

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Centro de Desenvolvimento Tecnológico



Dissertação

**Proteção contra leptospirose induzida por LipL32
co-administrada ou fusionada à LTB**

André Alex Grassmann

Pelotas, 2011

ANDRÉ ALEX GRASSMANN

**Proteção contra leptospirose induzida por LipL32
co-administrada ou fusionada à LTB**

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

Orientador: Odir Antônio Dellagostin

Co-Orientador: Éverton Fagonde da Silva

Pelotas, 2011

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

G769p

Grassmann, André Alex

Proteção contra leptospirose induzida por LipL32 co-administrada ou fusionada à LTB / André Alex Grassmann. – 49f. : fig. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico, 2011. – Orientador Odir Antônio Dellagostin ; co-orientador Éverton Fagonde da Silva.

1.Biotecnologia. 2.Vacina recombinante. 3.Leptospira. 4.Leptospirose. 5.LTB. 6.LipL32. I.Dellagostin, Odir Antônio. II.Silva, Everton Fagonde da. III.Título.

CDD: 614.56

Banca examinadora:

Dr. Fábio Pereira Leivas Leite

Dr^a. Flavia Weykamp da Cruz McBride

Dr. Geferson Fischer

Dr. Odir Antônio Dellagostin

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas, ao Núcleo de Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico e a CAPES pela oportunidade de realizar o mestrado, pela qualidade do ensino e pesquisa e pela bolsa de mestrado;

Aos professores Odir Antônio Dellagostin e Éverton Fagonde da Silva pela dedicação na orientação e pela amizade;

À minha família pelo apoio, suporte, carinho e amor. Aqui incluo a Thaís, fundamental neste período da minha vida;

Aos demais professores, amigos e colegas do laboratório 7 e de toda Biotec por tornarem o ambiente de trabalho e estudo agradável e divertido.

Muito obrigado a todos!

*"The circle is now complete.
When I left you I was but the learner.
Now I am the master."*

Darth Vader

Resumo

GRASSMANN, André Alex. **Proteção contra leptospirose induzida por LipL32 co-administrada ou fusionada à LTB**. 2011. 49f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A leptospirose é uma doença infecciosa que afeta humanos e animais silvestres e domésticos em todo mundo. As espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* são os agentes causadores desta zoonose. As diversas espécies de leptospirosas possuem notada diversidade antigênica, inclusive em uma mesma espécie. Esta característica resulta em limitação das atuais vacinas – bacterinas – que não induzem proteção cruzada entre os diferentes sorovares. Além disso, estas vacinas geram efeitos adversos e imunidade de curta duração, restringindo seu uso em populações humanas. A necessidade de novas vacinas eficazes contra a leptospirose estimulou estudos para caracterizar novos antígenos vacinais. A lipoproteína de membrana externa de 32 kDa, LipL32 é a proteína mais abundante no proteoma total da leptospirosas, conservada entre todos os sorovares patogênicos e ausente nas leptospirosas saprófitas. Esta proteína é imunogênica e possui habilidade de ligar-se à matriz extracelular de mamíferos. Porém, animais inoculados com vacinas de subunidade utilizando LipL32 não sobrevivem ao desafio. Em função disso, utilizamos LipL32 fusionada e co-administrada com a subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB) para melhorar a resposta imune. LTB é uma molécula atóxica com reconhecida atividade imunoestimuladora e imunomoduladora. As proteínas recombinantes rLTB, rLipL32 e rLTB::LipL32 foram produzidas em *E. coli*, purificadas e caracterizadas. Hamsters fêmeas foram distribuídas em grupos e inoculadas com duas doses, da seguinte forma: rLTB; rLTB+rLipL32; rLTB::LipL32, bactéria homóloga e PBS. Soro foi coletado individualmente para determinação da resposta imune humoral por ELISA. Os animais foram desafiados com uma dose de $5 \times DL_{50}$ de *Leptospira interrogans* cepa Fiocruz L1-130. Os tratamentos induziram altos títulos de anticorpos anti-rLipL32. Os tratamentos rLTB+rLipL32 e rLTB::LipL32 induziram resposta protetora significativa frente ao desafio quando comparados com os grupos controle ($p < 0,05$). Nenhum estudo anterior usou LTB como adjuvante para uma vacina contra leptospirose, tampouco antígenos fusionados com o intuito de controlar esta doença. Além disso, este é o primeiro relato de indução de imunidade protetora utilizando rLipL32 como vacina de subunidade, uma importante contribuição para o desenvolvimento de vacinas mais eficazes contra leptospirose.

Palavras chave: *Leptospira*. Leptospirose. Vacina recombinante. LTB. LipL32.

Abstract

GRASSMANN, André Alex. **Protection against leptospirosis induced by LipL32 co-administered or fused to LTB**. 2011. 49f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Leptospirosis is an infectious disease that affects humans, wild and domestic animals worldwide. Pathogenic spirochetes from the *Leptospira* genus are the causative agents of this zoonosis. The several *Leptospira* species have noted antigenic diversity, even within the same species. This is the main reason current bacterin vaccines have limitations, such as adverse effects and short term immunity, restricting their use in human populations. The need for effective leptospirosis vaccines promoted studies on characterization of new vaccine candidates. The 32 kDa outer membrane lipoprotein, LipL32, is the most abundant protein in the whole leptospira proteome, it is conserved in all pathogenic serovars and absent in saprophytes. This protein is immunogenic and able to bind to mammalian extracellular matrix. However, LipL32 subunit vaccines did not protect animals against challenge. In an attempt to solve this, we use LipL32 fused and co-administered with B subunit of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LTB) to enhance the immune response. LTB is a non-toxic molecule with immunoestimulatory and immunomodulatory properties. The recombinant proteins rLTB, rLipL32 and rLTB::LipL32 were expressed in *E. coli*, purified and characterized. Female hamsters were distributed in groups as follows: rLTB; rLTB+rLipL32; rLTB::LipL32, homologous bacterin; PBS. The serum from each animal was collected for humoral immune response determination by ELISA. The animals were challenged with 5×LD₅₀ dose of *Leptospira interrogans* strain Fiocruz L1-130. Both treatments induced high titers of anti-rLipL32 antibodies. The rLTB+rLipL32 and rLTB::LipL32 treatments afforded significant protective response upon challenge, when compared to control groups ($p < 0.05$). No prior study with leptospirosis had used LTB as the adjuvant, or fused antigens in an attempt to control this disease. Furthermore, this is the first report of a protective subunit vaccine using rLipL32 as the antigen, and an important contribution towards the development of improved leptospirosis vaccines.

Keywords: *Leptospira*. Leptospirosis. Recombinant vaccine. LTB. LipL32.

Sumário

1. Introdução.....	8
1.1. A Leptospira.....	8
1.2. Fatores de virulência.....	10
1.3. A leptospirose.....	11
1.4. Patogênese.....	12
1.5. Manifestações clínicas.....	13
1.6. Imunidade a leptospirose.....	14
1.7. Vacinas.....	16
1.7.1. Vacinas recombinantes.....	16
1.7.2. Adjuvantes.....	17
1.7.2.1. LTB.....	18
2. Objetivo	19
2.1. Objetivos específicos.....	19
3. Hipótese.....	20
4. Artigo.....	21
5. Conclusão.....	42
6. Referências.....	43

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose grave de distribuição mundial causada por espécies patogênicas do gênero *Leptospira*. É comum o relato mundial de cerca de 500 mil casos anuais de leptospirose humana, mas é possível que atinja um número maior de indivíduos. Muitos casos não são diagnosticados, são confundidos com outras doenças ainda no início da infecção e curados após um tratamento inespecífico (KO et al., 2009).

As leptospirosas colonizam os rins de animais reservatórios e são eliminadas no ambiente através da urina. A transmissão ocorre por contato direto do hospedeiro com urina ou tecidos contaminados. Desta forma, países desenvolvidos e em desenvolvimento são afetados pela doença, por problemas de infraestrutura, transmissão facilitada durante enchentes ou pelo caráter ocupacional que a doença pode assumir (FAINE et al., 1999).

1.1. A *Leptospira*

As leptospirosas são espiroquetas delgadas e com extremidades dobradas em forma de gancho. São dotadas de grande mobilidade proporcionada por dois flagelos periplasmáticos ancorados próximos às extremidades. Possuem membrana dupla, onde a membrana citoplasmática fica associada à parede celular de peptídeo glicano, envoltas pela membrana externa (ADLER, DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

O gênero *Leptospira* pertence à ordem *Spirochaetales* e inclui representantes patogênicos e saprofíticos. Atualmente estão descritas 20 espécies para o gênero *Leptospira*, das quais 13 são patogênicas – *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii* e *L. wolffii* – e 7 saprofíticas – *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. yanagawae*, *L. kmetyi*, *L. vanthielii*, *L. wolbachii* e *L. yanagawae*. A classificação sorológica de leptospirosas revela a existência de mais de 250 sorovares patogênicos, distribuídos em 24 sorogrupos distintos (CERQUEIRA, PICARDEAU, 2009). Esta variedade sorológica é consequência da vasta diversidade de epítomos expostos na superfície, em um mosaico de antígenos lipopolissacarídeos (LPS), bem como da orientação e composição de seus açúcares (ADLER, DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

O LPS é o principal antígeno das leptospiros. Ele é estruturalmente e imunologicamente semelhante ao LPS de organismos Gram-negativos, porém menos tóxico e letal (FAINE et al., 1999). O lipídeo A leptospiral possui algumas características não usuais, como dissacarídeos de glucosamina fosforilados e metilados (QUE-GEWIRTH et al., 2004). A membrana externa apresenta numerosas proteínas ancoradas, expostas na superfície (KO et al., 2009). As funções destas proteínas são diversas, com destaque para a mediação de ligação entre a leptospira e a matriz extracelular. Algumas proteínas com este papel foram extensivamente estudadas, seja para avaliar seu desempenho como antígeno vacinal, ou elucidar a participação no contexto da infecção. São alguns exemplos, LipL32, LipL21, LipL41 (CULLEN et al. 2002; CULLEN et al. 2005), LigA (SILVA et al., 2007), LigB (CRODA et al., 2008), Loa22 (RISTOW et al., 2007).

As leptospiros são aeróbias obrigatórias com crescimento ótimo em temperaturas entre 28 e 30 °C. O meio de cultura mais utilizado para o crescimento de leptospiros é o EMJH, baseado em ácido oleico, albumina sérica bovina e polisorbato. O uso de soro, principalmente de coelho, e piruvato é comum em experimentos de isolamento inicial de algumas cepas. O crescimento de contaminantes em culturas a partir de amostras clínicas pode ser inibido com a utilização de 5-fluoracil, gentamicina, ácido nalidixico ou rifampicina. Em meio semi-sólido (0,1-0,2% de ágar) pode ser observado um anel de células no local de tensão de oxigênio ideal para o crescimento de leptospiros, denominado disco de Dinger (FAINE et al., 1999). As leptospiros podem ser mantidas em subculturas repetidas, porém em longo prazo há tendência para atenuação da virulência (TULSIANI et al., 2010).

O crescimento fastidioso típico de leptospiros limita estudos fisiológicos e genéticos. Nenhum plasmídeo de ocorrência natural em leptospiros foi descrito e não são conhecidos mecanismos de transferência de genes entre estes organismos. Um bacteriófago encontrado em *L. biflexa* deu origem ao único plasmídeo disponível para manipulação genética, porém este não é replicável em leptospiros patogênicas (GIRONS et al., 2000). O desenvolvimento de metodologias para mutagênese randômica em leptospiros utilizando o transposon *Himar1 mariner* permitiu a obtenção de uma extensa biblioteca de mutantes (BOURHY et al., 2005; MURRAY et al., 2009a). Estes mutantes estão em estudo a fim de identificar e caracterizar os efeitos da mutação, de forma a elucidar a função de determinado gene e sua

contribuição para a virulência de *Leptospira*. Até o momento, apenas um estudo obteve sucesso com mutação sítio dirigida por recombinação homóloga em uma cepa patogênica de *L. interrogans* (CRODA et al., 2008).

Seis sequências completas de genomas de leptospiros estão disponíveis: *L. interrogans* sorovares Lai e Copenhageni, duas cepas de *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo e duas cepas de *L. biflexa* sorovar Patoc (REN et al., 2003; NASCIMENTO et al., 2004; BULACH et al., 2006; PICARDEAU et al., 2008). *L. interrogans* e *L. borgpetersenii* possuem dois cromossomos circulares, enquanto *L. biflexa* possui um terceiro cromossomo, de 74 kb. Um elevado número de genes é exclusivo para as leptospiros patogênicas, dos quais a maioria (59%) possui função desconhecida. Esta constatação sugere a existência de fatores de virulência únicos para leptospiros, que não podem ser identificados por similaridade aos encontrados em outras bactérias.

1.2. Fatores de virulência

A base molecular da virulência de leptospiros patogênicos começa agora a ser elucidada. Apesar dos numerosos estudos focados na identificação de fatores de virulência responsáveis por fenômenos como a adesão de leptospiros às células renais, resistência ao complemento e invasão celular, nenhum alvo pode ser apontado como responsável por estes fenômenos (ADLER, DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Apesar de algumas proteínas de leptospiros serem secretadas, incluindo enzimas de degradação, não há evidências de maquinaria dedicada à secreção de proteínas similares à maquinaria de secreção do tipo III ou IV, de fatores de virulência comuns em bactérias Gram-negativas e que injetam proteínas nas células do hospedeiro (KO et al., 2009).

O primeiro fator de virulência identificado em *Leptospira* foi Loa22, uma lipoproteína de membrana externa, com função ainda não esclarecida, reconhecida por soro humano convalescente. Uma cepa de *Leptospira* mutante, não expressando Loa22, teve a virulência atenuada em experimentos utilizando cobaias e hamsters (RISTOW et al., 2007).

Recentes estudos identificaram mais três fatores de virulência em leptospiros: a heme oxigenase, a motilidade e o LPS. A heme oxigenase codificada pelo gene *hemO* degrada o anel tetrapirólico da molécula de hemoglobina liberando ferro. *Leptospira interrogans* com este gene nocauteado teve a virulência atenuada em

experimentos realizados com hamsters (MURRAY et al., 2009b). A proteína FliY é uma das responsáveis pelo controle do motor flagelar em leptospiros. A inativação do gene *fliY* afeta genes relacionados ao flagelo, criando um fenótipo com motilidade reduzida, fácil eliminação por macrófagos e de letalidade atenuada em infecções experimentais de cobaias (LIAO et al., 2009). *L. interrogans* com mutações em genes envolvidos na biossíntese do LPS apresentaram fenótipo com LPS modificado, havendo perda de epítomos e modificação antigênica deste LPS. Estes mutantes não mais conduzem hamsters a óbito (MURRAY et al., 2010).

A proteína de membrana externa mais abundante do proteoma total de leptospiros patogênicas é a lipoproteína LipL32 (MALMSTROM et al., 2009), representando 75% do proteoma da membrana externa (CULLEN et al., 2002). Esta proteína é expressa em todas as leptospiros patogênicas (HAAKE et al., 2004), inclusive durante a infecção (HAAKE et al., 2000), e está ausente nas saprófitas (PICARDEAU et al., 2008). LipL32 liga-se à laminina (HOKE et al., 2008), colágeno, fibronectina (HAUK et al., 2008) e ao plasminogênio (VIEIRA et al., 2010). Era esperado que esta proteína fosse essencial à virulência de leptospira, porém num estudo de mutagênese onde *lipL32* foi silenciado no genoma de *L. interrogans*, nenhuma modificação da virulência foi observada após infecção de hamsters (MURRAY et al., 2009c).

O mesmo ocorreu com outra importante proteína de membrana externa. A mutação de *ligB* em *L. interrogans* não afetou a habilidade da bactéria em causar leptospirose aguda em hamster nem a persistência da colonização renal em ratos (CRODA et al., 2008). O gene *ligB* está presente apenas no genoma de leptospiros patogênicas. A proteína semelhante à imunoglobulina B (LigB) liga-se a vários componentes da matriz extracelular de mamíferos (CHOY et al., 2007) e é reconhecida pelo soro de pacientes com leptospirose (CRODA et al., 2007). Uma explicação plausível para estes acontecimentos é a aparente redundância de função entre as numerosas proteínas ancoradas na membrana externa de leptospiros.

1.3. A leptospirose

O ciclo de transmissão da leptospirose requer a circulação enzoótica da *Leptospira* entre os animais reservatórios. Estes reservatórios são animais silvestres e domésticos, principalmente roedores, com destaque para os ratos (principalmente *Rattus rattus* e *R. norvegicus*) e camundogos (*Mus musculus* e outras espécies de

Mus), pequenos marsupiais, bovinos, suínos e cães (FAINE et al., 1999). Os sorovares de *Leptospira* demonstram moderada especificidade para o hospedeiro, a exemplo dos sorovares Ballum e Icterohaemorrhagiae em camundongos, sorovar Copenhageni em ratos e Hardjo em bovinos (ADLER, DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

Do rim de animais reservatórios, as leptospiros são excretadas na urina e podem contaminar o ambiente. A *Leptospira* é capaz de sobreviver semanas em solo úmido ou na água, podendo formar biofilmes e agregados celulares, o que auxiliaria nesta sobrevivência fora do hospedeiro (TRUEBA et al., 2004; RISTOW et al., 2008). Através do contato direto ou indireto com urina ou tecidos de um animal infectado, humanos e outros animais são infectados pela *Leptospira*. Uma vez dentro do hospedeiro, as leptospiros patogênicas provocam uma infecção sistêmica, manifestada de forma aguda e crônica, com variada sintomatologia e sinais clínicos. A leptospirose humana é sempre adquirida a partir de uma origem animal. A transmissão entre humanos é, por razões práticas, inexistente e tratada sempre como zoonose (ADLER, DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

1.4. Patogênese

Fazendo uso da alta mobilidade e morfologia privilegiada, as leptospiros entram no organismo através das mucosas, de pequenos cortes ou abrasão na pele (FAINE et al 1999). Estudos *in vitro* demonstram que leptospiros, apesar de serem organismos extracelulares, atravessam rapidamente células epiteliais do hospedeiro (MERIEN et al., 1997; BAROCCHI et al., 2002; LIU et al., 2007). Estas constatações sugerem a entrada e a translocação em células do hospedeiro como mecanismo de propagação nos órgãos alvo e evasão do sistema imune.

Uma vez dentro do organismo, as leptospiros circulam na corrente sanguínea, ocorrendo multiplicação e disseminação durante cerca de 7 dias. Após atingir um número crítico de leptospiros na corrente sanguínea, o epitélio de pequenos vasos sanguíneos sofre as primeiras lesões decorrentes da doença (ADLER, DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

Os túbulos renais apresentam uma densa população de *Leptospira* patogênica, em agregados amórficos semelhantes ao biofilme. Em ratos, as leptospiros promovem, inicialmente, uma infecção sistêmica, porém após certo

tempo são eliminadas de todos os órgãos com exceção dos rins (ATHANAZIO et al., 2008).

A leptospirose é caracterizada por vasculite e infiltrado inflamatório de células monocíticas, plasmáticas, histiócitos e neutrófilos. A histopatologia é frequente nos rins, fígado, pulmões e coração. Outros órgãos também são afetados dependendo da severidade da infecção. Em casos graves ocorrem hemorragias, icterícia e deficiência plaquetária. A análise macroscópica dos órgãos atingidos evidencia petéquias hemorrágicas que podem ser extensas, bem como órgãos descorados devido à icterícia. Esplenomegalia e granulocitose são frequentes (FAINE et al., 1999).

Quando aparecem anticorpos circulantes, as leptospiras são removidas da circulação e dos tecidos por opsonização seguida de fagocitose. Mesmo as lesões teciduais mais severas podem ser reversíveis, apesar de algumas persistirem como cicatrizes, a exemplo do que ocorrem em rins de suínos e cães (ADLER, DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

1.5. Manifestações clínicas

A severidade da leptospirose humana pode variar de acordo com a idade, estado de saúde e imunocompetência do paciente e com o sorovar de *Leptospira*. As primeiras manifestações são dor de cabeça e febre, indistinguível daquelas causadas por qualquer outra infecção. Mialgias, mal-estar e sufusão conjuntival também são comuns. Estes sintomas surgem após período de incubação de aproximadamente uma semana e normalmente desaparecem após o início do tratamento (ADLER, DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

A leptospirose pode ser branda e autolimitante ou severa e letal. A maioria dos pacientes se recupera da leptospirose na primeira semana após o aparecimento dos sintomas. Em cerca de 5 a 15% dos casos, o paciente desenvolve manifestações severas tardias, piorando o quadro clínico de 4 a 6 dias após o início da doença. A apresentação clássica da leptospirose severa é chamada de Doença de Weil. Os principais sintomas são icterícia, falha renal aguda, comprometimento das funções hepáticas, hemorragias e hemoptise (KO et al., 2009).

Uma forma emergente e mais grave de leptospirose envolve hemorragias e edema pulmonar severos, com taxas de letalidade maior que 50% (McBRIDE et al.,

2005). Esta manifestação está sendo chamada de Síndrome Hemorrágica Pulmonar associada à Leptospirose (SHPL).

Os cães podem apresentar quatro síndromes relacionadas à leptospirose: ictérica, hemorrágica, urêmica e reprodutiva. A leptospirose canina típica apresenta como sinais clássicos febre, icterícia, vômitos, diarreia, coagulação disseminada intravascular, uremia causada por falha renal, hemorragias e por fim, a morte (BOLIN et al., 1996). Em bovinos e suínos, os sinais de leptospirose incluem problemas reprodutivos, aborto, natimortos, mumificação fetal, prole fraca e agalática (ADLER, DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Já em equinos a principal manifestação da doença é uveíte recorrente, que também é observada em humanos. Animais que se recuperam da leptospirose podem se tornar portadores assintomáticos de leptospiras por longos períodos e eliminá-las no ambiente (LEVETT, 2001).

1.6. Imunidade a leptospirose

Após a invasão, as leptospiras são detectadas pelo sistema imune do hospedeiro por receptores que reconhecem padrões moleculares frequentes em patógenos, principalmente do tipo Toll (TLRs) (FRAGA et al., 2010). Normalmente o LPS de bactérias Gram-negativas é reconhecido por TLR4, que uma vez ativado, resulta em resposta pró-inflamatória dependente de citocina (MILLER et al., 2005). Todavia, o LPS de *Leptospira* ativa macrófagos humanos através do TLR2 e não TLR4 (WERTS et al., 2001). Esse reconhecimento atípico é atribuído à composição não usual do lipídeo A de *Leptospira* (QUE-GEWIRTH et al., 2004). A explicação para o fato de leptospiras patogênicas não causarem doença em camundongos parece estar relacionada com o reconhecimento diferencial do LPS por TLRs (TLR2 e TLR4 em camundongos), e com a localização intracelular da *Leptospira* em macrófagos (fagolisossomos nos macrófagos de camundongos e citosol nos de humanos) (LI et al., 2010).

Leptospiras são patógenos extracelulares e para combatê-las o sistema imune do hospedeiro monta uma resposta imune adquirida baseada na produção de anticorpos e ativação da via clássica do complemento (FAINE et al., 1999). As evidências que suportam esta colocação vêm de diversos estudos nos quais a imunidade foi transferida passivamente por soro humano ou de outro animal, seja por soros produzidos experimentalmente ou por anticorpos monoclonais (MAbs)

contra, por exemplo, LPS (JOST et al., 1986) ou LipL32 (MANEEWATCH et al., 2008). A capacidade protetora de alguns soros está correlacionada com os níveis de anticorpos aglutinantes anti-LPS. MABs anti-LPS são aglutinantes e opsonizantes (ADLER, FAINE 1983). As leptospirosas são fagocitadas por macrófagos e neutrófilos na presença de anticorpos específicos e lisadas na presença de complemento e anticorpos. O LPS é altamente antigênico e imunizações com LPS ou seus componentes induzem resposta imune protetora (JOST et al., 1989; MIDWINTER et al., 1990). LPS é o principal antígeno reconhecido por soro convalescente e a imunidade após uma infecção naturalmente adquirida é restrita aos sorovares com LPS sorologicamente relacionados (ADLER, DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

A importância da resposta imune humoral foi demonstrada em humanos, cães, suínos, cobaias e hamsters (FAINE et al., 1999). A participação da resposta imune celular ainda é pouco compreendida. Em bovinos, a montagem deste tipo de resposta imune está ligada a proteção contra leptospirose, com produção de IFN- γ e proliferação de células T CD4 $^{+}$ $\alpha\beta$ e WC1 $^{+}$ $\gamma\delta$ seguida pela estimulação de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) por *Leptospira* (NAIMAN et al., 2001; NAIMAN et al., 2002). Em humanos, quando CMSP de doadores saudáveis ou pacientes recuperados da leptospirose são estimuladas com *Leptospira*, ocorre uma expansão de linfócitos T $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ (TUERO et al., 2010). Desta forma, linfócitos T $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ parecem ser importantes na resposta imune contra leptospirosas. Foram identificados linfócitos T CD8 $^{+}$ específicos para peptídeos de LigA em pacientes humanos, fornecendo indícios da complexação de antígenos leptospirais com MHC I (TUERO et al., 2010).

As leptospirosas evadem do sistema imune inato durante estágios iniciais da infecção. Elas são resistentes à ativação da via alternativa do complemento (CINCO, BANFI 1983), e possuem ligantes como as proteínas semelhantes às endostatinas (Len), capazes de capturar o fatorH do complemento e reguladores relacionados (STEVENSON et al., 2007). Além disso, *Leptospira* possui a característica de ligar-se a cadeia alfa da proteína do complemento C4-b, um inibidor chave em fase fluída das vias clássica e da lectina. O C4-b ligado na superfície da bactéria mantém sua atividade de cofator, sugerindo que a aquisição desse regulador do complemento possa conferir à *Leptospira* alguma resistência ao soro (BARBOSA et al., 2009).

1.7. Vacinas

Poucas são as medidas profiláticas tomadas para evitar a disseminação da leptospirose. O controle depende principalmente de medidas higiênico-sanitárias básicas que evitem o contato com urina ou água contaminada, mas são de difícil implantação (FAINE et al., 1999). Os prejuízos econômicos e à saúde pública causados pela leptospirose justificam o uso de vacinas em populações animais e humanas.

As pesquisas para desenvolvimento de vacinas contra leptospirose iniciaram ainda na década de 1920. Estas vacinas incluíam leptospiras vivas atenuadas, inteiras e mortas por meios químicos ou físicos, ou preparações livres de células, incluindo LPS ou constituintes polissacarídeos. Estas vacinas induziam proteção em modelos experimentais para leptospirose, porém sempre foram eficientes apenas contra sorovares antigenicamente relacionados com os constituintes da vacina. Uma vacina contra leptospirose deve ser imunogênica, efetiva na prevenção de leptospirose aguda e crônica, de amplo espectro, longa duração e segura, além de evitar estabelecimento de colonização renal (reservatórios) (FAINE et al., 1999). As vacinas clássicas contra a leptospirose além de não induzirem proteção cruzada, são pouco seguras. Estas vacinas são muito reativas, principalmente em populações humanas, onde são observadas reações adversas como febre e vermelhidão, dor e inchaço no sítio de inoculação (FAINE et al., 1999).

Atualmente, bacterinas são usadas para vacinação humana apenas na China, Japão, Vietnã e Cuba, após enchentes. Vacinas contra leptospirose bovina, suína e canina estão comercialmente disponíveis em todo mundo. Estas vacinas protegem apenas contra sorovares antigenicamente relacionados à vacina e revacinações anuais são necessárias para manter a imunidade. Este tipo de vacinação exige vigilância epidemiológica contínua para abranger os sorovares de *Leptospira* presentes na população em questão (ADLER, DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

1.7.1. Vacinas recombinantes

Com a necessidade de uma vacina eficaz contra vários sorovares de *Leptospira* e sem efeitos adversos inerentes às bacterinas, a pesquisa de vacinas contra leptospirose foi dominada pela tecnologia do DNA recombinante. O primeiro estudo realizado com antígenos recombinantes de *Leptospira* utilizou vesículas de membrana externa de *E. coli* contendo OmpL1 e LipL41 (HAAKE et al., 1999).

Resposta imune protetora foi observada apenas quando administradas sinergeticamente, e ainda assim, parcial. A partir daí proteínas de membrana externa viraram alvo recorrente destes estudos, com vários graus de sucesso.

Três proteínas de membrana externa – Lp1454, Lp1118 e Mcell – foram avaliadas individualmente e em sinergismo no modelo de leptospirose em hamsters (CHANG et al., 2007). Foi observada proteção após desafio com taxas de sobrevivência variando entre 71 e 100% nos tratamentos, comparado a 50% de sobrevivência no grupo controle.

Apesar de LipL32 ser a proteína principal da membrana externa de leptospiros patogênicas, os resultados de estudos usando-a como antígeno vacinal são insatisfatórios. Imunizações de gerbils com adenovírus expressando LipL32 resultou em proteção significativa após desafio heterólogo, porém a significância deste resultado é questionável, já que 50% dos animais do grupo controle também sobreviveram (BRANGER et al., 2001). Uma estratégia diferente, utilizando vacinas de DNA, teve taxas de sobrevivência de 60% e comparado a 35% de sobrevivência no grupo controle, não houve significância (BRANGER et al., 2005). Uma vacina experimental utilizando *Mycobacterium bovis* BCG recombinante expressando LipL32 induziu proteção significativa em apenas um de três experimentos independentes e na análise realizada com os dados destes experimentos agrupados (SEIXAS et al., 2007). Porém, nenhuma proteção foi observada em experimentos utilizando LipL32 em vacinas de subunidade, mesmo com os adjuvantes de Freund e hidróxido de alumínio (BRANGER et al., 2005).

As proteínas da família Lig demonstraram os melhores resultados em experimentos de imunoproteção, principalmente LigA. Hamsters vacinados com a porção C terminal de LigA apresentaram taxas de 100% de proteção contra leptospirose (SILVA et al., 2007), enquanto LigB não protegeu.

1.7.2. Adjuvantes

A necessidade de uma vacina contra leptospirose mais efetiva e melhor definida do que as bacterinas levaram a vários estudos com proteínas de membrana externa de leptospiros patogênicas. Este tipo de vacina é uma alternativa atrativa principalmente porque são antígenos conservados entre vários sorovares e os avanços tecnológicos tornaram a obtenção destas proteínas fácil e rápida. Porém, o sucesso destes antígenos em uma vacina futura também depende de adjuvantes

potentes e não tóxicos (PIERRE et al., 2008). Vários adjuvantes novos estão em estudo, e vários deles demonstraram efeitos potencializantes de vacinas de subunidade.

1.7.2.1. LTB

A enterotoxina termolábil de *E. coli* (LT) e a toxina colérica de *Vibrio cholerae* (CT) são toxinas homólogas com propriedades imunomoduladoras que potencializam a imunogenicidade e eficácia protetora de outros antígenos. Ambas consistem de uma subunidade A tóxica com atividade de ADP-ribosiltransferase ligada a cinco subunidades B. O pentâmero de subunidade B da enterotoxina termolábil de *E. coli* (LTB) possui a característica de ligar-se ao receptor gangliosídeo GM1, expresso em todas as células de mamíferos. LTB retém as características imunoestimulatórias da LT (DA HORA et al., 2011), que estão relacionadas com esta ligação ao GM1 (NASHAR et al., 1996), e ainda é atóxica (WILLIAMS et al., 1999).

Diversos trabalhos têm explorado e descrito a atividade adjuvante de LTB fusionada (CHEN et al., 2009; FINGERUT et al., 2005; ZHOU et al., 2009) ou co-administrada (FINGERUT et al., 2006; ZHOU et al., 2009) com diferentes antígenos. Dentre os efeitos imunoestimuladores e imunomoduladores de LTB está a apresentação de antígenos a MHC I e MHC II (DE HAAN et al., 2002; NASHAR et al., 2001), a indução de expressão de marcadores de ativação de linfócitos B (YAMAMOTO et al., 2001; WILLIAMS et al., 1999), estimulação de populações de linfócitos T (SHIMIZU et al., 2005) e indução de ativação e maturação de células dendríticas (PITCOVSKI et al., 2006).

A LTB foi inicialmente estudada e utilizada como adjuvante de mucosa, mas trabalhos subsequentes comprovaram que as propriedades imunoestimuladoras estão igualmente presentes em imunizações sistêmicas. LTB mostrou ser um adjuvante seguro e atóxico, mesmo em populações humanas (DA HORA et al., 2011). Além disso, o seu homólogo CTB é estudado há décadas como vacina recombinante contra cólera. Os resultados promissores destes trabalhos levaram vários países a aprovar esta vacina para uso humano (HILL et al., 2006).

2. OBJETIVO

Avaliar o potencial da LipL32 de *L. interrogans* L1-130 recombinante co-administrada ou fusionada a LTB como antígenos vacinais contra leptospirose em hamsters.

2.1. Objetivos específicos

Fusionar os genes *ltb* e *lipL32*, expressar e purificar rLTB::LipL32, rLTB e rLipL32.

Caracterizar as proteínas recombinantes antigenicamente por *Western blot* e avaliar a habilidade de ligação destas proteínas ao gangliosídeo GM1.

Vacinar hamsters com os diferentes tratamentos e avaliar a resposta imune humoral.

Determinar o potencial imunoprotetor das vacinas experimentais através de desafio dos animais vacinados com cepa homóloga de *L. interrogans* patogênica.

3. HIPÓTESE

O antígeno LipL32 fusionado ou co-administrado à LTB protege hamsters contra leptospirose.

4. ARTIGO

PROTECTION AGAINST LETHAL LEPTOSPIROSIS ACHIEVED THROUGH VACCINATION WITH rLipL32 COUPLED OR CO-ADMINISTERED WITH rLTB

(Artigo formatado conforme as normas de edição do periódico *Vaccine*)

André A. Grassmann^a, Samuel R. Félix^a, Carolina X. dos Santos^a, Marta G. Amaral^a, Amilton C. P. Seixas Neto^a, Michel Q. Fagundes^a, Fabiana K. Seixas^a, Éverton F. da Silva^b, Fabricio R. Conceição^a, Odir A. Dellagostin^{a,*}

^aNúcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, and ^bFaculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

*Corresponding author: Odir A. Dellagostin, Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Caixa Postal 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil,

Tel.: +55 53 3275-7350, Fax: +55 53 3275-7551.

E-mail: odir@ufpel.edu.br

ABSTRACT

Leptospirosis, a worldwide zoonotic disease, lacks an effective, safe and cross protective vaccine. LipL32, the most abundant, immunogenic and conserved surface lipoprotein present in all pathogenic species of *Leptospira* is a promising candidate antigen, however, several studies have reported lack of protection when this protein is used as a subunit vaccine candidate. In an attempt to solve this issue, we use LipL32 fused to or co-delivered with the B subunit of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LTB) to enhance the immune response in the hamster model for leptospirosis. After homologous challenge with 5×LD₅₀ dose of *Leptospira interrogans* strain Fiocruz L1-130, animals vaccinated with rLipL32 co-administered with rLTB and rLTB::LipL32 had significantly higher survival rates ($p<0.05$) when compared to animals from the control groups. This is the first description of protective immune response afforded by a subunit vaccine using rLipL32, and represents an important contribution towards the development of improved leptospirosis vaccines.

Keywords: leptospirosis; subunit vaccine; LipL32; LTB; hamster; humoral immune response.

1. INTRODUCTION

Spirochetes from the genus *Leptospira* are the causative agents of leptospirosis, a zoonotic disease with worldwide distribution. Leptospirosis is recognized as an emerging infectious disease and affects humans, wild and domestic animals [1]. Leptospire colonize the proximal renal tubules of carrier animals [2] and are shed in the urine. The disease in humans is associated with direct or indirect contact with contaminated urine [1, 3]. The World Health Organization reports more than 500,000 cases of severe leptospirosis each year, especially in developing countries, with lethality rates of more than 10% [4]. Due to the impact in animal production and public health, and the severity of the disease, an efficient prophylactic measure is urgently needed. Current vaccines against leptospirosis are whole-cell preparations that produce only short-term immunity with adverse reactions due to both leptospiral lipopolysaccharide (LPS) and residual medium components [1]. Furthermore, the protection conveyed by these whole-cell preparations is serovar-specific, with limited or no cross-protection [5] between the more than 250 serovars of *Leptospira* reported [1]. Therefore, a protective multi-serovar vaccine against leptospirosis with no collateral effects remains a challenge.

Efforts to develop recombinant vaccines against leptospirosis have focused on outer membrane proteins (OMPs). The most abundant protein in the entire leptospiral proteome is the outer membrane lipoprotein of 32 kDa, LipL32 [6], accounting for 75% of the outer membrane proteome [7]. This protein can be considered a promising antigen for the development of a multi-serovar vaccine. LipL32 is expressed in all pathogenic *Leptospira* spp., it is conserved [8] and not expressed in the saprophytic *L. biflexa* [9]. This protein binds to extracellular matrix components as indicated by *in vitro* assays [10, 11] and crystal structure analysis [12]. Besides, LipL32 is expressed during mammalian leptospiral infection [13]. Different immunization strategies that have been tested with LipL32 have shown low efficacy in immune protection when administered in naked DNA [14], adenoviral [15] and *Mycobacterium bovis* BCG [16] delivery systems. However, LipL32 produced no protection in recombinant subunit protein vaccination, with both Freund and aluminum hydroxide adjuvants [14]. These findings suggest that immune protection induced by LipL32 is correlated with modulation of the immune system.

The *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT), and its closely related homologue *Vibrio cholerae* cholera toxin (CT), consists of one A subunit with ADP-

ribosyltransferase activity linked to five B subunits [17]. The B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LTB) is highly immunogenic upon systemic [18-20] and mucosal immunization [21, 22], its adjuvant activity has been demonstrated to unrelated antigens, both co-administered [18, 21] and linked by chemical conjugation or genetic fusion [20-22], exhibiting no toxic effect [17]. LTB has a pentameric structure that binds to ubiquitously expressed GM1 ganglioside receptors of the surface of mammalian cells and this binding is essential for adjuvant properties [23].

In the present study, we investigated the immune response induced by recombinant LipL32 co-administered or coupled to recombinant LTB. Hamsters were vaccinated with preparations of these proteins and challenged with a virulent strain of *Leptospira interrogans*. The immune protection, humoral immune responses and secondary parameters of the disease were monitored. Our findings reveal the protective potential of LipL32 and suggest a new vaccine against leptospirosis using LTB and LipL32.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. *Leptospira* culture

L. interrogans serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130 was cultivated in EMJH liquid medium (Difco Laboratories) at 29 °C. Procedures for maintenance of the culture and challenge experiments were conducted as previously described [24].

2.2. Cloning, expression and purification of recombinant proteins

Three recombinant vectors were used in this study. Two of them had been previously constructed, pAE//*ltb* [25] and pAE//*lipL32* [26], and one was generated as follows: the *lipL32* coding sequence from *L. interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130 was amplified by PCR from pAE//*lipL32*. The following primers were used in this reaction: LipL32-For 5' – GGGGTACCGGCGGCGGTGGTCTGCCAAGCCT and LipL32-Rev 5' – GGAATTCTTACTTAGTCGCGTCAGAAGC. After amplification, the 771 bp fragment was cut with *KpnI* and *EcoRI* restriction enzymes and cloned into pAE//*ltb* cut with the same enzymes. The *KpnI* restriction site was modified allowing the insertion of *lipL32* in the correct reading frame of 3' *ltb* coding sequence. The forward primer was constructed allowing a 4-aa linker/spacer between *ltb* and *lipL32* (Gly-Thr-Gly-Gly). The resulting pAE//*ltb::lipL32* plasmid was confirmed by PCR and restriction

digestion. The recombinant vectors pAE//tb, pAE//lipL32 and pAE//tb::lipL32 were used to transform *E. coli* BL21 Star™ (DE3) (Invitrogen). The transformants were cultured at 37 °C to mid log phase and expression of recombinant proteins was induced by 1 mM of isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). The cells were harvested by centrifugation, resuspended in purification buffer (100 mM Tris, 300 mM NaCl, 5 mM imidazole, 0.2% N-Lauroyl-Sarcosine for rLTB and rLTB::LipL32 only – pH 8.0) and disrupted by sonication. After centrifugation (10,000 × *g* for 45 min) the soluble fraction was loaded onto a Ni²⁺ charged Sepharose column. Attached recombinant 6×His tagged proteins were eluted by increasing concentrations of imidazole. The purity of recombinant proteins was confirmed in 15% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Purified proteins were dialyzed against phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) at 4 °C for 24 h and stored at -20 °C until use. The final protein concentration was determined by BCA Protein Assay (Pierce).

2.3. Characterization of recombinant proteins by Western blot and GM1-ELISA analysis

The Western blot characterization was conducted with 1D9 monoclonal antibody (Mab) anti-LipL32 [26], rabbit IgG anti-cholera toxin (Sigma-Aldrich) and sera from a human leptospirosis patient. After SDS-PAGE of rLTB, rLipL32, rLTB::LipL32 and controls, the proteins were electrotransferred to nitrocellulose membranes (GE Healthcare) in Tris Buffer (48 mM Tris, 39 mM glycine, 1.3 mM SDS, 20% methanol, pH 8.3). The membranes were incubated overnight with blocking buffer (PBS-T [phosphate buffer saline with 0.05% Tween 20], 5% of non-fat dry milk). After three washes with PBS-T, the reactions were incubated 1 h at room temperature with primary antibody: 1:5000 1D9 Mab anti-LipL32, 1:6000 rabbit IgG anti-cholera toxin, or 1:500 human convalescent sera. A further wash step was performed, followed by incubation of 1 h at room temperature with 1:6000 goat IgG anti-mouse Igs peroxidase conjugate, 1:6000 goat IgG anti-rabbit IgG peroxidase conjugate or 1:2000 rabbit IgG anti-human Igs peroxidase conjugate. After three final washes the reactions were revealed using diaminobenzidine (DAB) and hydrogen peroxide.

The ability of rLTB and rLTB::LipL32 to bind to GM1 ganglioside was determined by ELISA [25]. Polystyrene microtiter 96 well plates were coated with 100

ng/well of bovine GM1 monosialoganglioside (Sigma-Aldrich) diluted in carbonate–bicarbonate buffer (pH 9.6) at 4 °C overnight. The plates were blocked with blocking buffer (1% non-fat dry milk in PBS-T) and incubated with 100 ng/well of rLTB, rLipL32, rLTB::LipL32 or choleric toxin (Sigma-Aldrich) diluted in blocking buffer, in triplicate. The plates were incubated with 1:5000 1D9 Mab anti-LipL32 or 1:6000 rabbit IgG anti-cholera toxin for each protein, followed by 1:6000 goat IgG anti-mouse Igs peroxidase conjugate, 1:6000 goat IgG anti-rabbit IgG peroxidase conjugate, respectively. Between each step three washes with PBS-T were carried out. Each incubation was for 1 h at 37 °C. The reactions were revealed with O-phenylenediamine dihydrochloride and hydrogen peroxide. The optical densities at 492 nm were read using a plate reader (TP-reader Thermo Plate). Wells with GM1 but without proteins and wells without GM1 but with proteins were used as controls.

2.4. Animal immunization

Four to five week-old female Golden Syrian hamsters were individually identified and distributed in three treatment groups. Each treatment group was composed of five animals and three independent experiments were conducted, for a total of forty-five animals. Hamsters were inoculated in the quadriceps muscle with 60 µg of rLTB::LipL32 (group A), 16.5 µg of rLTB and 43.5 µg of rLipL32 (group B) and the control group received 16.5 µg of rLTB (group C). This dose design was to administer equal amounts of adjuvant and antigen in coupled and co-administered proteins. Each animal received two doses, administered at days 0 and 14. The animals were inoculated with a maximum of 300 µL per injection site. Two additional control groups of five animals were included in each of the three independent experiments. Similar to treatment groups, on days 0 and 14 one group was injected with 300 µL of PBS (negative control) and the other received homologous bacterin (10^8 cells in 300 µL of PBS). Serum samples were collected from each animal by phlebotomy of the retro-orbital venous plexus on the day before the first immunization (pre-immune) and on the day before challenge (post-immune). The animals were manipulated in accordance with the guidelines of the Federal University of Pelotas Ethics Committee in Animal Experimentation.

2.5. Antibody response determination by rLipL32 ELISA

For determination of humoral immune response induced by rLipL32 fused or co-administered with rLTB, the serum from each animal was serially diluted and tested in a recombinant LipL32 ELISA. Preliminary checkerboard analysis was performed to determine ideal antigen concentrations, primary and secondary antibody dilutions. Polystyrene microtiter plate were coated with 100 ng/well of rLipL32 diluted in carbonate–bicarbonate buffer (pH 9.6) at 4 °C overnight. After three washes with PBS-T, the serum from each animal, diluted 1:800 to 1:25600, was added in triplicate and incubated 1 h at 37 °C. Following three washes with PBS-T, the reactions were incubated 1 h at 37 °C with 1:3000 goat polyclonal anti-hamster Igs peroxidase conjugate. After five washes with PBS-T the assays were revealed with O-phenylenediamine dihydrochloride and hydrogen peroxide. The colour reaction was allowed to develop for 15 min and immediately stopped by adding 25 µL of 4 N H₂SO₄. The optical densities at 492 nm were read using a plate reader (TP-reader Thermo Plate).

2.6. Challenge of vaccinated animals

To determine vaccine protection, the same animals used in the serological analysis were challenged 21 days after the second dose. The animals received an intraperitoneal injection of 10² cells of *L. interrogans* Copenhageni strain Fiocruz L1-130 (5 × LD₅₀) [16]. The hamsters were observed daily for clinical signs of leptospirosis and for mortality. Survivors were euthanized 21 days post-challenge.

2.7. Statistical analysis

Statistical analyses in ELISA studies were carried out with Student's t-test. The Fisher exact test and log-rank sum test were used to determine significant differences for mortality and survival, respectively, among the experimental groups. *P* values <0.05 were considered to be indicative of statistical significance. All analyses were carried out in GraphPad Prism 4 software systems (GraphPad Software).

3. RESULTS

3.1. Heterologous expression of recombinant proteins

Construction of the recombinant vector carrying the fusion gene was successful. The *lipL32* coding sequence without its signal sequence was ligated to the 3'end of *ltb*. rLTB, rLipL32 and rLTB::LipL32 were expressed in *E. coli* BL21

Star™ (DE3) expression system. Purified recombinant proteins were analysed by SDS-PAGE (Fig. 1A). The apparent molecular mass was as expected for each protein: 13 kDa, 30 kDa and 41 kDa for rLTB, rLipL32 and rLTB::LipL32, respectively. The rLTB and rLTB::LipL32 were expressed as inclusion bodies and required addition of denaturing agent N-Lauroyl-sarcosine for purification. The yield of purified proteins varied from 3 to 10 mg per litre of culture. The pentameric form of rLTB was easily identified when the sample was not heated before SDS-PAGE (data not shown). Pentamerisation of rLTB::LipL32 (205 kDa) was not visualized.

3.2. Antigenic and functional characterization of purified proteins

Antigenic characterization of recombinant proteins was performed by Western blot analysis with specific antibodies for rLTB (Fig. 1B) and rLipL32 (Fig. 1C). The rLTB was recognised by the anti-CT antibody. This serum did not react with rLipL32. The 1D9 Mab, as well as human convalescent sera, reacted with rLipL32. As expected, the fusion protein was recognised by all tested antibodies. The negative control – *E. coli* extract – did not react with any antibody, and the positive control for human convalescent sera – whole-cell of *L. interrogans* – confirmed the identity of this reaction (Fig. 1D). These results show that the recombinant proteins retained antigenic epitopes present on natural proteins. Special note is directed to all positive reactions of rLTB::LipL32 leading to the conclusion that the fusion did not alter the original folding of LTB or LipL32. Furthermore, rLTB::LipL32 and rLipL32 were identified by positive human serum, indicating that the immune response induced by these proteins may recognise LipL32 on the leptospiral outer membrane.

For evaluating the biological activity of native LTB, the GM1-ELISA was performed with the recombinant proteins (Fig. 2) revealing a high GM1-binding affinity of rLTB and rLTB::LipL32. These proteins showed a binding affinity as high as that of commercial choleric toxin, while rLipL32 did not bind to GM1. The binding indication obtained for rLTB::LipL32 was the same when anti-LipL32 or anti-CT (which binds to LTB) were used, and is consistent with Western blot data. This result shows that the fusion did not impair LTB's binding affinity.

3.3. Humoral immune response in vaccinated hamsters

In order to assess whether rLipL32 coupled or co-administered with rLTB was able to promote IgG anti-LipL32 antibody response in hamsters, pre-immune and

post-immune sera from each animal were evaluated in an indirect ELISA with rLipL32 as the immobilized antigen. The mean absorbance for each serum of the experimental groups is shown in Fig. 3. The highest level of antibodies was observed in sera from animals receiving two doses of rLTB::LipL32. The titer of sera from this group was greater than 1:25600, significantly higher than any other ($p < 0.01$ at 1:25600). The co-administered treatment induced anti-LipL32 titers of up to 1:25600, with significant difference to pre-immune sera ($p = 0.03$ at 1:25600) and up to 1:12800 to adjuvant administration ($p = 0.02$ at 1:12800). Residual anti-LipL32 response was observed in animals which received rLTB, this is likely due to residue of the protein purification process present in both rLTB and rLipL32 used in the ELISA.

3.4. Leptospirosis protection

Golden Syrian hamsters were challenged 21 days after the second immunization with $5 \times LD_{50}$ of *L. interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130. During the subsequent 21 days, deaths and clinical signs of disease were monitored. Three independent experiments were accomplished and statistical analyses of lethality rates are shown in Table 1, while survival rates (which also considers days to death) are shown in Fig. 4. In the first experiment, three and two animals died in the rLTB::LipL32 and rLTB + rLipL32 groups, respectively. In subsequent experiments no death occurred in these groups. All animals receiving rLTB and PBS in experiment 1 died, while just two deaths in each subsequent experiment were registered with rLTB and two and four deaths with the PBS treatment in experiments 2 and 3, respectively. The survival analyses showed statistically significant results when any of the experimental groups (rLTB::LipL32 and rLTB + rLipL32) were compared to any of the control groups (PBS and rLTB) in the first experiment and in the grouped results. Furthermore, in the third experiment both experimental groups were statistically different from the PBS negative control group, however no statistically significant survival was observed in the second experiment. Regarding lethality, no significance was found in the statistical analysis for each experiment alone. rLipL32 co-administered with rLTB treatment protected 87% of the animals, statistically different from the 40% in the rLTB group ($p = 0.02$). The group receiving the fusion protein rLTB::LipL32 had a combined protection of 80%, statistically different from the PBS group ($P < 0.01$). When survival or lethality was considered, no difference was observed between rLTB and PBS groups. Similarly, no

difference could be attributed to rLTB + rLipL32, rLTB::LipL32 and bacterin groups among themselves.

4. DISCUSSION

Leptospirosis vaccines that provide protection against a broad serovar range have long been a necessity. The dawn of the recombinant vaccine age made the solution seem under way [5], nonetheless a truly effective vaccine is yet to be developed in order to retire old and ineffective bacterins. At present, the highest protection by a recombinant vaccine was observed with recombinant leptospiral immunoglobulin-like protein LigA [3, 27]. Nevertheless, after six full genome sequences, molecular studies of several strains [1, 3] and several vaccine trials [28, 29], LipL32 remains the most promising recombinant vaccine candidate. In this work we assessed the immunogenic properties of recombinant LipL32 in different subunit preparations using LTB as adjuvant. Furthermore, we reported for the first time significant protection afforded by LipL32 administered as a subunit vaccine.

What is the mechanism through which LipL32 induces a protective immune response against lethal leptospirosis? Answering such a question at this point is a difficult task. Contrary to expected, *lipl32* mutant *L. interrogans* did not alter either *in vitro* growth, adhesion to extracellular matrix, or acute and chronic leptospirosis in animal models [30]. Previous works attribute to LipL32 functions such as host laminin [10], collagen and fibronectin [11], and plasminogen [31] binding. Although there is a redundancy of function among many outer membrane proteins [1, 6], based on binding and vaccine experiments we believe that LipL32 is important to leptospiral cell attachment during leptospirosis. Our work supports vaccinal approaches using LipL32, showing protective immune response using only LipL32 as a leptospiral antigen.

Challenge studies are the most reliable assays to measure vaccine effectiveness [27]. LipL32 has been extensively studied, with promising results when using vaccine vectors or as naked DNA [14-16]. However, studies that used purified protein have thus far failed to produce significant protection either with Freund's adjuvant or aluminum hydroxide and QS21 saponin [14]. Our results show 87% and 80% survival of animals receiving LipL32 co-administered with or coupled to LTB adjuvant respectively, representing significant protection when compared to any of the control groups. A protective LipL32 subunit vaccine undermines prospective

studies that were being carried out when this target seemed ineffective [28]. Cross protection could be achieved with LipL32 [14, 32] and if it is obtained, this may very well replace existing bacterins. Protection may have occurred because LTB presents powerful immunostimulatory and immunomodulatory effects such as: enhancing antigen presentation via both major histocompatibility complexes [33, 34], activating selective differentiation of lymphocytes [17, 35], increasing the expression of activation markers on B lymphocytes [36], and influencing dendritic cells maturation and activation [37].

Several studies have described LTB adjuvant efficiency when fused [20-22] or co-administered [18, 22] with different antigens, on the other hand, few have compared these two delivery systems [22]. Our results show that the rLTB::LipL32 protein was capable of stimulating significantly higher antibody titers than the co-administration of rLTB and rLipL32 proteins. However, protection conferred by LipL32 fused to LTB was marginally lower (a single animal) than that obtained with co-administration. This is the first time LTB is used with leptospiral antigens and the first leptospirosis challenge study using fused proteins.

Furthermore LipL32 host interaction epitopes are distributed throughout its molecular surface [12, 38], and, although specific antibodies did recognize the protein, several important epitopes may have been hidden by the fusion. Likewise, LTB is active when pentamerised [23], however, with the pentamerised molecules on one portion, and LipL32 on the other, many of the active sites of the adjuvant may have been hidden. The use of a four amino acid linker between LTB and LipL32 may have contributed to conceal crucial portions of LTB and/or LipL32. A variable number of amino acids in spacer linkers between subunits in fusion proteins have been tested, and most published fusions were successful [22, 39]. In a recent study Chen and coworkers [20] reported that ten but not six amino acids in the flexible linker between LTB and the antigen were necessary to induce prolonged protection against the BCL1 lymphoma. A longer linker in LTB::LipL32 could allow higher protection against leptospirosis.

Challenge was carried out as previously described [16, 27], however there were a few surviving animals in the control group, which is usually low [16, 28] or inexistent [27] with *L. interrogans* strain L1-130. Even so, in all experiments the treatment groups (rLTB::LipL32 and rLTB + rLipL32) had more survivors than the control groups (LTB and PBS).

Another important finding in this study was the absence of correlation between antibody levels and protection. The animals vaccinated with rLTB::LipL32 had the highest antibody titers among all groups but not the highest survival rates. Furthermore, within the same groups, surviving animals did not necessarily have the highest antibody titer (data not shown). Seixas and coworkers [26] described subunit LipL32 as the best approach when compared to naked DNA and BCG vector vaccines based solely on antibody titers. However, BCG [16], DNA [14] and adenovirus [15] delivering LipL32 were capable of protecting, but subunit vaccine was not [14]. BCG, adenovirus and DNA delivery systems are effective cellular immunity stimulants [40-42], therefore not only humoral immunity but also cellular mediated immunity play an important role in protection against leptospirosis [43, 44].

In this study we described a leptospirosis vaccine using LTB as adjuvant and the first leptospirosis vaccine challenge study using fused proteins. We showed that LipL32 is highly immunogenic when co-administered or fused with LTB. We demonstrated that LipL32 protects hamsters from lethal leptospirosis when co-administered with or fused to LTB. This formulation may replace traditional vaccines. To this end, studies are being carried out to assess optimum dose, protection against other serovars and vaccine dynamics.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by CNPq (grant #475540/2008-5). AAG, SRF, ACPSN and MQF were supported by scholarships from CAPES. We are grateful to Michele dos Santos, Vilson Borba Pinto, Fabiane Chaves de Carvalho and Kátia R. Pimenta Cardoso for technical assistance.

5. References

- [1] Adler B, de la Pena Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. Vet Microbiol 2010;140(3-4):287-96.
- [2] Tucunduva de Faria M, Athanzio DA, Goncalves Ramos EA, Silva EF, Reis MG, Ko AI. Morphological alterations in the kidney of rats with natural and experimental *Leptospira* infection. J Comp Pathol 2007;137(4):231-8.
- [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(10):736-47.
- [4] World Health Organization, Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2003.
- [5] Wang Z, Jin L, Wegrzyn A. Leptospirosis vaccines. Microb Cell Fact 2007;6:39.
- [6] Malmstrom J, Beck M, Schmidt A, Lange V, Deutsch EW, Aebersold R. Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. Nature 2009;460(7256):762-5.
- [7] Cullen PA, Cordwell SJ, Bulach DM, Haake DA, Adler B. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. Infect Immun 2002;70(5):2311-8.
- [8] Haake DA, Suchard MA, Kelley MM, Dundoo M, Alt DP, Zuerner RL. Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. J Bacteriol 2004;186(9):2818-28.
- [9] Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, et al. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. PLoS One 2008;3(2):e1607.
- [10] Hoke DE, Egan S, Cullen PA, Adler B. LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of *Leptospira spp.* and *Pseudoalteromonas tunicata*. Infect Immun 2008;76(5):2063-9.
- [11] Hauk P, Macedo F, Romero EC, et al. 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 2008;76(6):2642-50.
- [12] Vivian JP, Beddoe T, McAlister AD, et al. Crystal structure of LipL32, the most abundant surface protein of pathogenic *Leptospira spp.* J Mol Biol 2009;387(5):1229-38.

- [13] Haake DA, Chao G, Zuerner RL, et al. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun* 2000;68(4):2276-85.
- [14] Branger C, Chatrenet B, Gauvrit A, et al. Protection against *Leptospira interrogans sensu lato* challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. *Infect Immun* 2005;73(7):4062-9.
- [15] Branger C, Sonrier C, Chatrenet B, et al. Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. *Infect Immun* 2001;69(11):6831-8.
- [16] Seixas FK, da Silva EF, Hartwig DD, et al. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. *Vaccine* 2007;26(1):88-95.
- [17] Williams NA, Hirst TR, Nashar TO. Immune modulation by the cholera-like enterotoxins: from adjuvant to therapeutic. *Immunol Today* 1999;20(2):95-101.
- [18] Fingerut E, Gutter B, Goldway M, Eliahoo D, Pitcovski J. B subunit of *E. coli* enterotoxin as adjuvant and carrier in oral and skin vaccination. *Vet Immunol Immunopathol* 2006;112(3-4):253-63.
- [19] da Silva Ramos Rocha A, Conceicao FR, Grassmann AA, Lagranha VL, Dellagostin OA. B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as adjuvant of humoral immune response in recombinant BCG vaccination. *Can J Microbiol* 2008;54(8):677-86.
- [20] Chen CG, Lu YT, Lin M, Savelyeva N, Stevenson FK, Zhu D. Amplification of immune responses against a DNA-delivered idiotypic lymphoma antigen by fusion to the B subunit of *E. coli* heat labile toxin. *Vaccine* 2009;27(32):4289-96.
- [21] Fingerut E, Gutter B, Meir R, Eliahoo D, Pitcovski J. Vaccine and adjuvant activity of recombinant subunit B of *E. coli* enterotoxin produced in yeast. *Vaccine* 2005;23(38):4685-96.
- [22] Zhou WY, Shi Y, Wu C, et al. Therapeutic efficacy of a multi-epitope vaccine against *Helicobacter pylori* infection in BALB/c mice model. *Vaccine* 2009;27(36):5013-9.
- [23] Nashar TO, Webb HM, Eaglestone S, Williams NA, Hirst TR. Potent immunogenicity of the B subunits of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin: receptor binding is essential and induces differential modulation of lymphocyte subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(1):226-30.

- [24] Silva EF, Santos CS, Athanazio DA, et al. Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in a hamster model. *Vaccine* 2008;26(31):3892-6.
- [25] Fischer G, Conceição FR, Leite FPL, Moraes, CM, Ferreira LN, Vilela CO, Caetano CF, Vargas GD, Hübner SO, Vidor T, Roehe PM. Recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit humoral adjuvant effect depends on dose and administration route. *World J Microbiol Biotechnol* 2010;26:489–95.
- [26] Seixas FK, Fernandes CH, Hartwig DD, Conceicao FR, Aleixo JA, Dellagostin OA. Evaluation of different ways of presenting LipL32 to the immune system with the aim of developing a recombinant vaccine against leptospirosis. *Can J Microbiol* 2007;53(4):472-9.
- [27] Silva EF, Medeiros MA, McBride AJ, et al. 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):6277-86.
- [28] Felix SR, Silva ÉF, Jouglard SDD, Hartmann DM, Grassmann AA, Dellagostin AO. Leptospirosis Vaccine: Search for Subunit Candidates. *Procedia in Vaccinology* 2009; 1: 110-4.
- [29] Chang YF, Chen CS, Palaniappan RU, et al. Immunogenicity of the recombinant leptospiral putative outer membrane proteins as vaccine candidates. *Vaccine* 2007;25(48):8190-7.
- [30] Murray GL, Srikram A, Hoke DE, et al. Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*. *Infect Immun* 2009;77(3):952-8.
- [31] Vieira ML, Atzingen MV, Oliveira TR, et al. *In vitro* identification of novel plasminogen-binding receptors of the pathogen *Leptospira interrogans*. *PLoS One* 2010;5(6):e11259.
- [32] Maneewatch S, Sakolvaree Y, Saengjaruk P, et al. Monoclonal antibodies to LipL32 protect against heterologous *Leptospira spp.* challenge. *Hybridoma (Larchmt)* 2008;27(6):453-65.
- [33] De Haan L, Hearn AR, Rivett AJ, Hirst TR. Enhanced delivery of exogenous peptides into the class I antigen processing and presentation pathway. *Infect Immun* 2002;70(6):3249-58.

- [34] Nashar TO, Betteridge ZE, Mitchell RN. Evidence for a role of ganglioside GM1 in antigen presentation: binding enhances presentation of *Escherichia coli* enterotoxin B subunit (EtxB) to CD4(+) T cells. *Int Immunol* 2001;13(4):541-51.
- [35] Yamamoto M, McGhee JR, Hagiwara Y, Otake S, Kiyono H. Genetically manipulated bacterial toxin as a new generation mucosal adjuvant. *Scand J Immunol* 2001;53(3):211-7.
- [36] Nashar TO, Hirst TR, Williams NA. Modulation of B-cell activation by the B subunit of *Escherichia coli* enterotoxin: receptor interaction up-regulates MHC class II, B7, CD40, CD25 and ICAM-1. *Immunology* 1997;91(4):572-8.
- [37] Pitcovski J, Bazak Z, Wasserman E, et al. Heat labile enterotoxin of *E. coli*: a potential adjuvant for transcutaneous cancer immunotherapy. *Vaccine* 2006;24(5):636-43.
- [38] Lottersberger J, Guerrero SA, Tonarelli GG, Frank R, Tarabla H, Vanasco NB. Epitope mapping of pathogenic *Leptospira* LipL32. *Lett Appl Microbiol* 2009;49(5):641-5.
- [39] Jagusztyn-Krynicka EK, Clark-Curtiss JE, Curtiss R, 3rd. *Escherichia coli* heat-labile toxin subunit B fusions with *Streptococcus sobrinus* antigens expressed by *Salmonella typhimurium* oral vaccine strains: importance of the linker for antigenicity and biological activities of the hybrid proteins. *Infect Immun* 1993;61(3):1004-15.
- [40] Bastos RG, Borsuk S, Seixas FK, Dellagostin OA. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG. *Vaccine* 2009;27(47):6495-503.
- [41] Lasaro MO, Ertl HC. New insights on adenovirus as vaccine vectors. *Mol Ther* 2009;17(8):1333-9.
- [42] Shirota H, Petrenko L, Hattori T, Klinman DM. Contribution of IRF-3 mediated IFN β production to DNA vaccine dependent cellular immune responses. *Vaccine* 2009;27(15):2144-9.
- [43] Naiman BM, Alt D, Bolin CA, Zuerner R, Baldwin CL. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and gammadelta T lymphocytes. *Infect Immun* 2001;69(12):7550-8.
- [44] Vernel-Pauillac F, Merien F. Proinflammatory and immunomodulatory cytokine mRNA time course profiles in hamsters infected with a virulent variant of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun* 2006;74(7):4172-9.

Table 1: Protection against lethal leptospirosis in hamsters conferred by the experimental treatments.

Treatment	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Total Surviving
rLTB::LipL32	2/5 (40%) ^{ab}	5/5 (100%) ^a	5/5 (100%) ^a	12/15 (80%) ^{AB}
rLTB + rLipL32	3/5 (60%) ^{ab}	5/5 (100%) ^a	5/5 (100%) ^a	13/15 (87%) ^A
rLTB	0/5 (0%) ^b	3/5 (60%) ^{ab}	3/5 (60%) ^{ab}	6/15 (40%) ^{BC}
Bacterin	5/5 (100%) ^a	5/5 (100%) ^a	5/5 (100%) ^a	15/15 (100%) ^A
Negative control	0/5 (0%) ^b	3/5 (60%) ^{ab}	1/5 (20%) ^b	4/15 (27%) ^C

Different letters represent statistical difference ($p < 0.05$). Upper case relates to grouped results only, lower case relates to individual experiments.

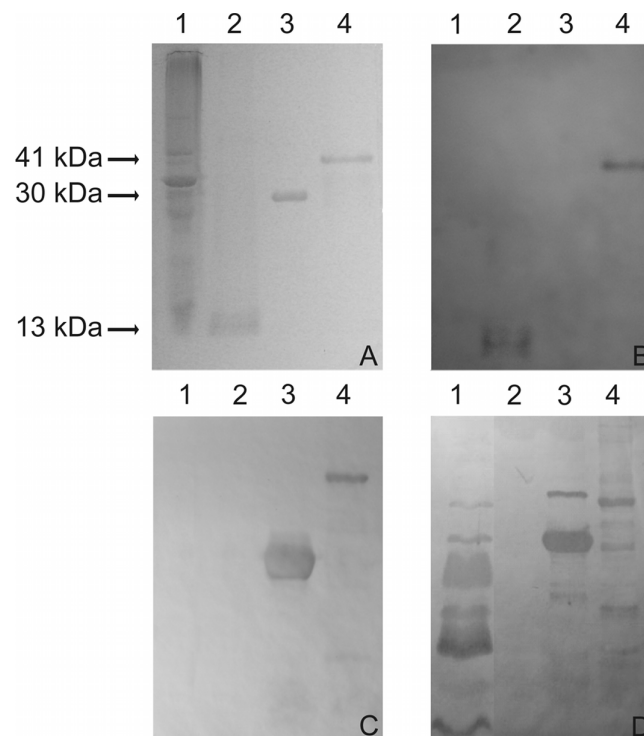


Fig. 1. Characterization of purified recombinant proteins. (A) SDS-PAGE analysis; (B) anti-LTB Western blot analysis; (C) anti-LipL32 Western blot analysis; (D) human convalescent sera Western blot analysis. Lanes in (A), (B) and (C) represent: 1- *E. coli* whole-cell extract; 2- rLTB; 3- rLipL32; 4- rLTB::LipL32. Lanes in (D) represent: 1- *L. interrogans* strain L1-130 whole-cell extract; 2- rLTB; 3- rLipL32; 4- rLTB::LipL32.

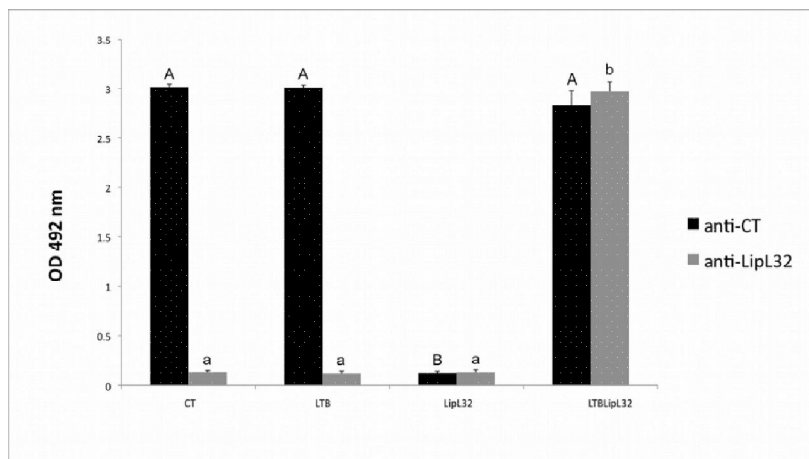


Fig. 2. Recombinant protein GM1 binding ELISA. Different letters represent statistical difference ($p < 0.05$). Upper case relates to anti-CT and lower case to anti-LipL32.

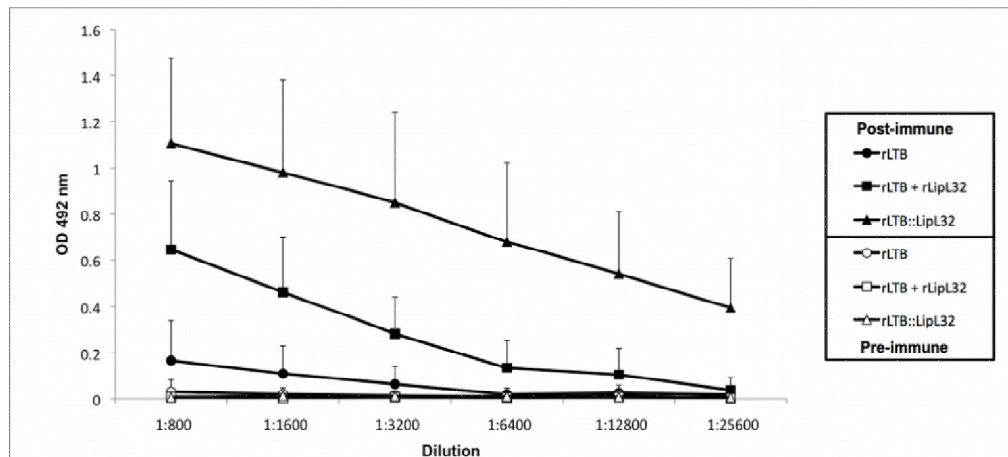


Fig. 3. Humoral immune response against rLipL32 examined by ELISA. Error bars represent standard deviation. Among the post-immune sera, statistically different results were obtained for rLTB::LipL32 regardless the dilution. rLTB + rLipL32 was statistically different from rLTB except at 1:25600. Both post-immune treatment groups were different from the pre-immune sera in all dilutions. rLTB post-immune was not different from the pre-immune except at 1:800.

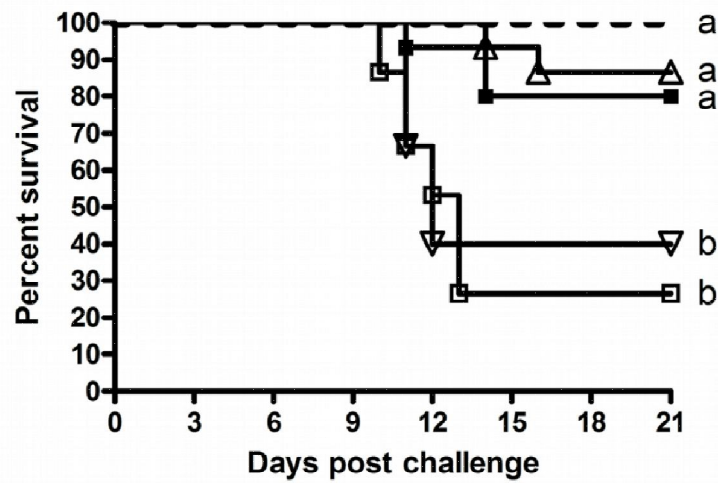


Fig. 4. Hamster survival timeline (grouped results of the three independent experiments). Different letters represent statistically different results ($p < 0.05$). Timelines represent groups: rLTB::LipL32 (■); rLTB + rLipL32 (△); rLTB (▽); Bacterin (---); Negative control (□). Statistical analyses and graph generation were carried out using GraphPad Prism 4 software systems (GraphPad Software).

5. CONCLUSÃO

Neste estudo demonstramos que as vacinas rLTB + rLipL32 e rLTB::LipL32 induzem resposta imune humoral com produção de anticorpos anti-LipL32 e protegem hamsters após desafio homólogo. Estas formulações são candidatas a substituir as bacterinas quase centenárias. Para isso, novos experimentos são necessários para avaliar doses, proteção cruzada e duração da resposta imune.

6. REFERENCIAS

- ADLER, B.; DE LA PENA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v.140, p.287-296, 2010.
- ADLER, B.; FAINE, S. A pomona serogroup-specific, agglutinating antigen in *Leptospira*, identified by monoclonal antibodies. **Pathology**, v.15, p.247-250, 1983.
- ATHANAZIO, D.A.; SILVA, E.F.; SANTOS, C.S.; ROCHA, G.M.; VANNIER-SANTOS, M.A.; MCBRIDE, A.J.; KO, A.I.; REIS, M.G. *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. **Acta Tropica**, v.105, p.176-180, 2008.
- BARBOSA, A.S.; ABREU, P.A.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAIS, Z.M.; GONCALES, A.P.; SILVA, A.S.; DAHA, M.R.; ISAAC, L. Immune evasion of leptospira species by acquisition of human complement regulator C4BP. **Infection and Immunity**, v.77, p.1137-1143, 2009.
- BAROCCHI, M. A.; KO, A.I.; REIS, M.G.; MCDONALD, K. L.; Riley, L.W. Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. **Infection and Immunity**, v.70, p.6926-6932, 2002.
- BOLIN, C.A. Diagnosis of leptospirosis: a reemerging disease of companion animals. **Seminars in Veterinary Medicine & Surgery (Small Animal)**, v.11, p.166-171, 1996.
- BOURHY, P.; LOUVEL, H.; SAINT GIRONS, I.; PICARDEAU, M. Random insertional mutagenesis of *Leptospira interrogans*, the agent of leptospirosis, using a mariner transposon. **Journal of Bacteriology**, v.187, p.3255-3258, 2005.
- BRANGER, C.; CHATRENET, B.; GAUVRIT, A.; AVIAT, F.; AUBERT, A.; BACH, J. M.; ANDRÉ-FONTAINE, G. Protection against *Leptospira interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. **Infection and Immunity**, v.73, n.7, p.4062-9, 2005.
- BRANGER, C.; SONRIER, C.; CHATRENET, B.; KLONJKOWSKI, B.; RUVOEN-CLOUET, N.; AUBERT, A.; ANDRE-FONTAINE, G.; ELOIT, M. Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. **Infection and Immunity**, v.69, n.6831-6838, 2001.
- BULACH, D.M.; ZUERNER, R.L.; WILSON, P.; SEEMANN, T.; MCGRATH, A.; CULLEN, P.A.; DAVIS, J.; JOHNSON, M.; KUCZEK, E.; ALT, D.P.; PETERSON-BURCH, B.; COPPEL, R.L.; ROOD, J.I.; DAVIES, J.K.; ADLER, B. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v.103, p.14560-14565, 2006.

- CERQUEIRA, G.M.; PICARDEAU, M. A century of *Leptospira* strain typing. **Infect Infection, Genetics and Evolution**, v.9, p.760-768, 2009.
- CHANG, Y. F.; CHEN, C. S.; PALANIAPPAN, R. U.; HE, H.; MCDONOUGH, S. P.; BARR, S. C.; YAN, W.; FAISAL, S. M.; PAN, M. J.; CHANG, C. F. Immunogenicity of the recombinant leptospiral putative outer membrane proteins as vaccine candidates. **Vaccine**, v.25, n.48, p.8190-7, 2007.
- CHEN, C.G.; LU, Y.T.; LIN, M.; SAVELYEVA, N.; STEVENSON, F.K.; ZHU, D. Amplification of immune responses against a DNA-delivered idiotype lymphoma antigen by fusion to the B subunit of *E. coli* heat labile toxin. **Vaccine**, v.27, n.32, p.4289-96, 2009.
- CHOY, H.A.; KELLEY, M.M.; CHEN, T.L.; MOLLER, A.K.; MATSUNAGA, J.; HAAKE, D.A. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. **Infection and Immunity**, v.75, p.2441-2450, 2007.
- CINCO, M.; BANFI, E. Activation of complement by leptospires and its bactericidal activity. **Zentralblatt Fuer Bakteriologie, Mikrobiologie Und Hygiene**, v.254, p.261-265, 1983.
- CRODA, J.; FIGUEIRA, C.P.; WUNDER JR, E.A.; SANTOS, C.S.; REIS, M.G.; KO, A.I.; PICARDEAU, M. Targeted mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species: disruption of the LigB gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. **Infection and Immunity**, v.76, p.5826-5833, 2008.
- CRODA, J.; RAMOS, J.G.; MATSUNAGA, J. A.; QUEIROZ, J.; HOMMA, A.; RILEY, L.W.; HAAKE, D.A.; REIS, M.G.; KO, A.I. *Leptospira* immunoglobulin-like proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.1528-1534, 2007.
- CULLEN, P. A.; CORDWELL, S. J.; BULACH, D. M.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* Serovar Lai. **Infection and Immunity**, v.70, n.5, p.2311-2318, 2002.
- CULLEN, P. A.; XU, X.; MATSUNAGA, J.; SANCHEZ, Y.; KO, A.I.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Surfaceome of *Leptospira* Spp. **Infection and Immunity**, v.73, p.4853-4863, 2005.
- DA HORA, V.P.; CONCEICAO, F.R.; DELLAGOSTIN, O.A.; DOOLAN, D.L. Non-toxic derivatives of LT as potent adjuvants. **Vaccine**, v.29, p.1538-1544, 2011.
- DE HAAN, L.; HEARN, A.R.; RIVETT, A.J.; HIRST, T.R. Enhanced delivery of exogenous peptides into the class I antigen processing and presentation pathway. **Infection and Immunity**, v.70, n.6, p.3249-58, 2002.
- FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. ***Leptospira* and leptospirosis**, 2nded, 1999, 272p.

- FINGERUT, E.; GUTTER, B.; GOLDWAY, M.; ELIAHOO, D.; PITCOVSKI, J. B subunit of *E. coli* enterotoxin as adjuvant and carrier in oral and skin vaccination. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.112, n.3-4, p.253-63, 2006.
- FINGERUT, E.; GUTTER, B.; MEIR, R.; ELIAHOO, D.; PITCOVSKI, J. Vaccine and adjuvant activity of recombinant subunit B of *E. coli* enterotoxin produced in yeast. **Vaccine**, v.23, n.38, p.4685-96, 2005.
- FRAGA, T.R.; CHURA-CHAMBI, R.M.; GONCALES, A.P.; MORAIS, Z.M.; VASCONCELLOS, S.A.; MORGANTI, L.; MARTINS, E.A. Refolding of the recombinant protein OmpA70 from *Leptospira interrogans* from inclusion bodies using high hydrostatic pressure and partial characterization of its immunological properties. **Journal of Biotechnology**, v.148, p.156-162, 2010.
- GIRONS, I.S.; BOURHY, P.; OTTONE, C.; PICARDEAU, M.; YELTON, D.; HENDRIX, R.W.; GLASER, P.; CHARON, N. The LE1 bacteriophage replicates as a plasmid within *Leptospira biflexa*: construction of an *L. biflexa*-*Escherichia coli* shuttle vector. **Journal of Bacteriology**, v.182, p.5700-5705, 2000.
- HAAKE, D.A.; CHAO, G.; ZUERNER, R. L.; BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; LEVETT, P. N.; BOLIN, C. A. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infection and Immunity**, v.68, p.2276-2285, 2000.
- HAAKE, D.A.; MAZEL, M. K.; MCCOY, A. M.; MILWARD, F.; CHAO, G.; MATSUNAGA, J.; WAGAR, E. A. Leptospiral Outer Membrane Proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. **Infection and Immunity**, v.67, n.6572-6582, 1999.
- HAAKE, D.A.; SUCHARD, M.A.; KELLEY, M.M., DUNDOO, M., ALT, D.P.; ZUERNER, R.L. Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. **Journal of Bacteriology**, v.186, n.9, p.2818-28, 2004.
- HAUK, P.; MACEDO, F.; ROMERO, E.C.; et al. In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. **Infection and Immunity**, v.76, n.6, p.2642-50, 2008.
- HOKE, D.E.; EGAN, S.; CULLEN, P.A.; ADLER, B. LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of *Leptospira spp.* and *Pseudoalteromonas tunicata*. **Infection and Immunity**, v.76, n.5, p.2063-9, 2008.
- JOST, B.H.; ADLER, B.; FAINE, S. Experimental immunisation of hamsters with lipopolysaccharide antigens of *Leptospira interrogans*. **Journal of Medical Microbiology**, v.29, p.115–120, 1989.
- JOST, B.H.; ADLER, B.; VINH, T.; FAINE, S. A monoclonal antibody reacting with a determinant on leptospiral lipopolysaccharide protects guinea pigs against leptospirosis. **Journal of Medical Microbiology**, v.22, p.269–275, 1986.

- KO, A.I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v.7, p.736-747, 2009.
- LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiological Review**, 14, 296-326, 2001.
- LI, S.; OJCIUS, D.M.; LIAO, S.; LI, L.; XUE, F.; DONG, H.; YAN, J. Replication or death: distinct fates of pathogenic *Leptospira* strain Lai within macrophages of human or mouse origin. **Innate Immunity**, v.16, p.80-92, 2010.
- LIAO, S.; SUN, A.; OJCIUS, D.M.; WU, S.; ZHAO, J.; YAN, J. Inactivation of the *fliY* gene encoding a flagellar motor switch protein attenuates mobility and virulence of *Leptospira interrogans* strain Lai. **BMC Microbiology**, v.9, p.253, 2009.
- LIU, Y.; ZHENG, W.; LI, L.; MAO, Y.; YAN, J. Pathogenesis of leptospirosis: interaction of *Leptospira interrogans* with in vitro cultured mammalian cells. **Medical Microbiology and Immunology**, v.196, p.233-239, 2007.
- MALMSTROM, J.; BECK, M.; SCHMIDT, A.; LANGE, V.; DEUTSCH, E.W.; AEBERSOLD, R. Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. **Nature**, v.460, n. 7256, p.762-5, 2009.
- MANEEWATCH, S.; SAKOLVAREE, Y.; SAENGJARUK, P.; et al. Monoclonal antibodies to LipL32 protect against heterologous *Leptospira spp.* challenge. **Hybridoma (Larchmt)**, v. 27, n.6, p.453-65, 2008.
- McBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G.; KO, A.I. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Disease**. 18, 376-386, 2005.
- MERIEN, F.; BARANTON, G.; PEROLAT, P. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. **Infection and Immunity**, v.65, p.729-738, 1997.
- MIDWINTER, A.; FAINE, S.; ADLER, B. Vaccination of mice with lipopolysaccharide (LPS) and LPS-derived immuno-conjugates from *Leptospira interrogans*. **Journal of Medical Microbiology**, v.33, p.199–204, 1990.
- MILLER, S.I.; ERNST, R.K.; BADER, M.W. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, p.36-46, 2005
- MURRAY, G.L.; MOREL, V.; CERQUEIRA, G.M.; CRODA, J.; SRIKRAM, A.; HENRY, R.; KO, A.I.; DELLAGOSTIN, O.A.; BULACH, D.M.; SERMSWAN, R.W.; ADLER, B.; PICARDEAU, M. Genome-wide transposon mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species. **Infection and Immunity**, v.77, p.810-816, 2009a.
- MURRAY, G.L.; SRIKRAM, A.; HENRY, R.; HARTSKEERL, R.A.; SERMSWAN, R.W.; ADLER, B. Mutations affecting *Leptospira interrogans* lipopolysaccharide attenuate virulence. **Molecular Microbiology**, v.78, p.701-709, 2010.

- MURRAY, G.L.; SRIKRAM, A.; HENRY, R.; PUAPAIROJ, A.; SERMSWAN, R.W.; ADLER, B. *Leptospira interrogans* requires heme oxygenase for disease pathogenesis. **Microbes and Infection**, v.11, p.311-314, 2009b.
- MURRAY, G.L.; SRIKRAM, A.; HOKE, D.E.; WUNDER JR., E.A.; HENRY, R.; LO, M.; ZHANG, K.; SERMSWAN, R.W.; KO, A.I.; ADLER, B. Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*. **Infection and Immunity**, v.77, p.952-958, 2009c.
- NAIMAN, B. M.; ALT, D.; BOLIN, C. A.; ZUERNER, R.; BALDWIN, C. L. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and gammadelta T lymphocytes. **Infection and Immunity**, 69, 7550–8, 2001.
- NAIMAN, B.M.; BLUMERMAN, S.; ALT, D.; et al. Evaluation of type 1 immune response in naïve and vaccinated animals following challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo: involvement of WC1(+) gammadelta and CD4 T cells. **Infection and Immunity**, v.70, n.11, p.6147-57, 2002.
- NASCIMENTO, A.L.T.O.; KO, A.I.; MARTINS, E.A.L.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; HO, P.L.; HAAKE, D.A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; HARTSKEERL, R.A.; MARQUES, M.V.; OLIVEIRA, M.C.; MENCK, C.F. M.; LEITE, L.C.C.; CARRER, H.; COUTINHO, L.L.; DEGRAVE, W.M.; DELLAGOSTIN, O.A.; EL DORRY, H.; FERRO, E.S.; FERRO, M.I.T.; FURLAN, L.R.; GAMBERINI, M.; GIGLIOTI, E.A.; GOES-NETO, A.; GOLDMAN, G.H.; GOLDMAN, M.H.S.; HARAKAVA, R.; JERONIMO, S.M.B.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.M.; KIMURA, E.T.; KURAMAE, E.E.; LEMOS, E.G.M.; LEMOS, M.V.F.; MARINO, C.L.; NUNES, L.R.; DE OLIVEIRA, R.C.; PEREIRA, G.G.; REIS, M.S.; SCHRIEFER, A.; SIQUEIRA, W.J.; SOMMER, P.; TSAI, S.M.; SIMPSON, A.J.G.; FERRO, J.A.; CAMARGO, L.E.A.; KITAJIMA, J.P.; SETUBAL, J.C.; VAN SLUYS, M.A. Comparative Genomics of Two *Leptospira interrogans* Serovars Reveals Novel Insights into Physiology and Pathogenesis. **Journal of Bacteriology**, v.186, p.2164-2172, 2004.
- NASHAR, T. O.; WEBB, H. M.; EAGLESTONE, S.; WILLIAMS, N. A.; HIRST, T. R. Potent immunogenicity of the B subunits of Escherichia coli heat-labile enterotoxin: receptor binding is essential and induces differential modulation of lymphocyte subsets. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v.93, v.1, p.226-30, 1996.
- PERRIE, Y.; MOHAMMED, A.R.; KIRBY, D.J.; MCNEIL, S.E.; BRAMWELL, V.W. Vaccine adjuvant systems: enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. **International Journal of Pharmacology**, v.364, p.272-280, 2008.
- PICARDEAU, M.; BULACH, D. M.; BOUCHIER, C.; ZUERNER, R. L.; ZIDANE, N.; WILSON, P. J.; CRENO, S.; KUCZEK, E. S.; BOMMEZZADRI, S.; DAVIS, J. C.; MCGRATH, A.; JOHNSON, M. J.; BOURSAUX-EUDE, C.; SEEMANN, T.; ROUY, Z.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; LAJUS, A.; DAVIES, J. K.; MÉDIGUE, C.; ADLER, B. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. **PLoS One**, v.3, p.1607-15, 2008.

- QUE-GEWIRTH, N.L.S.; RIBEIRO, A.A.; KALB, S.R.; COTTER, R.J.; BULACH, D.M.; ADLER, B.; GIRON, I.S.; WERTS, C.; RAETZ, C.R.H. A methylated phosphate group and four amide-linked acyl chains in *Leptospira interrogans* Lipid A: The membrane anchor of an unusual lipopolysaccharide that activates TLR2. **Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.25420–25429, 2004.
- REN, S. X.; GANG, F.; 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.; QIAN, B. Q.; XIA, Q. C.; GUO, X. K.; DANCHIN, A.; SAINT GIRON, I.; SOMERVILLE, R. L.; WEN, Y. M.; SHI, M. H.; CHEN, Z.; XU, J. G.; ZHAO, G. P. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. **Nature**, v.422, p.888-893, 2003.
- RISTOW, P.; BOURHY, P.; DA CRUZ MCBRIDE, F.W.; FIGUEIRA, C.P.; HUERRE, M.; AVE, P.; GIRON, I.S.; KO, A.I.; PICARDEAU, M. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. **PLoS Pathogens**, v.3, p.97, 2007.
- RISTOW, P.; BOURHY, P.; KERNEIS, S.; SCHMITT, C.; PREVOST, M.C.; LILENBAUM, W.; PICARDEAU, M. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. **Microbiology**, v.154, p.1309-1317, 2008.
- SEIXAS, F. K.; DA SILVA, E. F.; HARTWIG, D. D.; CERQUEIRA, G. M.; AMARAL, M.; FAGUNDES, M. Q.; DOSSA, R. G.; DELLAGOSTIN, O. A. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. **Vaccine**, v.26, n.1, p.88-95, 2007.
- SHIMIZU, T.; SASAKI, K.; KATO, M.; ARIMITSU, H.; OCHI, S.; SHIGEMORI, N.; WASITO, E.B.; YOKOCHI, T.; Tsuji, T. Induction of thymus-derived gamma delta T Cells by *Escherichia coli* enterotoxin b subunit in peritoneal cavities of mice. **Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology**, v.12, p.157-164, 2005.
- 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. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, v.25, n.33, p.6277-86, 2007.
- STEVENSON, B.; CHOY, H.A.; PINNE, M.; ROTONDI, M.L.; MILLER, M.C.; DEMOLL, E.; KRAICZY, P.; COOLEY, A.E.; CREAMER, T.P.; SUCHARD, M.A.; BRISSETTE, C.A.; VERMA, A.; HAAKE, D.A. *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. **PLoS One**, v.2, p.e1188, 2007.
- TRUEBA, G.; ZAPATA, S.; MADRID, K.; CULLEN, P.; HAAKE, D. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. **Intentional Microbiology**, v.7, p.35-40, 2004.
- TUERO, I.; VINETZ, J.M.; KLIMPEL, G.R. Lack of demonstrable memory T cell responses in humans who have spontaneously recovered from leptospirosis in

- the Peruvian Amazon. **Journal of Infectious Diseases**, v.201, n. 3, p.420-7, 2010.
- TULSIANI, S.M.; CRAIG, S.B.; GRAHAM, G.C.; COBBOLD, R.; SMYTHE, L. Attenuation in *Leptospira* strain collections. **Veterinary Microbiology**, 2010.
- VIEIRA, M.L.; ATZINGEN, M.V.; OLIVEIRA, T.R.; et al. *In vitro* identification of novel plasminogen-binding receptors of the pathogen *Leptospira interrogans*. **PLoS One**, v.5, n.6, p. e11259, 2010.
- ZHOU, W.Y.; SHI, Y.; WU, C.; et al. Therapeutic efficacy of a multi-epitope vaccine against *Helicobacter pylori* infection in BALB/c mice model. **Vaccine**, v.27, n.36, p.5013-9, 2009.
- WERTS, C.; TAPPING, R.I.; MATHISON, J.C.; CHUANG, T.H.; KRAVCHENKO, V.; SAINT GIRONS, I.; HAAKE, D.A.; GODOWSKI, P.J.; HAYASHI, F.; OZINSKY, A.; UNDERHILL, D.M.; KIRSCHNING, C.J.; WAGNER, H.; ADEREM, A.; TOBIAS, P.S.; ULEVITCH, R.J. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. **Nature Immunology**, v.2, p.346-352, 2001.
- WILLIAMS, N.A.; HIRST, T.R.; NASHAR, T.O. Immune modulation by the cholera-like enterotoxins: from adjuvant to therapeutic. **Immunology Today**, v.20, n.2, p.95-101, 1999.