também expressas em BCG, para determinar quais regiões são responsáveis pela proteção, bem como para avaliar a estabilidade da vacina quando regiões menores são expressas neste bacilo. Sabe-se que a massa molecular do antígeno, somado a outros fatores, podem comprometer a estabilidade da vacina vetorizada por BCG.

O experimento de imunoproteção será realizado em hamsters (machos e/ou fêmeas) e seu delineamento está descrito na tabela 1. Os animais serão vacinados em duas doses, nos dias 0 e 21, com 10^6 UFC das cepas de BCG, pela via subcutânea. O grupo controle positivo será imunizado via intramuscular com 10^9 leptospirose inativadas pelo calor. Cinquenta e um dias após a primeira imunização, os animais serão desafiados com $5 \times \text{DL}_{50}$ *L. interrogans* sv. Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 pela via intraperitoneal. Antes da primeira imunização e do desafio, amostras de sangue serão coletadas pelo plexo venoso retro-ocular após administração de colírio anestésico, para avaliação da resposta imune humoral. Os animais serão observados

por 30 dias após o desafio, sendo eutanasiados por aprofundamento anestésico com pentobarbital quando apresentarem os sinais clínicos de leptospirose (perda de apetite, prostração, dispneia e perda de 10% do peso corporal máximo).

Tabela 1: Delineamento experimental do experimento de imunoproteção em hamsters.

Denominação do Grupo	Inóculo	Número de animais*
Grupo A (controle)	BCG Pasteur	10
Grupo B	BCG Pasteur + pUP500: PAN_P1	10
Grupo C	BCG Pasteur + pUP500: PAN_P2	10
Grupo D	BCG Pasteur + pUP500: PAN_P3	10
Grupo E	BCG Pasteur + pUP500: PAN_P4	10
Grupo F	BCG Pasteur + pUP500: PAN_P5	10
Grupo G	Bacterina	4

* Pretende-se realizar duas repetições deste experimento, totalizando 128 animais (Experimento 1 – 32 machos e 32 fêmeas; Experimento 2 – 32 machos e 32 fêmeas).

Além disso, para podermos avaliar a influência do antígeno na estabilidade das cepas de BCG recombinante conforme experimento já padronizado anteriormente e também aprovado pelo CEEA sob número 14548-2018, solicitamos através deste pedido um total de 96 camundongos BALB/C machos e fêmeas a serem utilizados no experimento descrito na Tabela 2. Estes animais serão inoculados intraperitonealmente com 10^7 UFC de BCG recombinante ou controle. Oito animais de cada grupo serão eutanasiados com isoflurano aos 60 dias pós-vacinação e os oito restantes de cada grupo, aos 126 dias pós-vacinação. Em ambas as etapas serão coletados os baços para a cultura microbiológica.

Tabela 2: Delineamento experimental da avaliação de estabilidade das vacinas vetorizadas por BCG em camundongos.

Denominação do Grupo	Inóculo	Número de animais*
Grupo A (controle)	BCG Pasteur	16

11/05/2020

SEI/UFPEI - 0213776 - CEEA: modelo de adendo

Grupo B	BCG Pasteur + pUP500/P1	16
Grupo C	BCG Pasteur + pUP500/P2	16
Grupo D	BCG Pasteur + pU500/P3	16
Grupo E	BCG Pasteur + pU500/P4	16
Grupo F	BCG Pasteur + pU500/P5	16

* Cada grupo de 16 animais será subdividido em dois subgrupos de 8 animais cada, para avaliação da estabilidade das vacinas nos tempos de 8 e 16 semanas após vacinação.

Justificativa do pesquisador responsável para solicitação de adendo e/ou modificação no projeto (UTILIZE O ESPAÇO QUE FOR NECESSÁRIO):

O número de hamsters previstos inicialmente não foi utilizado, e considerando os resultados promissores observados no primeiro estudo realizado e descritos no item acima, acreditamos ser relevante dar seguimento a estes estudos avaliando porções antigênicas do antígeno inicialmente testado. Para tanto, necessitamos prorrogar o prazo do projeto até agosto de 2020.

O número solicitado de camundongos não foi previsto inicialmente uma vez que priorizamos observar se os resultados seriam promissores apenas utilizando o antígeno quimérico íntegro e se observaríamos taxas de proteção significativas, para então avaliar a estabilidade das vacinas recombinantes utilizando as porções antigênicas da quimera inteira. O experimento de estabilidade já foi padronizado utilizando animais solicitados anteriormente e a estabilidade da vacina baseada na quimera íntegra também está em fase de avaliação. Assim, com esse resultado, poderemos comparar a influência do antígeno utilizado na estabilidade das cepas de BCG recombinante, o que também foi recomendado pela comissão de acompanhamento do programa de pós-graduação em Biotecnologia. Ainda, existe a possibilidade destes animais serem utilizados para avaliação da estabilidade de outras cepas de BCG recombinante expressando o mesmo antígeno (quimera 1), porém sob o comando de diferentes promotores, com o objetivo de determinar a influência do promotor usado na estabilidade vacinal. Estes experimentos foram iniciados porém nem todas as construções foram avaliadas uma vez que um experimento piloto foi realizado para padronização do protocolo. Caso as porções antigênicas não estimulem uma resposta protetora, estes animais serão direcionados para esta outra análise, conforme delineado em adendo prévio aprovado pelo CEEA (14548-2018).

Diante do exposto, venho por meio desta solicitar a extensão do prazo do projeto citado acima para realização de experimentos de imunoproteção utilizando porções antigênicas de uma proteína quimérica previamente avaliada como vacina recombinante vetorizada por *Mycobacterium bovis* BCG contra leptospirose. Além disso, solicitamos um pedido de 96 camundongos BALB/C para realização dos experimentos de estabilidade das vacinas construídas, de acordo com o protocolo descrito acima e aqui devidamente justificado.

SE O ADENDO FOR PARA AUMENTAR O NÚMERO DE ANIMAIS, DEVE-SE ESCLARECER O MOTIVO PELO QUAL OS MESMOS NÃO FORAM PREVISTOS

11/05/2020

SEI/UFPA - 0313776 - CEEA: modelo de adendo

NO PROJETO INICIAL. ALÉM DISTO, ESTE DOCUMENTO DEVE SER ACOMPANHADO DO TCLE DEVIDAMENTE PREENCHIDO E ASSINADO.



Documento assinado eletronicamente por **THAIS LARRÉ OLIVEIRA, Professor do Magistério Superior/Auxiliar**, em 16/10/2018, às 09:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0313776** e o código CRC **CF582F69**.

Referência: Processo nº 23110.054548/2018-22

SEI nº 0313776

Anexo 3. Aprovação da solicitação do adendo para utilização de hamsters sírios nos experimentos.

11/05/2020

SEI/UFPEL - 0672882 - Parecer



PARECER Nº
PROCESSO Nº

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
93/2019/CEEA/REITORIA
23110.014548/2018-22

Certificado

Certificamos que a solicitação de adendo à proposta intitulada "**Construção de quimeras de antígenos de *Leptospira interrogans* pelo método BioBricks e expressão em BCG como vacina multivalente contra leptospirose animal**", registrada com o nº 23110.014548/2018-22 sob a responsabilidade de **Odir Antônio Dellagostin** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de **15 de agosto de 2019**.

Finalidade	(x) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	Prorrogado até agosto de 2020
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> /Balb/c
Nº de animais	96
Idade	4 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central - UFPel

Código para cadastro nº CEEA 14548-2018

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix
Presidente da CEEA

11/05/2020

SEI/UFPA - 0672882 - Parecer



Documento assinado eletronicamente por **ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELO FELIX, Médico Veterinário**, em 23/08/2019, às 14:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0672882** e o código CRC **DE59A376**.

Referência: Processo nº 23110.014548/2018-22

SEI nº 0672882