

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Vacinologia reversa e estrutural: Identificação da  
localização celular de alvos vacinais contra  
leptospirose**

**Jéssica Dias Souza**

Pelotas, 2017

**Jéssica Dias Souza**

**Vacinologia reversa e estrutural: Identificação da localização celular de alvos  
vacinais contra leptospirose**

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

**Orientador:** Dr. Alan John Alexander McBride  
**Coorientador:** Dr. André Alex Grassmann

Pelotas, 2017

S719v Souza, Jéssica Dias

Vacinologia reversa e estrutural : identificação da localização celular de alvos vacinais contra leptospirose / Jéssica Dias Souza ; Alan John Alexander McBride, orientador ; André Alex Grassmann, coorientador. — Pelotas, 2017.

87 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Imunofluorescência. 2. Leptospira. 3. Vacinas recombinantes. 4. Proteínas de membrana. 5. Proteínas expostas na superfície. I. McBride, Alan John Alexander, orient. II. Grassmann, André Alex, coorient. III. Título.

CDD : 614.56

## BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Sergio Varela Junior (Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Ciências Biológicas)

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico)

Prof. Dr. Fabrício Rochedo Conceição (Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico)

Prof. Dr. Alan John Alexander McBride (Orientador, Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico)

Para meus pais, minha avó e irmãos, com carinho e gratidão.

Dedico.

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, irmão e avó, por sempre me incentivarem e me apoiarem a seguir meus sonhos. A minha pequena irmã, que possui poucos meses, mas que me traz imensa alegria pelo simples fato de existir.

Ao professor Alan, pela orientação, ensinamentos, pela confiança depositada em mim e pela amizade.

Ao André, que sempre esteve ao meu lado, e em momento algum me deixou faltar apoio e orientação. Obrigado por acreditar em mim, pela paciência, e por compartilhar comigo este momento.

Aos queridos colegas e amigos do LPDI e biotecnologia, Liana, Gabriana, Vitor, Matheus, Marcelle, Carol, Neida, Mara, Amanda, Tom e Carlos, por todo auxilio e bons momentos durante esses anos.

Aos professores da biotecnologia, por todos os ensinamentos que aprendi com vocês. Ao professor Antonio Sergio por todo o conhecimento passado a mim, essencial ao meu trabalho.

Aos funcionários e amigos da biotecnologia, e Biotério, Anelize, Cristina, Patrícia e Sandra, por tornarem tudo mais fácil.

A todos que de alguma forma contribuíram para que este momento chegasse.

Muito obrigada!

## Resumo

SOUZA, Jéssica Dias. **Vacinologia reversa e estrutural: Identificação da localização celular de alvos vacinais contra leptospirose.** 2017. 87f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A leptospirose é uma doença tropical negligenciada que acomete mais de 1 milhão de pessoas em todo o mundo a cada ano, com cerca de 60 mil óbitos. Ela é causada por espiroquetas do gênero *Leptospira*. A única vacina disponível para o controle da doença é uma bacterina, que apesar de protetora e usada mundialmente para animais, apresenta diversos efeitos adversos, imunidade de curta duração e restrita aos sorovares que compõem a formulação. Há uma necessidade de desenvolvimento de uma nova vacina contra a leptospirose capaz de conter o avanço da doença. Neste trabalho, uma nova abordagem é apresentada para descoberta de novos alvos vacinais, baseada na vacinologia reversa e estrutural. O objetivo deste trabalho foi a confirmação da localização de possíveis alvos vacinais na superfície celular de *L. interrogans* através do estabelecimento de uma nova técnica *in vitro*. Ao total, foram identificadas 18 proteínas de membrana externa com conformação de barril-β transmembrana, preditas como contendo epítópos imunogênicos e presentes nas *Leptospira* spp. infecciosas. Destas, nove proteínas foram produzidas através de expressão heteróloga em *Escherichia coli* e utilizadas para gerar anticorpos policlonais. Os anticorpos foram caracterizados e utilizados para avaliar a localização das proteínas nativas correspondentes pela técnica de imunofluorescência de superfície. Esta técnica confirmou que LIC10881 é uma proteína barril-β transmembrana exposta na superfície de *L. interrogans*. Todavia, a mesma abordagem sugeriu erroneamente a proteína flagelar FcpA como exposta na superfície da bactéria. A técnica de aprisionamento de espiroquetas em esferas de agarose de baixo ponto de fusão foi adaptada e aplicada de forma inovadora para *L. interrogans*. Esta técnica confirmou que as lipoproteínas LigB, LipL32 e LcpA estão expostas na superfície das leptospiras patogênicas. Esta técnica é promissora para determinar a localização de proteínas na superfície celular de *L. interrogans*, porém ainda carece de maior comprovação experimental.

**Palavras-chave:** Imunofluorescência, *Leptospira*, vacinas recombinantes, Proteínas de membrana, Proteínas expostas na superfície.

## **Abstract**

SOUZA, Jéssica Dias. **Reverse and structural vaccinology: Identification of leptospirosis vaccine targets exposed on cell surface.** 2017. 87f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Leptospirosis is a neglected tropical disease responsible for more than 1 million cases worldwide every year and approximately 60,000 deaths. Spirochetes belonging to the *Leptospira* genus are the causative agent of leptospirosis. The only vaccine available for disease control is a bacterin that, while protective and extensively used in animals, induces a short-term, serovar restricted, immune response and causes adverse side-effects. There is a need for the development of a new leptospirosis vaccine to control the spread of this disease. In the present work, an innovative approach for vaccine target discovery based on reverse and structural vaccinology is presented. The objective of the current work was to confirm the localization of potential vaccine candidates on the *L. interrogans* cell surface through the development of a new in vitro technique. Eighteen outer membrane proteins with a β-barrel transmembrane structure were identified and predicted to contain immunogenic epitopes. These proteins were conserved among the infectious *Leptospira* spp. Nine proteins were expressed in *Escherichia coli* and used to produce polyclonal antibodies. Following characterization, the antibodies were used to evaluate the localization of the corresponding native proteins using a surface immunofluorescence assay. This assay confirmed that LIC10881 is an *L. interrogans* surface-exposed β-barrel transmembrane protein. However, the same approach erroneously suggested the flagellar protein FcpA as a surface-exposed outer membrane protein. The approach based on the encapsulation of spirochetes in low melting point agarose microdroplets was adapted to *L. interrogans*. This assay confirmed that the lipoproteins LigB, LipL32 and LcpA are exposed on the bacterial surface. This is promising approach for the experimental demonstration of surface protein localization in *L. interrogans*, however it still requires further experimental evaluation.

**Keywords:** Immunofluorescence, *Leptospira*, Recombinant vaccines, Outer membrane proteins, Surface-exposed proteins.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Árvore filogenética de Leptospiraceae .....	20
<b>Figura 2.</b> Ciclo de transmissão de leptospiras patogênicas.....	25
<b>Figura 3.</b> Esquema representativo dos componentes da membrana de leptospiras. .....	36
<b>Figura 4.</b> Fluxograma das análises <i>in silico</i> .....	46
<b>Figura 5.</b> SDS-PAGE: Expressão de proteínas recombinantes .....	55
<b>Figura 6.</b> <i>Western blotting:</i> reconhecimento das proteínas recombinantes pelo anticorpo anti-histidina .....	56
<b>Figura 7.</b> <i>Western blotting:</i> reconhecimento das proteínas recombinantes pelos seus respectivos pAbs .....	57
<b>Figura 8.</b> SDS-PAGE: Extrato bruto de <i>L. interrogans</i> L1-130.....	58
<b>Figura 9.</b> <i>Western blotting:</i> reconhecimento das proteínas nativas pelos seus respectivos pAbs .....	58
<b>Figura 10.</b> Imunofluorescência de leptospiras fixadas por metanol .....	61
<b>Figura 11.</b> Imunofluorescência leptospiras fixadas por metanol – visão do campo ..	61
<b>Figura 12.</b> Imunofluorescência de superfície .....	63
<b>Figura 13.</b> Imunofluorescência em esferas de ABPF .....	64

## **Lista de Tabelas**

<b>Tabela 1.</b> Anotação funcional das 18 b $\beta$ -OMPs preditas por bioinformática.....	54
<b>Tabela 2.</b> Análise geral das proteínas e anticorpos .....	59

## **Lista de Abreviaturas**

- 2D-DIGE – Two-Dimensional Differential Gel Electrophoresis (Expressão Diferencial em Eletroforese em Gel Bidimensional)
- ABPF – Agarose em Baixo Ponto de Fusão
- AMP – Ampicilina
- b $\beta$ -OMP –  $\beta$ -barrel Outer Membrane Protein (Proteína barril- $\beta$  de Membrana Externa)
- BAL – Bronchoalveolar Lavage (Lavagem Brônquio-alveolar)
- BCA – Bicinchoninic Acid (Ácido Bicinconílico)
- BSA – Bovine Serum Albumin (Albumina Sérica Bovina)
- CAM – Complexo de Ataque à Membrana
- CJ – Via Conjuntival
- DAB – 3,3' diaminobenzidina
- DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
- DE – Diferencialmente Expressos
- DMC – Dialysis Membrane Chamber (Câmara de Membrana de Diálise)
- DMSO – Dimethyl Sulfoxide (Dimetilsulfóxido)
- EMJH – Meio Ellinghausen-McCullough modificado por Johnson-Harris
- EP – Via Epicutânea
- FcpA – *Flagellar coiling protein A*
- FB – Fator B
- FH – Fator H
- FHL-1 – Factor H-Like protein 1 (Proteína Semelhante ao Fator H)
- FHR-1 – Factor H-Related protein 1 (Proteína 1 Relacionada ao Fator H)
- FI – Fator I
- FITC – Fluorescein isothiocyanate
- HRP – Horseradish Peroxidase
- ID – Via Intradermal
- IF – Imunofluorescência
- IMAC – Immobilized Metal Affinity Chromatography (Cromatografia de Afinidade de Metal Imobilizado)
- iNOS – inducible Nitric Oxide Synthase (Óxido Nítrico-Sintase Induzível)

IP – Via Intraperitoneal

IPTG – Isopropil  $\beta$ -D-tiogalactosídeo

LB – Meio Luria-Bertani

Lig – *Leptospiral Immunoglobulin-like*

LPS – Lipopolissacarídeo

mAb – Monoclonal Antibody (Anticorpo Monoclonal)

MC – Via Mucosal

ME – Membrana Externa

MHCII – Major Hiscompatibility Complex II (Complexo de Histocompatibilidade Principal de Classe II)

MI – Membrana Interna

MPT – Modificações Pós-Tradicionalis

NETs – Neutrophil Extracellular Traps (Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos)

NO – Nitric Oxide (Óxido Nítrico)

OC – Via Ocular

pAb – Polyclonal Antibody (Anticorpo Polyclonal)

PAMPs – Pathogen Associated Molecular Pattern (Padrões moleculares Associados a Patógenos)

PBS – Phosphate-Buffered Saline (Tampão Fosfato-Salino)

PBS-T – PBS + Tween

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

pK – Proteinase K

PM – Peso Molecular

PMSF – PhenylMethylSulfonyl Fluoride

PS – Peptídeo Sinal

ROS – Reactive Species of Oxygen (Espécies Reativas de Oxigênio)

RBH – Reciprocal Best Hit (Melhor Hit Recíproco)

SC – Via Subcutânea

SDS-PAGE – Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (Eletroforese em Gel de PoliAcrilamida)

SHPAL – Síndrome Hemorrágica Pulmonar Associadas a Leptospirose

TBDR – TonB-dependent receptor (Receptor Dependente de TonB)

TLR – *Toll-like receptor* (Receptores do tipo Toll)

VA – Via Alternativa

VC – Via Clássica

VE – Vacinologia Estrutural

VL – Via da Lectina

VR – Vacinologia Reversa

WB – Western Blotting

## Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL .....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	188
2.1 Leptospirose: a zoonose mais abrangente no mundo.....	188
2.2 <i>Leptospira</i> : o agente etiológico da Leptospirose .....	199
2.3 A Transmissão e o ciclo do patógeno .....	233
2.4 Hospedeiros carreadores da doença e a leptospirose animal .....	255
2.5 Entrada e disseminação das leptospiras no organismo hospedeiro .....	277
2.6 Mecanismos de evasão da resposta imune .....	299
2.7 Vias e modelos animais utilizados para avaliar a doença .....	3232
2.8 Prevenção da doença: vacinas já desenvolvidas e testadas .....	333
2.9 O alvo da Vacinologia Reversa: a membrana externa .....	366
2.10 Determinação <i>in vitro</i> da localização de proteínas em espiroquetas .....	388
3 OBJETIVOS .....	422
3.1 Objetivo Geral .....	422
3.2 Objetivos Específicos .....	422
4 MATERIAL e MÉTODOS .....	433
4.1 Condições de cultivo de <i>Leptospira interrogans</i> e <i>Escherichia coli</i> .....	433
4.2 Modelos animais e considerações éticas .....	43
4.3 Cultivo de <i>L. interrogans</i> em Câmara de Membrana de Diálise .....	444
4.4 Análise <i>in silico</i> do proteoma de <i>L. interrogans</i> .....	444
4.5 Amplificação e clonagem das sequencias codificadoras .....	466
4.6 Expressão, purificação e caracterização das proteínas recombinantes.....	477
4.7 Produção de anticorpos policlonais contra as proteínas preditas como localizadas na membrana externa de <i>L. interrogans</i> .....	499
4.8 Caracterização dos PAbs por <i>Western Blotting</i> .....	499

4.9 Imunofluorescência em <i>L. interrogans</i> fixada por metanol.....	50
4.10 Imunofluorescência de superfície.....	50
4.11 Imunofluorescência em microesferas de agarose.....	51
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>533</b>
5.1 Identificação <i>in silico</i> de alvos vacinais contra leptospirose .....	533
5.2 Clonagem e expressão de proteína recombinantes.....	555
5.3 Obtenção e caracterização dos anticorpos policlonais .....	60
5.5 Avaliação da localização de proteínas de membrana externa por IF de superfície .....	60
5.6 Padronização do encapsulamento de leptospiras em esferas de agarose de baixo ponto de fusão para determinação da localização de proteínas expostas na superfície da bactéria.....	622
<b>6 DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>655</b>
<b>7 CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>722</b>
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>73</b>
<b>9 ANEXOS .....</b>	<b>85</b>
9.1 Anexo I: Artigo publicado .....	85
9.2 Anexo II: Artigo publicado .....	86
9.3 Anexo III: Artigo publicado .....	87

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial que acomete grande parte dos mamíferos (Dietrich et al., 2015, Ellis, 2015). É uma doença negligenciada que está relacionada principalmente com países subdesenvolvidos e de climas tropicais, afetando especialmente populações rurais e moradores de favelas (Maciel et al., 2008, Reis et al., 2008, Felzemburgh et al., 2014). Os sintomas clínicos apresentados durante a doença podem variar de uma leve doença febril, até complicações sistêmicas potencialmente fatais, como a Doença de Weil e Síndrome Hemorrágica Pulmonar Associadas a Leptospirose (SHPAL) (Ko et al., 2009). Durante a forma leve da doença, os sintomas são facilmente confundidos com os de outras doenças como malária e dengue, subestimando ainda mais o número de casos acometidos pela doença (Ko et al., 2009, Costa et al., 2015). A taxa de mortalidade nos casos de Doença de Weil e SHPAL chega a 10% e 70%, respectivamente (McBride et al., 2005). Cerca de 1,03 milhões de casos são estimados por ano no mundo e destes, cerca de 58.900 casos resultam em morte por leptospirose. Esta zoonose também é um problema de saúde veterinária, causando perdas na produtividade e consequentemente grande impacto econômico (Ellis, 2015).

O agente etiológico da leptospirose são espiroquetas do gênero *Leptospira* (Faine et al., 1999). As leptospiras são bactérias espiraladas, com 0,15 µm de diâmetro e comprimento de 10-20 µm. *Leptospira* abrange ao total 22 espécies, sendo 15 espécies infecciosas (10 patogênicas e 5 intermediárias) e 7 saprófitas (Picardeau, 2017). *Leptospira* é um grupo de bactérias didermes, tais como as Gram-negativas, compostas por duas membranas e um espaço periplasmático entre elas, com dois flagelos periplasmáticos, cada um ancorado em uma extremidade da bactéria (Cameron, 2015). O gênero também possui classificação sorológica baseada na estrutura do antígeno O do lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana externa (ME) (Levett, 1999, Bharti et al., 2003). Sorovares antigenicamente relacionados são agrupados em sorogrupo (Faine et al., 1999).

As leptospiras são transmitidas principalmente pelo contato do hospedeiro em potencial com água e solo contaminados pela urina de animais infectados (Mwachui et al., 2015). As primeiras barreiras de defesa do hospedeiro contra as leptospiras são as barreiras da pele, muco e saliva (Asoh et al., 2014), sendo assim, as bactérias penetram no organismo por rupturas na pele e membranas mucosas. A motilidade das

leptospiras (movimento semelhante ao de um saca rolha) permite que elas se movam mais rapidamente em meios viscosos (como tecidos conectivos em hospedeiros) do que meios líquidos (Charon et al., 1992). Após atravessar a principal barreira do hospedeiro, as bactérias se dispersam pela corrente sanguínea até atingir diferentes órgãos (Wunder et al., 2016b). Leptospiras colonizam principalmente os túbulos proximais dos rins, por onde serão excretadas no ambiente através da urina (Andre-Fontaine et al., 2015), dando continuidade ao ciclo do patógeno. Apesar desse mecanismo de invasão estar relativamente bem descrito, a via utilizada para inoculação de leptospiras e estabelecimento de infecção em modelos animais segue sendo via intraperitoneal na grande maioria dos experimentos (Coutinho et al., 2014).

Como forma de prevenir a doença, somente vacinas compostas de bacterina (célula inteira inativada) estão disponíveis no mercado atualmente e apenas para animais, com exceção de alguns poucos países que vacinam populações humanas (McBride et al., 2005, Adler, 2015c). Apesar de conferir proteção, essa estratégia vacinal possui desvantagens, como resposta imune restrita somente aos sorovares inclusos na imunização e proteção gerada de curta duração (Adler, 2015c). Outras tentativas de desenvolver uma vacina a partir de proteínas recombinantes estão sendo estudadas, como por exemplo a LipL32, e as proteínas Lig (*Leptospiral Immunoglobulin-like proteins*) (Dellagostin et al., 2017). Porém, até o momento, nenhuma vacina experimental induziu proteção total, de longa duração, contra todas as leptospiras responsáveis pela leptospirose, preenchendo todos os requisitos para uma vacina universal capaz de prevenir a doença (Grassmann et al., 2017b).

O princípio da Vacinologia Reversa (VR) é avaliar *in silico* potenciais candidatos vacinais codificados pelo genoma do patógeno de interesse e reduzir o número de alvos vacinais para um número razoável a ser testado em laboratório (Delany et al., 2013). Triagens *in vitro* permitem reduzir ainda mais o número de candidatos vacinais a serem testados, diminuindo também o número de animais utilizados em testes destas vacinas. Esta estratégia aumenta as chances de sucesso no desenvolvimento de vacinas ao testar em modelos animais apenas alvos racionalmente selecionados. Leptospiras são bactérias extracelulares e a resposta imune humoral é creditada como principal responsável pela eliminação das mesmas, pelo menos na maioria dos hospedeiros (Zuerner, 2015). Para um reconhecimento eficiente da bactéria viva e circulante por parte de anticorpos, os mesmos precisam ser gerados contra抗ígenos presentes na superfície da bactéria. Em bactérias

didermes, como a *Leptospira*, as proteínas que possuem pelo menos uma porção exposta na superfície da bactéria são proteínas transmembrana de ME (com estrutura de barril- $\beta$ ), lipoproteínas ancoradas a ME, e possivelmente proteínas secretadas que de alguma forma interagem com as demais (Haake and Zuckert, 2015, Grassmann et al., 2017a). A determinação experimental da localização de proteínas de superfície em *Leptospira* spp. atualmente é baseada em técnicas como a proteólise de superfície por proteinase K (pK) e imunofluorescência (IF) de superfície (Pinne and Haake, 2013). Estas técnicas podem ser agressivas à frágil ME de *Leptospira* (Faine et al., 1999), gerando resultados inconclusivos e sujeitos ao viés de identificar erroneamente proteínas não expostas, quando a ME foi rompida (Wolff et al., 2013). Neste contexto, há a necessidade de desenvolvimento de técnicas experimentais que garantam a integridade da ME para a determinação confiável da localização celular de alvos vacinais preditos por VR como expostos na superfície de *Leptospira* spp.

O objetivo deste trabalho foi identificar *in silico* alvos vacinais em potencial contra a leptospirose, através de uma abordagem de VR; desenvolver uma técnica focada na manutenção da integridade da ME de leptospiros para determinar a localização de proteínas de ME; e demonstrar a localização de alvos vacinais na superfície da célula de *L. interrogans*. Desta forma, as abordagens aplicadas visam o desenvolvimento de uma vacina universal contra leptospirose.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Leptospirose: a zoonose mais abrangente no mundo

A leptospirose é a zoonose bacteriana mais comum, com distribuição mundial (com exceção das zonas polares) infecta todos os mamíferos investigados quanto a presença de leptospiras (Ellis, 2015, Jobbins and Alexander, 2015, Mgode et al., 2015). O agente etiológico da doença foi identificado a mais de 100 anos (Stimson, 1907, Inada et al., 1916) e até o momento é uma doença em que o número de casos continua em ascensão. Estima-se que ocorram cerca de 1,03 milhões de casos por ano no mundo inteiro, e destes cerca de 58.900 casos resultam em morte (Costa et al., 2015).

A distribuição dos casos da doença no mundo leva em consideração diversos fatores, como geografia, clima e classe social. Países tropicais apresentam maior incidência de leptospirose mundial (73%) (Costa et al., 2015), fato que é atribuído às condições ambientais e socioeconômicas nesta região. Nestes locais, há maior abundância de hospedeiros reservatórios (principalmente roedores), sobrevivência da bactéria na água e solo, e risco aumentado de exposição de humanos a estas fontes de infecção (Levett, 2001, Reis et al., 2008, Felzemburgh et al., 2014). Nestes países de clima tropical, na maioria subdesenvolvidos, a leptospirose é endêmica e frequentemente sazonal, relacionada a períodos de chuvas intensas e inundações. Em países desenvolvidos, a leptospirose é uma doença de caráter ocupacional e recreativo, cuja ocorrência está relacionada a profissões relacionadas ao meio rural, veterinários, bem como praticantes de esportes aquáticos (Lacerda et al., 2008, Sethi et al., 2010).

Homens adultos, na faixa etária de 20-29 anos são mais acometidos pela doença do que mulheres e crianças, enquanto que homens com faixa etária de 50-59 anos formam o grupo com maiores índices de mortalidade por leptospirose (Costa et al., 2015). A maior incidência de casos e mortalidade no gênero masculino está associada a ocupações e atividades de risco (Reis et al., 2008, Felzemburgh et al., 2014). Indivíduos com ocupações de risco pelo contato com potenciais fontes de leptospiras incluem: veterinários, profissionais de abatedouros, fazendeiros (principalmente quem trabalha com gado leiteiro), caçadores, cuidadores de animais,

cientistas e técnicos que manipulam animais de laboratório (Steneroden et al., 2011). A maioria das estimativas das taxas de morbidade e mortalidade ocorre em regiões onde há agricultura de subsistência, e onde a doença é um problema de saúde veterinária que causa perdas na produtividade (Costa et al., 2015). A severidade da doença pode variar de acordo com o sorovar infectante e a espécie afetada, mas existem muitos aspectos comuns entre as espécies: a fase aguda da infecção é principalmente subclínica, e as grandes perdas econômicas provêm da infecção crônica, que causam principalmente perdas na reprodução (Ellis, 2015).

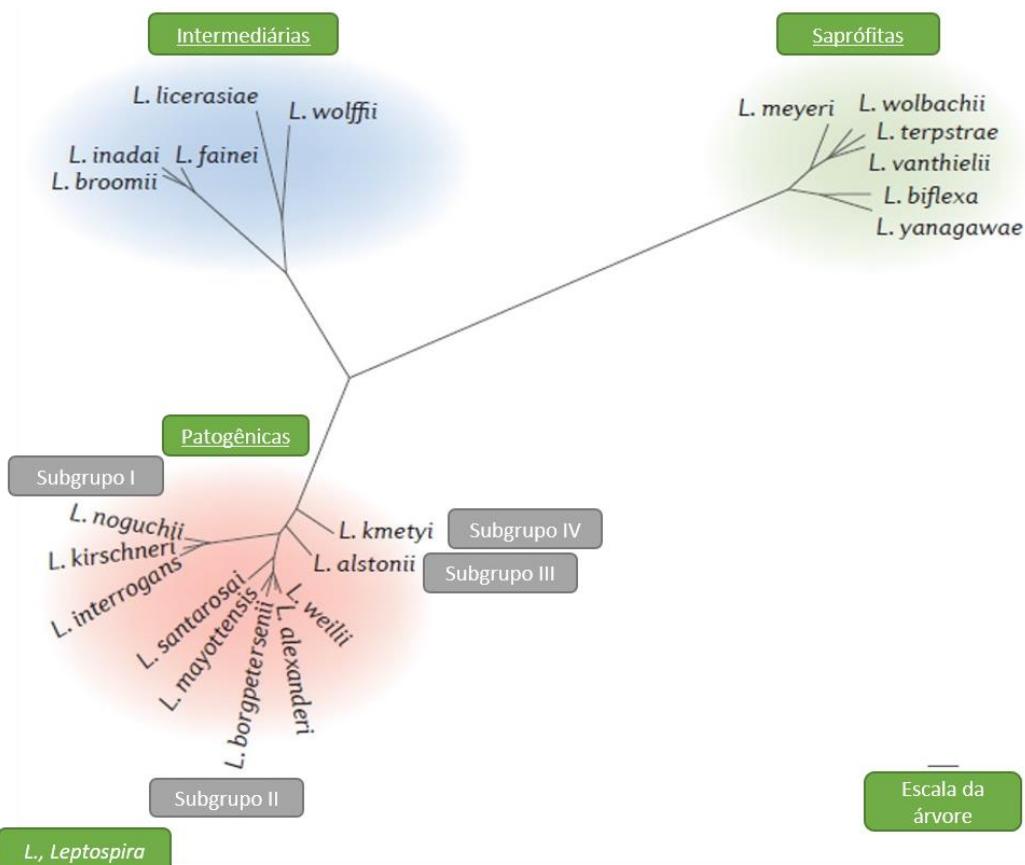
A leptospirose é uma doença tipicamente bifásica, iniciando com uma fase aguda onde os sintomas clínicos em humanos incluem febre leve, acompanhada de enjoos, dores de cabeça e musculares (Haake and Levett, 2015). Esta doença febril pode ser auto limitante, durando em torno de uma semana. Se não resolvida, a doença progride para uma forma severa, caracterizada como uma doença ictérica, potencialmente fatal, também chamada Doença de Weil (Inada et al., 1916). A apresentação da leptospirose severa pode incluir disfunção hepática e renal, uveíte, meningite e hemorragia (Segura et al., 2005, Gouveia et al., 2008). Cerca de 10% dos infectados progridem para a forma grave, apresentando falha de diversos órgãos. A apresentação clínica com maior letalidade é a SHPAL (Haake and Levett, 2015). A SHPAL ainda não é bem compreendida, parece estar relacionada a um evento inflamatório severo, com ausência de leptospiras no pulmão destes pacientes. A taxa de mortalidade em pacientes com SHPAL chega a >50% dos casos, e os relatos estão cada vez mais frequentes (Ko et al., 2009).

## **2.2 *Leptospira*: o agente etiológico da Leptospirose**

Bactérias pertencentes ao gênero *Leptospira* foram primeiramente descritas como *Spirocheta interrogans* em 1907 por Stimson porque apresentavam forma semelhante ao de um ponto de interrogação (Stimson, 1907), formato que se deve à presença de dois flagelos ancorados nas regiões terminais do microrganismo. Em 1916, Inada e colaboradores isolaram e caracterizaram pela primeira vez o patógeno responsável pela doença de Weil (Inada et al., 1916).

Inicialmente o gênero *Leptospira* foi dividido em espécies patogênicas e não-patogênicas (Adler, 2015a). Atualmente, o gênero *Leptospira* possui 22 espécies,

distribuídas em 3 grupos principais por relações filogenéticas: 10 espécies patogênicas, cinco intermediárias e sete saprófitas (Figura 1). As espécies patogênicas e intermediárias são capazes de infectar hospedeiros diversos, enquanto as saprófitas são organismos de vida livre, encontrados em águas e solos e diferente das espécies patogênicas, não são capazes de infectar hospedeiros (Faine et al., 1999). A classificação taxonômica atual considera a distância entre genomas para determinar que uma espécie é diferente de outra e é atualmente determinada por análises *in silico* dos genomas sequenciados (Picardeau, 2017).



**Figura 1.** Árvore filogenética de Leptospiraceae. Baseada nas sequências de rRNA 16S. Essa figura não inclui a espécie saprófita *L. idonii*, cujo genoma não foi sequenciado até o momento. Figura adaptada de Picardeau (2017).

Existe ainda a classificação sorológica de leptospiras, que é definida a partir da heterogeneidade do antígeno O do LPS (Levett, 2001, Bharti et al., 2003). Baseado nesta abordagem, o gênero é classificado em mais de 300 sorovares. Os sorovares são definidos pela aglutinação após absorção cruzada com anti-soro de coelho com antígeno heterólogo (Dikken et al., 1978, Kmety and Dikken, 1993). Sorovares

antigenicamente relacionados são ainda agrupados em 24 sorogrupos distintos. Esses agrupamentos não têm valor taxonômico, mas são úteis para o diagnóstico sorológico inicial e para o entendimento epidemiológico a nível regional ou populacional (Faine et al., 1999).

As leptospiras tem formato helicoidal alongado e são finas, possuindo 0.15 µm de diâmetro, 10 a 20 µm de comprimento e cada um de seus flagelos internos possuem 3 µm de comprimento (Picardeau, 2017). Por serem muito finas e possuírem alta motilidade, essas bactérias não são facilmente visíveis em microscopia com luz normal, sendo a microscopia de campo escuro o padrão para visualização destas bactérias (Cameron, 2015). As leptospiras que são isoladas de animais hospedeiros são morfologicamente mais curtas e espiraladas do que as cultivadas em laboratório (com várias passagens *in vitro*) e cepas de saprófitas (Ellis et al., 1983). As bactérias que são cultivadas *in vitro* em meio com pouca abundância de nutrientes se tornam alongadas, resultando em células mais lentas e não saudáveis. Da mesma forma, essas bactérias também podem vir a adquirir uma conformação esférica, caracterizada pela degradação celular devido à má nutrição (Cameron, 2015).

A motilidade das leptospiras está relacionada a presença de dois endoflagelos presentes no espaço periplasmático, esses são ancorados nas regiões terminais da membrana interna (MI) e se estendem ao longo da célula sem se sobrepor na região central (Picardeau, 2017). Esses microrganismos possuem rápida motilidade translacional, movendo-se aproximadamente 20 µm em 2-3 segundos (Faine et al., 1999). O movimento de rotação é dado a partir da rotação dos flagelos juntamente com o rolamento da célula em direção oposta, gerando uma onda helicoidal que propulsiona a célula (Goldstein and Charon, 1988), enquanto que o movimento translacional ocorre apenas quando os endoflagelos estão em movimento de rotação opostos (Nakamura et al., 2014). Em geral, o flagelo é formado por três principais estruturas: o corpo basal (que funciona como um motor rotativo transmembrana), o gancho flexível (através do qual o filamento propulsiona a bactéria quando é girado pelo motor) e o filamento (que é conectado ao corpo basal através do gancho). As proteínas que compõem os endoflagelos são altamente conservadas entre as espécies de leptospiras. Os filamentos flagelares de *Leptospira* são compostos por uma camada interna (núcleo) e uma camada externa (bainha), e formados por no mínimo sete proteínas em *L. interrogans* (Picardeau, 2017). Quatro genes são responsáveis por codificar a proteína FlaB, com alto grau de identidade entre si e que

se encontra em diferentes concentrações nas células (300-12000 cópias por célula) (Malmstrom et al., 2009). Outros dois genes são responsáveis por codificar a proteína FlaA (4500 cópias por célula), outro componente do flagelo de leptospiras, que possui baixa identidade entre os genes responsáveis pela sua codificação (Malmstrom et al., 2009, Picardeau, 2017). Uma proteína componente da bainha flagelar foi recentemente identificada e nomeada *Flagellar coiling protein A* – FcpA. Esta proteína é apresentada em abundância (8000 cópias por célula), sendo responsável pelo formato enrolado dos flagelos, além de ser essencial à virulência e invasão da bactéria. FcpA é ainda, exclusiva do gênero *Leptospira* (Wunder et al., 2016a).

Espécies de *Leptospira* demonstram um aumento na velocidade ao cruzarem meios de alta viscosidade (Kaiser and Doetsch, 1975, Petrino and Doetsch, 1978, Charon and Goldstein, 2002, Takabe et al., 2013). Esta capacidade tem sugerido o acréscimo na sobrevivência da bactéria em ambientes naturais e na invasão de tecidos por espécies patogênicas (Goldstein and Charon, 1988, Takabe et al., 2013). Leptospiras patogênicas que sobrevivem em diferentes ambientes (água e mamíferos hospedeiros), mantém a sua motilidade em exposição a osmolaridade fisiológica, enquanto que espécies saprófitas a perdem nessas condições (Takabe et al., 2013), fato essencial que conecta a motilidade associada a virulência dessas bactérias (Cameron, 2015).

Leptospiras saprófitas e patogênicas crescem sob condições aeróbicas e possuem um crescimento ideal de 28-30 °C, embora as espécies saprófitas também cresçam em baixas temperaturas (11-13 °C) enquanto as patogênicas cresçam em temperaturas mais altas (37 °C). O pH ótimo para crescimento é de 7,2-7,6. O crescimento bacteriano depende da espécie, da adaptação ao cultivo em laboratório e do inóculo inicial utilizado na cultura. O tempo de duplicação para as patogênicas *in vivo* é de 6-8 horas enquanto que *in vitro* é de 14-18 horas, podendo ter crescimento inicial estimado entre dias e semanas. Já o tempo de duplicação de espécies saprófitas varia de 4-5 horas. O uso de um cultivo em fase estacionária para iniciar uma nova cultura (1-10% do volume do novo meio) resulta no seu crescimento máximo em 4-7 dias para patogênicas e 2-3 dias para saprófitas (Faine et al., 1999).

Existem três tipos de meios líquidos comumente utilizados para crescimento de leptospiras: o meio Ellinghausen-McCullough modificado por Johnson-Harris, o EMJH (Ellinghausen and McCullough, 1965, Johnson and Harris, 1967) que é o meio líquido mais rotineiramente utilizado; o meio Stuart (Zuerner, 2005), rico em soro de

coelho que promove o crescimento da bactéria, mas é propenso a precipitar o fosfato componente na sua formulação e isto pode prejudicar a visualização das bactérias sob microscopia de campo escuro; o meio Korthof (Cameron, 2015) que semelhantemente ao meio Stuart, contém soro que promove o crescimento bacteriano mas também tem a visualização das bactérias prejudicada devido a precipitação do fosfato (Cameron, 2015). Leptospiras também podem ser cultivadas em meio semissólido, onde formam uma densa zona de crescimento chamada de disco de Dinger (Lawrence, 1951). O tempo de transferência do meio semissólido varia de acordo com a cepa (semanal ou até mesmo 6 meses). O crescimento de leptospiras em meio sólido é geralmente difícil e também não são todas as cepas que conseguem crescer neste tipo de meio. Quando é possível, o crescimento das colônias ocorre de 10 dias a 6 semanas (Cameron, 2015). O isolamento de leptospiras a partir de amostras biológicas pode ser feito em meio EMJH através da adição de urina, tecidos (Zuerner, 2005) e sangue (Wuthiekanun et al., 2007).

Leptospiras podem ser estocadas em meio semissólido a temperatura ambiente. No entanto leptospiras patogênicas nessas condições podem demonstrar reduzida viabilidade e perda de virulência (Cameron, 2015). Para evitar isso, leptospiras também podem ser criopreservadas em EMJH contendo dimetilsulfóxido (DMSO) em nitrogênio líquido (Palit et al., 1986, Zuerner, 2005).

### **2.3 A Transmissão e o ciclo do patógeno**

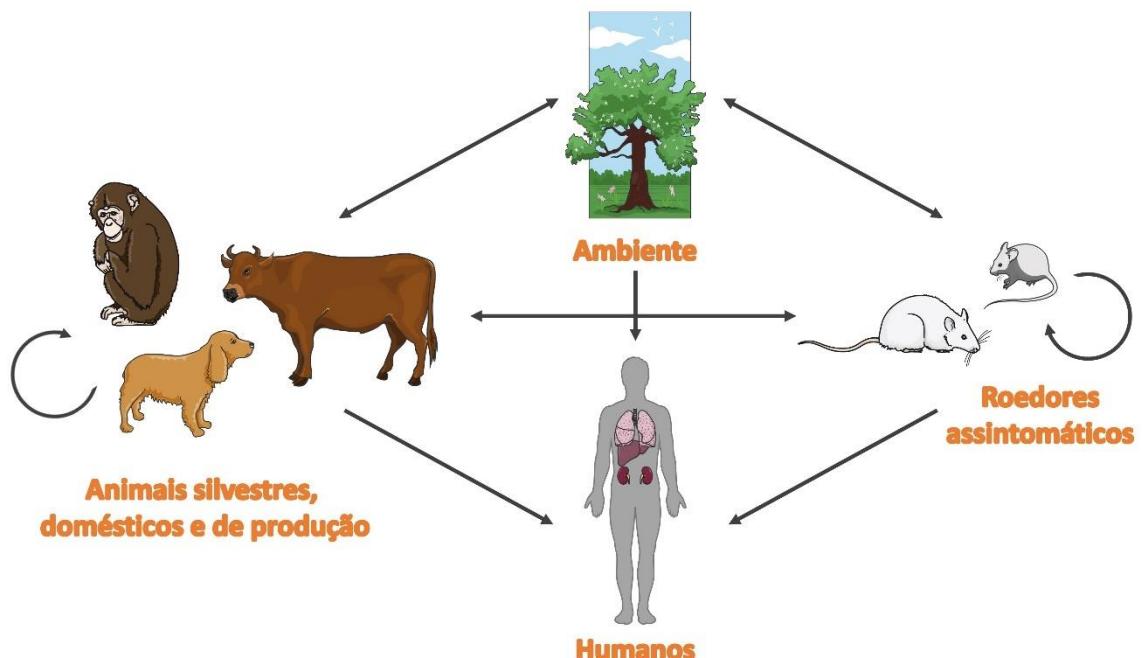
A transmissão da leptospirose requer continua circulação enzoótica do patógeno entre os animais reservatórios, comumente chamados de hospedeiros de manutenção. Leptospiras patogênicas mantêm facilmente a sua transmissão entre animais silvestres e domésticos através de roedores carreadores assintomáticos da doença. Alguns sorovares como Canicola e Hardjo não necessitam de roedores para sua transmissão, eles são mantidos em reservatórios do próprio rebanho que transmitem os sorovares entre si (Ko et al., 2009). Porém, as leptospiras são transmitidas principalmente pelo contato com água e solos contaminados pela urina de animais infectados (Mwachui et al., 2015).

Os roedores são a fonte de infecção de leptospiras mais frequente em zonas urbanas, enquanto que animais domésticos, de produção e silvestres são importantes

fontes de transmissão em zonas rurais (Ellis, 2015). Estas bactérias colonizam os rins de seus hospedeiros e são liberadas através da urina no ambiente externo, onde são capazes de sobreviver por vários meses (Trueba et al., 2004). Leptospirosas são as únicas espiroquetas capazes de sobreviver fora do hospedeiro, e essa capacidade de persistir no ambiente pode estar associada à sua habilidade de formar agregados celulares (Trueba et al., 2004) e biofilmes (Trueba et al., 2004, Ristow et al., 2008, Vinod Kumar et al., 2016).

A persistência renal e excreção urinária podem durar anos e as leptospirosas podem apresentar tropismo para outros tecidos que não os rins, como por exemplo, o trato genital (Ellis et al., 1986a, Ellis et al., 1986b). A exposição de humanos a bactéria pode ocorrer através de contato direto com urina ou tecidos de animais contaminados ou indireto, através da água e solos contaminados (Figura 2). A magnitude do risco depende da prevalência local, da carga bacteriana, e o grau e frequência em que um indivíduo é exposto (Steneroden et al., 2011).

O contato indireto com água e solos contaminados com leptospirosas é muito mais comum do que o contato direto, e pode estar associado com ocupação ou atividades de lazer. Além dos fatores associados a atividades ao ar livre, também estão expostos trabalhadores que entram em esgotos, atividades militares e agricultura em regiões tropicais de alta precipitação. Trabalhadores na agricultura com risco incluem os que trabalham em fazendas de arroz, inhame, banana, cana de açúcar e abacaxi (Levett, 2001). Estas ocupações envolvem atividades que comumente resultam na exposição de cortes e abrasões a solo e agua contaminados com a urina roedores ou de outros animais infectados (Smythe et al., 1997). Atividades de lazer incluem todos os esportes relacionados com agua, incluindo caiaque (Shaw, 1992) e triatlon (Sejvar et al., 2003), dentre outros.



**Figura 2.** Ciclo de transmissão de leptospiras patogênicas. Animais silvestres, domésticos, de produção, roedores (carreadores assintomáticos da doença) e humanos podem ser infectados por leptospiras. Todos podem vir a se infectar a partir da urina de outros animais infectados ou a partir de água e solos contaminados pela urina de animais portadores de leptospiras.

## 2.4 Hospedeiros carreadores da doença e a leptospirose animal

Leptospiras podem infectar os mamíferos, incluindo pinípedes e morcegos, bem como aves, anfíbios, répteis e possivelmente peixes (Dietrich et al., 2015, Ellis, 2015, Jobbins and Alexander, 2015, Mgode et al., 2015). Os humanos são hospedeiros accidentais, ou seja, indivíduos em que as leptospiras patogênicas causam manifestações agudas da doença, mas normalmente não os induzem a um estado carreador que é necessário para a sua transmissão (Ko et al., 2009).

Em ratos as leptospiras infectantes são removidas de todos os órgãos, com exceção dos rins, onde permanecem nos túbulos contorcidos proximais (Nally et al., 2005, Athanazio et al., 2008). Dessa forma, os ratos podem excretar leptospiras em altas concentrações, cerca de  $10^7$  organismos/ml de urina, por até nove meses após infecção experimental (Sterling and Thiermann, 1981). Foi observado por Nally e colaboradores que rins de ratos cronicamente infectados continham quantidades substancialmente maiores de antígeno O de LPS que os encontrados nos fígados de

hamsters com a doença aguda, sugerindo que a expressão do antígeno O facilita a o seu transporte pelo organismo do animal (Nally et al., 2005). Os túbulos renais são sítios imunoprivilegiados, característica que pode contribuir com o alto grau de persistência do patógeno (Picardeau, 2017). Além disso, as leptospiras que são deixadas na urina tem a expressão reduzida de proteínas que são reconhecidas pela resposta imune humoral de ratos (Monahan et al., 2008).

Em bovinos a forma severa da doença é incomum e geralmente associada aos sorogrupos Pomona, Icterohaemorrhagiae e Grippotyphosa e em animais jovens. Sinais clínicos incluem febre, anemia hemolítica, hemoglobinúria, icterícia e ocasionalmente meningite e morte. Em vacas lactantes, infecções accidentais são frequentemente associadas com pequenas quantidades de sangue no leite. A fase aguda da doença com o sorovar Hardjo é geralmente subclínica, com exceção de fêmeas lactantes, onde agalactia pode ocorrer (Higgins et al., 1980). Aborto, natimortos, prematuros, nascimento de terneiros fracos e com peso reduzido são as mais importantes perdas econômicas da leptospirose crônica em bovinos (Ellis et al., 1985).

Cães são predadores de muitas espécies de roedores e devido a sua forte associação com humanos em muitas sociedades, eles se apresentam como um fator de risco na transmissão da leptospirose entre roedores e humanos (Ellis, 2015). O espectro da doença pode variar de aguda a ictérica. Formas não ictéricas de leptospirose iniciam como uma súbita doença febril, que é geralmente bifásica. A fase inicial coincide com bacteremia e dura cerca de uma semana. A fase secundaria pode ocorrer após uma remissão de 3-4 dias e coincide com a resposta imune contra a infecção. A fase febril é acompanhada de vários sinais clínicos que podem incluir apatia, fotofobia, mialgia severa, suflusão conjuntival, anorexia, náuseas, vômito e prostração. Estes sinais também podem ser acompanhados de leucocitopenia, aumento das transaminases hepáticas e diminuição das taxas de filtração glomerular (Geisen et al., 2007, Tangeman and Littman, 2013). Em contraste, a leptospirose ictérica é geralmente mais grave e é caracterizada por sinais hepáticos, renais e vasculares, além de outros aspectos associados a leptospirose não-ictérica. A icterícia ocorre geralmente no início da doença e com a agravamento ictérica, aumentam os riscos de insuficiência renal, hemorragia e colapso cardiovascular (Ellis, 2015). A forma pulmonar é caracterizada por hemorragia intrapulmonar que conduz a falha

respiratória aguda e morte. Uma variedade de sequelas crônicas têm sido descritas como nefrite intersticial e ocasionalmente uveíte (Gallagher, 2011).

Em primatas não-humanos, uma soroprevalência de 42% foi encontrada em macacos vervet (*Cercopithecus aethiops sabaeus*) capturados (Baulu et al., 1987). Severa, muitas vezes fatal, a doença tem sido observada em *Saimiri sciureus* (Perolat et al., 1992), *Callithrix kuhlii* (Baitchman et al., 2006), *Saguinus labiatus* (Reid et al., 1993) e *Macaca sylvana* (Shive et al., 1969). O espectro da doença desenvolvida por estes animais se assemelha muito a dos humanos: pulmonar e ictérica. Meningoencefalite e aborto também tem sido reportados (Pereira et al., 2005).

Leptospirose é uma das causas mais comuns de morte em leões marinhos da Califórnia encontrados mortos nas praias. A infecção nestes animais é caracterizada por acometer rins e fígado, conduzindo a insuficiência renal e morte (Prager et al., 2013). Outros pinípedes também são afetados como o lobo marinho do norte, o elefante marinho do norte e as focas (Cameron et al., 2008).

Répteis também têm sido apresentados como portadores de leptospiras. Isso pode estar associado aos ambientes úmidos que habitam, e podem ser um importante fator de risco para outros animais (Charon et al., 1975). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), e cultura de leptospiras têm sido utilizadas em rãs e sapos (Diesch et al., 1966, Babudieri et al., 1973, Gravekamp et al., 1991). Semelhantemente, a infecção tem sido demonstrada em serpentes e tartarugas (Ferris et al., 1961, Glosser et al., 1974, Hyakutake et al., 1980) .

## **2.5 Entrada e disseminação das leptospiras no organismo hospedeiro**

As primeiras linhas de defesa contra as leptospiras incluem a pele intacta (que é composta por tecido conectivo e tem colágeno I, colágeno II, elastina, fibronectina e vitronectina como componentes), muco e saliva (Asoh et al., 2014, Picardeau, 2017). A infecção por leptospiras ocorre predominantemente pelo contato do patógeno com a pele abrasada do hospedeiro (Ko et al., 2009). Assim que as bactérias penetram no hospedeiro, elas estabelecem uma infecção sistêmica por cruzarem as barreiras teciduais e se disseminarem no organismo através do sangue (Adler, 2015a). As leptospiras podem ser isoladas da corrente sanguínea minutos após a inoculação (Faine et al., 1999) e detectadas em diferentes órgãos tão cedo quanto 1h após a

inoculação (Faine, 1957a, Faine, 1957b, Athanazio et al., 2008, Lourdault et al., 2009). Em contraste com outras bactérias, o meio viscoso (como nos tecidos conectivos) promove ainda mais a motilidade de leptospiras, devido ao movimento semelhante ao de um “saca rolhas” (Charon et al., 1992). Esta motilidade é essencial para as leptospiras atravessarem as barreiras teciduais, como demonstrado em diferentes experimentos com mutantes que perderam a capacidade de movimentação (Wunder et al., 2016a). *Leptospira interrogans* é capaz de transitar rapidamente entre as camadas únicas de células, mas não entre as junções celulares (Toma et al., 2011). As bactérias podem alcançar os órgãos rapidamente através da sua disseminação hematogênica.

Em ratos, modelos animais para a fase crônica da doença, as bactérias também podem ser rapidamente encontradas em todos os órgãos logo após a entrada das leptospiras, mas em seguida são eliminadas de todos os tecidos com exceção dos rins, onde persistem nos túbulos proximais (Athanazio et al., 2008). No entanto, leptospiras patogênicas tem amplo tropismo, pois podem infectar todos os órgãos, causando danos em diversos tecidos de hospedeiros suscetíveis (Ko et al., 2009, Picardeau, 2017), ainda que a pressão seletiva varie em compartimentos diferentes. Por exemplo, os rins são órgãos imunoprivilegiados e as leptospiras são capazes de se replicar dentro deles sem sofrer ataque da resposta imune como ocorre em outros órgãos. Leptospiras patogênicas expressam na sua superfície proteínas adesinas que podem promover a sua interação com diversos componentes das células do hospedeiro, incluindo a matriz extracelular, caderinas do endotélio vascular e outras macromoléculas (incluindo proteínas do complemento, trombina, fibrinogênio e plasminogênio) que facilitam a evasão da bactéria ao sistema imune do hospedeiro e promovem a sua disseminação no organismo (Picardeau, 2017).

Manifestações severas na fase tardia da doença geralmente ocorrem de quatro a seis dias depois do início da doença, mas pode variar dependendo da dose do inoculo infectante e outros fatores determinantes da doença. O desenvolvimento da leptospirose e a progressão da doença são influenciados por fatores de suscetibilidade do hospedeiro, a dose infectante do inóculo e as características de virulência da cepa infectante (Ko et al., 2009).

## 2.6 Mecanismos de evasão da resposta imune

A resposta imune adaptativa desenvolvida contra a leptospirose é principalmente humoral (Picardeau, 2017). Anticorpos aglutinantes protetores produzidos durante a infecção são gerados contra o LPS, e a resposta ao LPS é específica para a constituição molecular que a induziu (Gomes-Solecki et al., 2017, Picardeau, 2017). A resposta imune é montada rapidamente após a infecção (Inada et al., 1916) e IgM é gerada logo após 3 dias da infecção pela via intraperitoneal com *L. interrogans* (Adler and Faine, 1976, Chassin et al., 2009). A resposta imune humoral é crucial contra a leptospirose e é mediada por Receptores do tipo Toll (TLR4), um membro da família de receptores da resposta imune inata. Esses receptores estão envolvidos no reconhecimento de agentes microbianos, através dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como o LPS, e estão envolvidos também na expressão de peptídeos antimicrobianos, quimiocinas, citocinas, e moléculas de coestimulação, que conduzem ao recrutamento de células imunes, e culmina na eliminação do patógeno e subsequentemente em proteção (Gomes-Solecki et al., 2017).

Semelhante a outros patógenos, leptospiras podem modificar a estrutura do LPS para se adaptar a mudanças ambientais e evitar reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro (Eshghi et al., 2015). Um dos mecanismos de suscetibilidade associado ao TLR4 é a produção de IgM diretamente contra o LPS enquanto que a produção de IgG é desencadeada diretamente por ambos TLR2 e TLR4. O reconhecimento do LPS pelo TLR4 é provavelmente o fator mais influente na suscetibilidade ou resistência a infecção e progressão da doença, pois a falta deste receptor é suficiente para conferir suscetibilidade a infecção por leptospiras (Chassin et al., 2009). O LPS de leptospiras é atípico, e não é reconhecido pelo TLR4 em células humanas, enquanto que TLR4 de camundongos podem reconhece-lo e montar uma resposta imune que os protege contra leptospirose (Werts et al., 2001, Nahori et al., 2005). Isso pode, ao menos em parte, justificar o motivo de humanos serem sensíveis a forma aguda da doença enquanto camundongos resistentes (Gomes-Solecki et al., 2017). Leptospiras também desencadeiam uma resposta gerada por TLR2 que reconhece lipoproteínas. LipL32, a lipoproteína mais abundante em *Leptospira* é capaz de induzir inflamação em células proximais nos rins *in vitro* (Nahori

et al., 2005, Hung et al., 2006, Hsu et al., 2010). Leptospiros recuperadas da urina de ratos cronicamente infectados apresentaram acetilação ou tri-metilação das lisinas componentes de LipL32 que não se apresentam nas bactérias cultivadas *in vitro*. As modificações nas lisinas resultam em uma baixa reatividade com o soro de pacientes infectados, sugerindo uma estratégia de evasão das bactérias ao sistema imune (Witchell et al., 2014, Gomes-Solecki et al., 2017).

As armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) são capazes de eliminar leptospiros *in vitro*. As NETs são um importante mecanismo de defesa inicial, prejudicando a disseminação da bactéria nos tecidos. A depleção de neutrófilos em camundongos resulta no aumento bacteriano em três dias após a infecção no sangue e 14 dias após a infecção nos rins. As leptospiros que conseguem se instalar nos rins, são capazes de escapar dessa defesa, sugerindo que essas bactérias alcançam os rins antes mesmo da geração de NETs em 1-2 dias após a infecção. Alternativamente, as leptospiros também podem escapar de NETs produzindo DNases extracelulares (Scharrig et al., 2015). Leptospiros são capazes de se ligar a trombina (a protease central na cascata de coagulação), que promove um declínio na coagulação de fibrina e que pode conduzir a hemorragia (Fernandes et al., 2015). Assim, leptospiros patogênicas evitam a coagulação e o sistema complemento, interferindo na resposta inata do hospedeiro e promovendo a sua disseminação nos tecidos (Picardeau, 2017).

Os mecanismos de defesa oxidativa em leptospiros patogênicas sugerem que elas estão bem adaptadas ao ambiente oxidativo e podem resistir as espécies reativas de oxigênio (ROS) que são produzidas pelos fagócitos (Picardeau, 2017). Oxido nítrico (NO) é um antimicrobiano produzido pela óxido nítrico-sintase induzível (iNOS) em macrófagos e células endoteliais. Sob infecção por *Leptospira*, iNOS é expressa três dias após a infecção em rins e pulmões de camundongos através das vias TLR2 e TLR4 dependentes. NO é secretado por células parenquimatosas nos rins de camundongos infectados (Chassin et al., 2009), e desempenha um papel prejudicial na nefrite (Bandeira et al., 2011) e em lesões renais fibróticas induzidas por leptospiros (Fanton d'Andon et al., 2014).

A evasão ao sistema complemento é o mecanismo de evasão do sistema imune melhor descrito para leptospiros. Elas são capazes de recrutamento de reguladores do complemento do hospedeiro, aquisição de proteases do hospedeiro

que clivam proteínas do complemento na superfície da bactéria e secreção de proteases que inativam o complemento em torno da *Leptospira* (Fraga et al., 2011). O controle da via alternativa (VA) é obtido através da interação da bactéria com o fator H (FH), que inibe a sua ativação por prevenir a ligação do fator B (FB) com C3b, induzindo ao declínio da C3-convertase C3bBb e ativação como um cofator para clivagem do C3b pelo fator I (FI) (Pangburn et al., 1977). O controle da via clássica (VC) é mediado por ligação do C4BP a superfície da *Leptospira*. C4BP inibe VC e a via da lectina (VL) por interferir na montagem e declínio da C3-convertase, atuando como cofator de FI na inativação proteolítica de C4b (Scharfstein et al., 1978). Leptospiras também são capazes de sequestrar vitronectina para sua superfície, que pode proteger o patógeno contra a lise, evitando a formação do complexo de ataque a membrana (CAM) (da Silva et al., 2015).

As proteínas mais estudadas como participantes da evasão do sistema complemento são: proteínas semelhantes a endostatina A e B (LenA e LenB); proteínas semelhantes a imunoglobulinas A e B (LigA e LigB); e a proteína leptospiral A reguladora de aquisição do complemento (LcpA) (Verma et al., 2006, Choy et al., 2007, Stevenson et al., 2007, Barbosa et al., 2010, Castiblanco-Valencia et al., 2012). LenA é capaz de ligar ambos FH e proteína 1 relacionada ao fator H (FHR-1) enquanto que LenB só é capaz de interagir com FH (Thomas and Higbie, 1990, Liu et al., 2007). LigA e LigB ligam FH, proteína 1 semelhante ao fator H (FHL-1) e C4BP, permitindo o controle de todas as vias de ativação do complemento (Panaphut et al., 2002). Leptospiras também são capazes de ligar reguladores negativos do complemento através da lipoproteína LcpA (Fraga et al., 2011). LcpA interfere na via de ativação terminal do complemento através da sua ligação com C9, molécula-chave na formação do CAM (da Silva et al., 2015). A degradação de proteínas do complemento pode ocorrer indiretamente, utilizando proteases adquiridas do hospedeiro, como o plasminogênio ou diretamente, pela atividade de proteases endógenas produzidas por cepas patogênicas de leptospiras. Leptospiras também podem secretar proteases que são capazes de atuar em uma vasta gama de substratos, incluindo o C3, fator-chave na amplificação da cascata do complemento, FB da VA, além de C2 e C4 de VC e VL (Fraga et al., 2011).

## 2.7 Vias e modelos animais utilizados para avaliar a doença

A via intraperitoneal (IP) é a mais frequentemente utilizada para inoculação de leptospiras em modelos animais para leptospirose aguda como o hamster (*Mesocricetus auratus*) e o cobaio (*Cavia porcellus*), onde esse tipo de infecção proporciona uma rápida disseminação das bactérias no organismo hospedeiro (Haake, 2006, Coutinho et al., 2014, Zuerner, 2015). Apesar de ser uma via que apresenta várias vantagens técnicas não é uma rota natural de infecção do patógeno (Coutinho et al., 2014). Esta via ultrapassa as barreiras teciduais e imunes do hospedeiro, permitindo acesso diretamente a cavidade peritoneal para a circulação sanguínea através dos ductos linfáticos e torácicos destes animais (Ratet et al., 2014, Wunder et al., 2016b).

Vias alternativas têm sido estabelecidas com o objetivo de mimetizar a infecção por leptospiras de forma natural. A via subcutânea (SC) foi utilizada por Truccolo et al. (2002) para testes de antibióticos em hamsters. Posteriormente Coutinho et al. (2014), testaram a mesma via em hamsters comparando-a com a intradermal (ID) por qPCR de rins e fígado, onde o rim apresentou-se como tecido mais afetado pelas bactérias. A via SC demonstrou uma carga de leptospiras 31 e 36 vezes maior que a via ID e como resultado esperado, a via ID foi apresentada como mais natural, sendo comparada a lesões na pele e por isso tendo uma menor disseminação do patógeno. Outro grupo de pesquisadores (Wunder et al., 2016b) comparam em hamsters a via conjuntival (CJ) com a tradicional via IP. Nesse trabalho além das vias foram testados inóculos baixos de  $10^2$  leptospiras (na via IP) e inóculos altos de  $10^8$  leptospiras (nas vias IP e CJ). Também foram utilizadas leptospiras patogênicas e atenuadas para controle da disseminação. Em ambos os casos as leptospiras foram encontradas em múltiplos órgãos e 30 dias após a infecção, a cepa atenuada havia sido eliminada de todos os tecidos. Foi sugerido então, que a dose infectante e a rota de infecção são fatores mais importantes para a patogênese do que a disseminação do patógeno no organismo.

Outro modelo animal de leptospirose letal, o cobaio, foi utilizado no estabelecimento de uma via epicutânea (EP) (Zhang et al., 2012), onde os animais tiveram a pele dos flancos abrasada com auxílio de uma lâmina de bisturi. As bactérias ( $10^8$ ) foram depositadas sobre a lesão em discos de filtro, permanecendo no local por

várias horas. Foram feitas contagens das leptospires remanescentes nos discos de filtro após cada inoculação. Com os resultados, a conclusão foi de que as leptospires são capazes de infectar os animais pela pele e após 24 horas de contato das bactérias com a pele do hospedeiro todas as bactérias haviam deixado os discos de filtro.

Modelos de leptospirose crônica como os ratos foram utilizados para infecção por leptospires através das vias SC, IP e mucosal (MC) por Zilber et al. (2016). Um inóculo de  $10^7$  leptospires foi utilizado para todas as vias, e estas foram avaliadas por qPCR. As vias propostas como naturais foram influenciadas pelo tempo de disseminação das bactérias no organismo e colonização renal associada a excreção das bactérias na urina. A via MC se demonstrou mais eficiente quanto a colonização renal e excreção das leptospires pela urina. Também foi testada a possibilidade de outros fluidos como saliva, fezes, e lavagem brônquio-alveolar (BAL) transmitirem as bactérias, mas o resultado foi negativo. Recentemente, o modelo camundongo de infecção subletal por leptospires foi avaliado por o inóculo pela via ocular (OC). Uma dose de  $10^6$  leptospires foi capaz de infectar 25% dos animais testados. Houve uma sobreposição entre o período em que a espiroqueta foi encontrada no sangue e na urina, sugerindo que a doença pareça ter uma fase única no que diz respeito a progressão da doença.

## **2.8 Prevenção da doença: vacinas já desenvolvidas e testadas**

A vacina clássica contra a leptospirose é a bacterina, estratégia vacinal que é composta pelo microrganismo inteiro inativado. Durante décadas, utilizou-se uma variedade de métodos para inativar as leptospires para utilização destas como vacinas, incluindo calor, formalina, fenol, etanol, congelamento-descongelamento e irradiação. Esta abordagem de vacinação tem sido amplamente utilizada em bovinos, suínos e cães. Apenas em alguns poucos países (China, Japão, Cuba e França) a vacinação é permitida para humanos, e usada apenas em momentos de maior risco ou em populações expostas ao patógeno (Andre-Fontaine et al., 2003, Adler, 2015b). A imunidade provocada por estas bacterinas é restrita aos sorovares que as compõem. Esta característica obriga a ocorrência de estudos epidemiológicos constantes para reconhecimentos de sorovares prevalentes e inclusão destes nas preparações vacinais, que normalmente são multivalentes. Além disso, as bacterinas

apresentam reações adversas devido aos componentes das células de leptospires (LPS) e constituintes do meio de crescimento, contribuindo para a pouca disponibilidade para humanos (Torten et al., 1973, Christopher et al., 1982). Além disso, a imunidade desencadeada é dirigida principalmente contra o LPS, que promove uma resposta independente de células T e, por conseguinte, envolve anticorpos IgM e falta de uma resposta imune de memória. Assim, a duração da imunidade é relativamente curta, com reforços vacinais anuais recomendados em quase todos os casos (Adler, 2015c).

O sorovar Pomona atenuado por passagens *in vitro* foi utilizado como uma vacina viva e mostrou gerar imunidade protetora em hamsters, suínos e bovinos por até 14 meses (Stalheim, 1968, Stalheim, 1971). As bases moleculares para essa atenuação não foram estabelecidas, e a vacina acabou não sendo utilizada. Nenhuma vacina viva está atualmente licenciada. Porém, recentemente, uma cepa de *L. interrogans* sorovar Manilae com mutação induzida no lócus de biossíntese de LPS teve virulência atenuada em hamsters. Animais inoculados com este mutante não apresentavam sinais clínicos de infecção, nem se tornaram portadores renais (Murray et al., 2010). O mutante também foi incapaz de colonizar os rins de camundongos (Marcisin et al., 2013). A imunização de hamsters com este mutante protegeu contra desafio homólogo e heterólogo (sorovar Pomona), não apresentando reações adversas. Além disso, não foi detectado anticorpos contra o LPS, sugerindo que a imunidade foi mediada por抗ígenos proteicos, mas que não foram identificados (Murray et al., 2010).

Frente as diversas limitações no desenvolvimento de vacinas clássicas contra a leptospirose, na última década, uma série de抗ígenos proteicos recombinantes foram avaliados quanto a capacidade de proteger contra a doença (Dellagostin et al., 2011). A lipoproteína leptospiral de 32kDa, LipL32 (Haake et al., 2000) foi descrita como um fator de virulência possuindo diversas características de抗ígenos protetores. É a proteína mais abundante na célula leptospiral, localizada na ME, expressa durante a infecção e altamente conservada em *Leptospira* spp. patogênicas e ausente em saprófitas. Além disso, LipL32 é a proteína mais abundante na célula (aproximadamente 40 mil cópias por célula), com função de ligação a componentes da matriz extracelular, além de ser o抗ígeno imunodominante. Surpreendentemente, um mutante de LipL32 manteve a virulência em hamsters, e não foi afetado na sua

capacidade para colonizar os túbulos renais de ratos (Murray et al., 2009). Originalmente identificado como um componente principal da superfície leptospiral (Cullen et al., 2005), sua localização na superfície foi recentemente reavaliada (Pinne and Haake, 2013). A LipL32 é uma das proteínas leptospirais mais estudadas (Murray, 2013) até o momento. A sua capacidade para provocar imunidade protetora contra a infecção aguda com vários sorovares foi relatada inúmeras vezes utilizando uma gama de abordagens em diferentes modelos animais (Branger et al., 2001, Branger et al., 2005, Seixas et al., 2007, Maneewatch et al., 2008, Grassmann et al., 2012). No entanto, uma série de fatores metodológicos utilizados nesses trabalhos geram dúvidas quanto a sua capacidade de proteção (Adler, 2015).

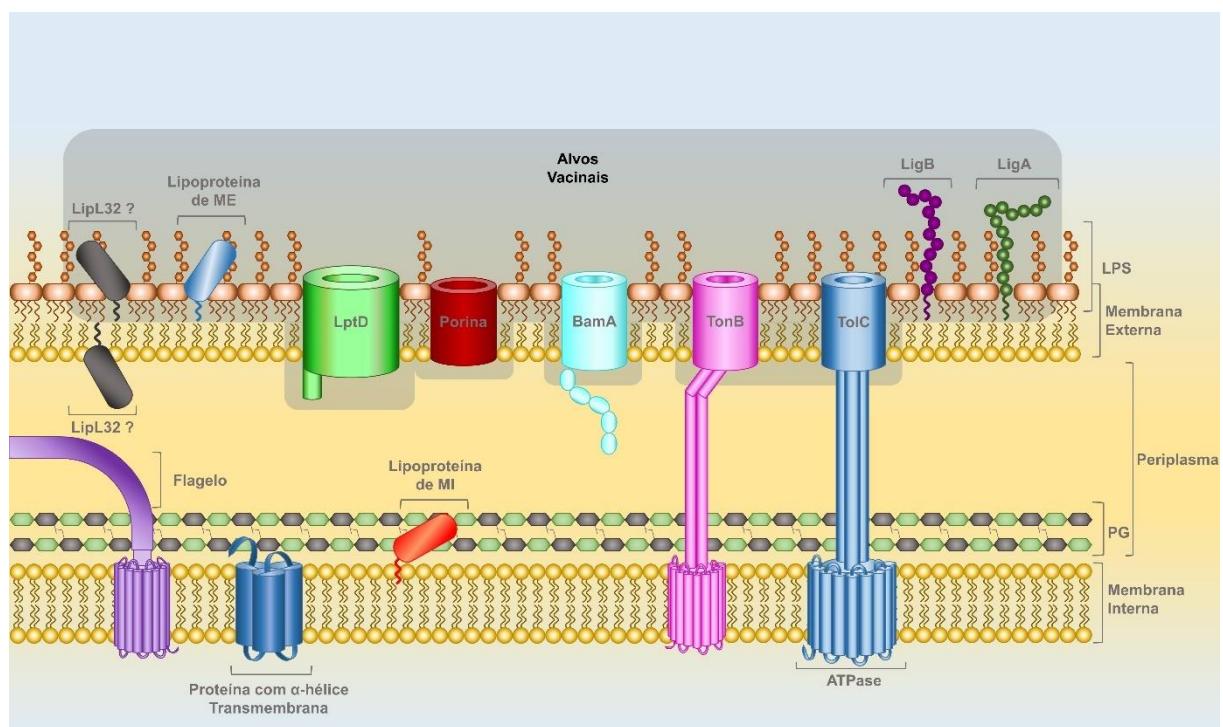
As proteínas Lig (LigA e LigB), foram amplamente investigadas quanto a participação na patogênese e a capacidade de induzir uma resposta imune protetora contra leptospirose. LigA é um dos alvos vacinais mais promissores, normalmente induzindo imunidade a 100% dos animais vacinados experimentalmente. Porém, esta proteína está presente em apenas 3 das 15 espécies capazes de causar leptospirose (*L. interrogans*, *L. noguchii* e *L. kirschneri*). Por outro lado, LigB está presente em todas as espécies patogênicas, com alta similaridade de sequência entre as espécies (Koizumi and Watanabe, 2004, Palaniappan et al., 2006, Silva et al., 2007, Faisal et al., 2008, Faisal et al., 2009, Yan et al., 2009, Cao et al., 2011, Coutinho et al., 2011, Lucas et al., 2011, Forster et al., 2013, Lourdault et al., 2014, Conrad et al., 2017). Como no caso dos estudos com LipL32, muitas das metodologias aplicadas geram resultados não definitivos, como a falta de reproduzibilidade e repetições (Adler, 2015c). Um estudo recente demonstrou que a imunização com LigB recombinante é capaz de gerar uma resposta imune protetora contra leptospirose no modelo hamsters de leptospirose aguda (Conrad et al., 2017). Porém, ainda não há evidência de que esta vacina experimental seja capaz de induzir proteção contra um desafio heterólogo.

Uma série de outras proteínas recombinantes foram testadas quanto à sua capacidade protetora, com destaque positivo para OmpL1, LipL41 (Haake et al., 1999) e LemA (Hartwig et al., 2013). Problemas semelhantes surgem com a maioria das alegações, que normalmente relatam um único experimento, falta de reproduzibilidade, sobrevivência de animais em grupos não vacinados e análise estatística deficiente. Murray et al. (2013) identificou 238 alvos vacinais em potencial e os avaliou em conjuntos de alguns poucos antígenos, em um modelo animal de colonização renal.

Nenhuma destas preparações vacinais apresentou proteção, mesmo aquelas que continham antígenos sabidamente protetores, como a LigA.

## 2.9 O alvo da Vacinologia Reversa: a membrana externa

As leptospiras são bactérias didermes, compostas por duas membranas, assim como bactérias Gram-negativas. Porém, devido a espessura de apenas 0,1 µm, elas não são prontamente observadas na coloração de Gram. A parede celular da bactéria apresenta uma MI (4 nm de espessura), uma camada de peptidoglicano (18 nm) e ME (5 nm) híbrida contendo LPS (9 nm), lipoproteínas e proteínas transmembrana (Raddi et al., 2012) – figura 3. A ME possui LPS em abundância, e este é considerado um importante fator de virulência em leptospiras (Werts et al., 2001, Nahori et al., 2005, Murray et al., 2010). Estes microrganismos têm nas suas extremidades uma estrutura *cap-like* de função ainda desconhecida (Raddi et al., 2012) e muitos quimiorreceptores que detectam diversos substratos e adaptam a direção da rotação flagelar baseado nas condições ambientais (Goldstein and Charon, 1990).



**Figura 3:** Esquema representativo dos componentes da membrana de leptospiras. Esta pode ser dividida em três compartimentos principais: ME contendo LPS e proteínas de superfície (Lipoproteínas e proteínas barril- $\beta$  transmembrana); Espaço periplasmático contendo os flagelos e uma camada de peptidoglicano; MI, onde se encontra ancorado o flagelo e estão presentes diversas outras proteínas internas [imagem adaptada de Grassmann et al. (2017b)].

Devido a abundância de LPS na superfície da bactéria, acredita-se que este seja essencial para a sobrevivência de leptospiras tanto dentro como fora do hospedeiro mamífero. Por apresentarem alta sensibilidade a anticorpos específicos para LPS, não é surpreendente que exista uma grande pressão seletiva para sofrer alterações genéticas que conduzam à variação do antígeno O, gerando a grande diversidade de sorovares presente no gênero (Haake and Zuckert, 2015).

Lipoproteínas são proteínas que sofrem modificações pós-traducionais (MPT) com adição de ácidos graxos em um resíduo de cisteína. Esta cisteína torna-se o resíduo amino-terminal depois que o peptídeo sinal (PS) é removido por uma peptidase de sinal de lipoproteínas. Uma vez que os ácidos graxos das lipoproteínas são extremamente hidrofóbicos, eles medeiam a ancoragem destas proteínas nas membranas (Haake and Zuckert, 2015). Estas proteínas são abundantes na MI e ME de leptospiras e permanecem estreitamente associadas às mesmas, mesmo após o tratamento com reagentes que removem as proteínas da periferia da célula (Matsunaga et al., 2002). A ancoragem pode se dar voltada para qualquer compartimento, ou seja, as lipoproteínas podem estar ancoradas no folheto externo ou interno da ME ou da MI. Em contraste com a hidrofobicidade dos ácidos graxos, os componentes proteicos da maioria das lipoproteínas são tipicamente hidrofílicos e relativamente solúveis em tampões aquosos quando expressos como proteínas recombinantes sem o seu PS. Dessa forma, os componentes proteicos das lipoproteínas podem projetar-se para fora das membranas, expondo-se na sua superfície (Haake and Zuckert, 2015).

Outra classe de proteínas que se encontram presentes na ME de leptospiras são as proteínas barril- $\beta$  transmembrana. Essas proteínas possuem uma série de segmentos hidrofóbicos com estrutura de folha  $\beta$  antiparalelos que atravessam a membrana de tal modo que a orientação das cadeias laterais de aminoácidos é 180° oposta à dos aminoácidos adjacentes, criando uma estrutura de barril. Isto permite com que as cadeias laterais de aminoácidos alternados interajam com a bicamada

lipídica ou com o poro aquoso do canal. Estas proteínas apresentam sempre uma porção exposta no periplasma e uma porção exposta na superfície da bactéria (composta principalmente pelos *loops* e *turns*). Estas proteínas encontram-se exclusivamente na ME de bactérias didermes, com função principal de transporte diverso, desde pequenas moléculas e íons metálicos, até proteínas e complexos moleculares (carboidratos e LPS). Algumas proteínas barril-β transmembrana podem ainda exercer funções diversas como a adesão celular (Haake and Zuckert, 2015).

## 2.10 Determinação *in vitro* da localização de proteínas em espiroquetas

Como descrito anteriormente, espera-se que alvos vacinais com potencial para induzir resposta imune protetora contra leptospirose estejam expostos na superfície da bactéria. A correta confirmação experimental da localização de proteínas na ME de *Leptospira*, bem como a determinação das porções expostas na superfície é de fundamental importância para o desenvolvimento de vacinas utilizando estas proteínas. A célula da *Leptospira* é bastante frágil, semelhantemente à outras espiroquetas como *Borrelia* spp. e *Treponema* spp. Manipulação *in vitro* que normalmente não causa danos à integridade de outras bactérias (como *E. coli*), tais como centrifugação >8000 ×g e pipetagem sucessiva, podem romper a ME de leptospiras ou até destruir completamente a estrutura celular. Isso é importante pois as técnicas focadas na determinação da localização celular de proteínas de ME expostas na superfície da bactéria precisam garantir a integridade da mesma para evitar que proteínas sejam erroneamente identificadas. Diversos métodos foram descritos até o momento na tentativa de determinar a localização celular de proteínas em *Leptospira*, incluindo imunoprecipitação de superfície (Haake et al., 1991), biotinilação de superfície (Cullen et al., 2003), proteólise de superfície (Pinne and Haake, 2009) e imunofluorescência de superfície (Pinne and Haake, 2011). Além destes, foram desenvolvidos vários métodos de fracionamento de células, incluindo o fracionamento com Triton X-114 ou X-100 (Haake et al., 1991, Zuerner et al., 1991, Matsunaga et al., 2002) e o isolamento de vesículas de ME por fracionamento de gradiente de densidade de sacarose (Haake and Matsunaga, 2002). A técnica de imunofluorescência em microesferas de agarose foi descrita com sucesso para

*Treponema* spp. e *Borrelia* spp. (Cox et al., 1995, Cox et al., 1996) mas ainda não foi aplicada em *Leptospira* spp.

O fracionamento celular e extração de vesículas de ME permitem a identificação de proteínas transmembrana e lipoproteínas ancoradas na mesma. A principal limitação desta abordagem é a incapacidade de determinação de quais lipoproteínas estão de fato expostas no folheto externo da ME. Além disso, as dificuldades práticas de execução desta técnica e necessidade de equipamentos específicos como ultracentrífugas reduzem a abrangência da mesma. Esta abordagem está ainda sujeita a identificação equivocada de proteínas extremamente abundantes na célula e que possam ser carregadas juntamente com a ME e vesículas de ME, mas que não estão associadas à membrana (Pinne and Haake, 2013).

A imunoprecipitação de superfície e a biotinilação de superfície são duas técnicas que se baseiam na marcação de proteínas expostas na superfície das células vivas e em suspensão. Na primeira, as leptospires são incubadas em suspensão contendo anticorpos gerados contra a bactéria, que as aglutina. Após coleta das células com anticorpos teoricamente ligados à抗ígenos de superfície, os mesmos são separados por ligação anticorpo-proteína A. Esta abordagem foi aplicada em leptospires previamente, mas as proteínas não foram precisamente identificadas devido às limitações técnicas da época (Haake et al., 1991). A biotinilação de superfície, por sua vez, baseia-se na ligação de biotina a proteínas de superfície e subsequente identificação e/ou isolamento utilizando streptavidina/avidina. Uma série de proteínas de ME de leptospires foram identificadas com auxílio da biotinilação de superfície, incluindo LipL21 (Cullen et al., 2003), OmpL37, OmpL47 e OmpL54 (Pinne and Haake, 2009). Ambas as técnicas estão sujeitas a ligação de anticorpos ou biotina a proteínas que não estão na superfície (por exemplo proteínas citoplasmáticas abundantes) mas permanecem em solução juntamente com as células vivas e intactas. A presença destes contaminantes (proteínas não expostas na superfície) se deve ao rompimento celular causado pela manipulação das células em solução durante o experimento ou pela morte celular durante crescimento *in vitro*. Estas proteínas parecem permanecer na amostra mesmo após lavagens, que por si só é um procedimento que pode provocar rompimento da célula de leptospires. Além disso, a ligação de anticorpos e aglutinação das leptospires normalmente matam a célula, promovendo rompimento de membranas e agravando o problema.

A proteólise de superfície é uma abordagem que visa a digestão enzimática de proteínas expostas na superfície, normalmente realizada por pK. Células intactas são sujeitas a uma curva crescente de quantidades diferentes de pK e quando as proteínas estão na superfície da bactéria são digeridas mesmo em pouca quantidade de enzima. Os extratos das células submetidos à proteólise são então analisados por Western blotting (WB) utilizando anticorpos gerados contra a proteína alvo do estudo. Se a mesma está na superfície será detectada na célula não tratada, mas não aparecerá na célula tratada com pK (pois foi digerida da superfície da bactéria). Esta abordagem normalmente envolve centrifugação das leptospiras para remoção do meio de cultura e adição de tampão para pK, que como dito, provoca rompimento celular. Além disso, algumas proteínas descritas como na superfície da bactéria pelo uso desta técnica, só tiveram reação negativa no WB (digestão e ausência da banda específica) com o uso de alta concentração de pK. Esta alta quantidade de proteólise de componentes da ME frequentemente expõe porções abaixo da superfície da bactéria, criando falsos positivos para superfície.

Atualmente, a técnica mais utilizada para determinação da localização de proteínas de superfície em *Leptospira* spp. é a chamada Imunofluorescência de superfície, técnica desenvolvida por Pinne and Haake (2011). Esta técnica baseia-se na fixação de leptospiras em lâminas de microscopia pelo uso de paraformaldeído. Em teoria, o tratamento por curto período (40 minutos) com baixa concentração de paraformaldeído (2%) utilizado nesta técnica, fixa as células enrijecendo sua estrutura e preservando a integridade da ME. Após fixada, a lâmina sofre bloqueio de ligações inespecíficas e reação com anticorpos, inicialmente contra a proteína alvo e em seguida um anticorpo conjugado com fluoróforo. As lâminas são observadas em microscopia de fluorescência, comparado a uma lâmina tratada da mesma forma, porém com leptospiras fixadas por metanol. Esta técnica foi desenvolvida visando a manutenção da integridade celular para detecção de proteínas de ME, expostas na superfície. Todavia, foi através desta técnica que foram descritas duas proteínas então denominadas Proteínas de Membrana Externa de Leptospira de 36 e 37 kDa, OmpL36 e OmpL37, respectivamente. OmpL37 demonstrou não ser um alvo protetor no modelo hamsters contra leptospirose (Oliveira et al., 2015), além de ser produzida como uma proteína recombinante solúvel (dados não publicados), característica não esperada para uma proteína transmembrana. Já OmpL36, inicialmente demonstrada

na superfície de *L. interrogans* por esta IF, foi recentemente descrita como uma proteína flagelar, nomeada FcpA e, portanto, localizada no flagelo periplasmático. O mutante *fcpA*<sup>-</sup> não é móvel, possui flagelo deficiente e descharacterizado, perdendo a capacidade de infectar hamsters e causar a leptospirose. A reintrodução do gene ao mutante (*fcpA*<sup>+/+</sup>) devolveu o fenótipo e virulência semelhante ao tipo selvagem, confirmando que OmpL36 na verdade é FcpA e não está presente na superfície da bactéria (Wunder et al., 2016a). Ainda assim, em geral, o recomendado para a correta determinação da localização de proteínas na ME é o uso desta IF de superfície acompanhada das outras metodologias descritas até aqui.

As diversas limitações apresentadas pelas técnicas atualmente disponíveis para determinação da localização de proteínas de ME de *Leptospira* spp. encorajam a busca por novas abordagens. As células de *Treponema* spp. e *Borrelia* spp. são ainda mais frágeis que a *Leptospira* spp., já que apesar de serem didermes, não possuem LPS na ME (Radolf et al., 2016). Há mais de 20 anos foi desenvolvida uma técnica para manipulação *in vitro* que garantia a integridade de *T. pallidum* durante IF para determinação de localização de抗ígenos de superfície. Esta técnica foi adaptada para *Borrelia* spp. e atualmente é utilizada rotineiramente para definir a localização de proteínas de ME para ambos os gêneros. Nesta abordagem, as espiroquetas vivas são aprisionadas em esferas de agarose de baixo ponto de fusão (ABPF), dispensando centrifugação, facilitando lavagens e garantindo a proteção à integridade da célula e em especial, a ME. Anticorpos penetram facilmente na malha de agarose, permitindo a realização da IF, cuja observação se dá pela simples visualização das esferas em lâminas de vidro no microscópio de fluorescência. Paralelamente à IF em esferas com espiroquetas intactas, outra IF é realizada da mesma forma, porém com a ME quimicamente permeabilizada (normalmente com tratamento de 0.1% de Triton X-100) seguida de reação com um anticorpo gerado contra uma proteína de sub-superfície (normalmente anti-flagelina). Diversas proteínas de ME de *Treponema* spp. e *Borrelia* spp. foram descritas com esta abordagem, que apesar de ser promissora, propondo resolver os problemas das técnicas para confirmação da localização de抗ígenos de superfície em *Leptospira* spp., até o momento não foi avaliada para o agente da leptospirose.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar abordagens para determinação da localização celular de proteínas preditas como expostas na superfície de *L. interrogans*, visando a adaptação para este patógeno da técnica de aprisionamento de espiroquetas em esferas de agarose de baixo ponto de fusão seguido de imunofluorescência.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Realizar mineração genômica em *L. interrogans* cepa Fiocruz L1-130 através de uma abordagem de Vacinologia Reversa e Estrutural para identificar novos alvos vacinais;
- Clonar genes de alguns destes alvos, expressar e purificar as proteínas recombinantes correspondentes;
- Clonar genes que codificam proteínas para uso como controle, baseado na localização celular das mesmas;
- Produzir anticorpos policlonais específicos contra cada alvo vacinal selecionado;
- Avaliar os anticorpos policlonais quanto a capacidade de ligação às proteínas recombinantes e nativas correspondentes por *Western blotting* e imunofluorescência com leptospiras permeabilizadas;
- Avaliar a técnica padrão para determinação da localização de proteínas de superfície em *Leptospira interrogans* utilizando os anticorpos obtidos;
- Adaptar a técnica de aprisionamento de espiroquetas em esferas de agarose para *L. interrogans*;
- Demonstrar a localização celular de alvos vacinais em potencial.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Condições de cultivo de *Leptospira interrogans* e *Escherichia coli*

*Leptospira interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 com poucas passagens *in vitro* (<10) foram continuamente cultivadas *in vitro* em meio EMJH. As culturas foram mantidas em tubos cônicos de 15 ml em cultura estática a 28 °C. Destes cultivos foram realizados repiques semanais, acompanhados de contagem das células bacterianas em câmara de Petroff-Hausser.

*Escherichia coli* cepas TOP10 e BL21 (DE3) Star (Invitrogen) foram crescidas em meio Luria-Bertani (LB) líquido e sólido. Quando necessário (na presença de vetores recombinantes) foram adicionados aos cultivos 100 µg/ml de ampicilina (AMP). Os cultivos foram mantidos a 37°C, sob agitação em meio líquido e estáticos em meio sólido.

### 4.2 Modelos animais e considerações éticas

Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) com aproximadamente 5 semanas foram utilizados para a produção de soro policlonal e implante de Câmaras de Membrana de Diálise (DMCs). Os animais permaneceram em microisoladores com dimensões de 30×20×13 cm, alojados em racks ventilados durante os experimentos. O fornecimento de água e ração foi *ad libitum*, e as caixas com camas de maravalha foram trocadas duas vezes por semana. Quando necessário, os animais foram anestesiados com coquetel anestésico composto de cetamina (50 mg/kg), xilazina (5 mg/kg) e acepromazina (1 mg/kg). Tramadol (500 µl/kg) foi administrado antes do procedimento cirúrgico e a cada 24 horas nos dois dias seguintes. A eutanásia dos animais foi realizada por aprofundamento da anestesia (inalação de isoflurano seguido de injeção intramuscular de um coquetel anestésico contendo 80 mg/kg de cetamina e 10 mg/kg de xilazina), seguida de exsanguinação cardíaca. Todos os procedimentos foram realizados conforme as recomendações do Conselho Nacional de Controle de

Experimentação animal (CONCEA), no qual possui registro no CEEA nº 4336-2015, e com supervisão do Médico Veterinário responsável.

#### **4.3 Cultivo de *L. interrogans* em Câmara de Membrana de Diálise**

Leptospiros foram crescidas *in vivo*, dentro de DMCs implantadas na cavidade peritoneal de ratos, conforme descrito anteriormente (Caimano et al., 2014, Grassmann et al., 2015). Foram utilizados tubos de membrana de dialise [Spectrapor; 8000 cut-off de peso molecular (PM)]. Os tubos de dialise foram preenchidos com 9-10 ml contendo  $10^4$  leptospiros/ml em EMJH suplementado com 10 mg/ml de albumina sérica bovina (BSA) adicionais para manter a pressão osmótica (total 20 mg/ml). As DMCs foram implantadas cirurgicamente na cavidade peritoneal de ratos Wistar previamente anestesiados, onde permaneceram durante 7-9 dias até que o cultivo de leptospiros atingisse a fase exponencial tardia de crescimento. Após esse período, as DMCs foram retiradas dos animais e em seguida as bactérias crescidas em DMCs foram transferidas para tubos de fundo cônico e volume de 15 ml. As bactérias foram enumeradas e utilizadas em ensaios subsequentes.

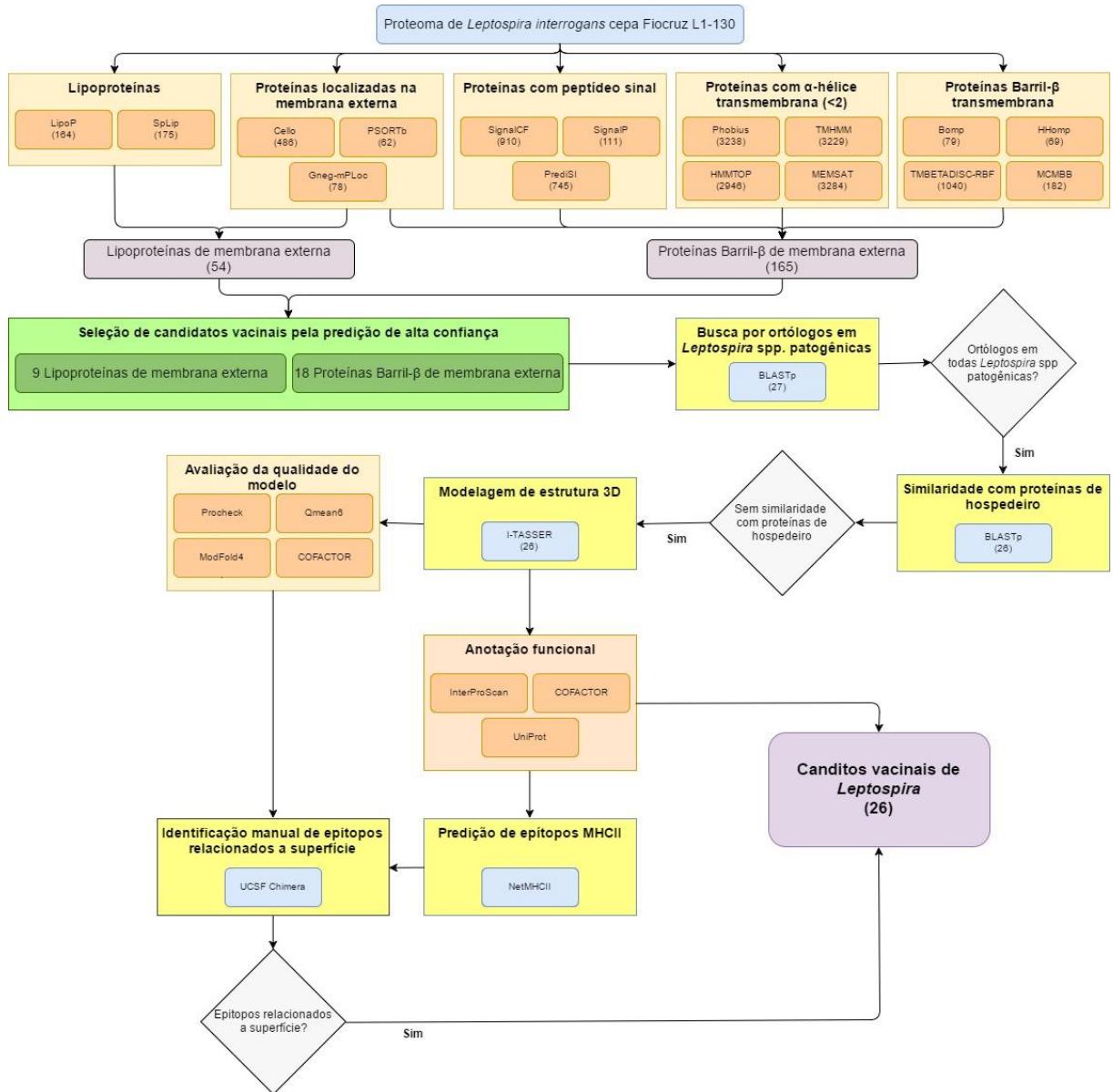
#### **4.4 Análise *in silico* do proteoma de *L. interrogans***

O proteoma de *L. interrogans* foi obtido a partir do GenBank (acesso AE016823.1 e AE016824.1) e analisado por diferentes softwares para identificação de alvos vacinais, especificamente proteínas barril-β transmembrana e lipoproteínas de ME, como descrito anteriormente (Grassmann et al., 2017a). LipoP e SpLip foram utilizados para a predição da presença de lipobox. Cello, PSORTb e Gneg-mPLoc para predição de proteínas localizadas na ME. O resultado destas análises foi agrupado para a predição de lipoproteínas de ME. SignalCF, SignalP e PrediSi foram executados em busca de proteínas que possuíam PS. Phobius, TMHMM, HMMTOP e MEMSAT foram utilizados para predição de proteínas com estrutura α-hélice transmembrana. Bomp, HHomp, TMBETADISC-RBF e MCMBB foram executados

para identificar proteínas com estrutura barril- $\beta$  transmembrana. Proteínas barril- $\beta$  transmembrana foram preditas pela combinação destas predições, conforme figura 3.

Os resultados destes dois grupos foram ranqueados utilizando um script escrito na linguagem Python (chamado Covira), visando identificar as proteínas preditas com maior confiabilidade em relação às análises realizadas por diferentes softwares, baseado em concordância de predição. Após essa triagem, com a finalidade de confirmar a presença dessas proteínas em outras espécies patogênicas de *Leptospira*, foram identificados ortólogos utilizando o método de melhor hit reciproco (RBH) baseado nas buscas no BLASTp. As proteínas com >70% de similaridade e >40% de cobertura e que também tiveram o melhor hit reciproco foram consideradas ortólogas. Uma segunda análise com BLASTp foi realizada utilizando os bancos de dados de proteínas de hospedeiros de leptospires em potencial (humanos, cães, bovinos, equinos e ovinos) a fim de evitar semelhança destas com os alvos vacinais.

As proteínas que passaram pelas análises anteriores tiveram sua estrutura tridimensional predita pelo I-TASSER, com a finalidade de reforçar as predições anteriores e identificar possíveis epítopos que se encontram expostos na ME. Os modelos preditos foram avaliados quanto a sua qualidade pelos softwares Procheck, Qmean6, ModFold4 e COFACTOR. Foi realizada também a anotação funcional destas proteínas através do InterProScan, COFACTOR e UniProt. Após esta análise, utilizando o software NetMHCII, foi realizada a predição dos epítopos reconhecidos pelo Complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHCII) com alta afinidade. Por último, foi realizada a identificação manual de epítopos expostos na superfície com o auxílio do programa UCSF Chimera. O esquema das análises está resumido na figura 4.



**Figura 4.** Fluxograma das análises *in silico*. Análises realizadas para a predição de proteínas candidatas a antígenos vacinais contra leptospirose, figura adaptada de Grassmann et al. (2017a).

#### 4.5 Amplificação e clonagem das sequências codificadoras

O DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 foi extraído com o auxílio do kit *illustra bacteria genomicPrep mini spin* (GE Healthcare Life Sciences), seguindo as recomendações do fabricante. Após a extração, o DNA genômico foi armazenado a -20 °C até o uso. Os genes que codificam cada uma das

proteínas de *L. interrogans* selecionadas nas etapas anteriores foram utilizados para desenhar primers específicos a partir do software *Vector NTI Advance 11*. Esses primers foram utilizados para amplificação das respectivas sequências codificadoras através da técnica de PCR. A PCR foi executada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos; anelamento a temperaturas variáveis dependendo do primer (56-60 °C) por 45 segundos; extensão a 72 °C por 30 segundos e por fim, extensão final de 72 °C por 7 minutos. Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%, nos quais foram confirmados os fragmentos de DNA de tamanhos correspondentes a cada gene amplificado. Em seguida, os produtos da PCR foram purificados com o kit *ilustra GFX PCR DNA and gel band purification* (GE Healthcare Life Sciences) de acordo com as orientações do fabricante.

Os fragmentos amplificados por PCR purificados foram inseridos em vetor pAE para propagação e expressão em *E. coli*. Votor e inserto foram submetidos a digestão por endonucleases de restrição por incubação a 37 °C por 1 hora. Após a digestão, votor e inserto foram purificados novamente e a ligação de ambos foi realizada utilizando T4 DNA ligase (16 horas a 16 °C). No dia posterior, a reação foi utilizada para transformar *E. coli* TOP10 por choque térmico (Sambrook and Russell, 2000). A bactéria foi então cultivada em placa contendo LB sólido + AMP, 16 horas a 37 °C. Após o crescimento da bactéria, colônias foram selecionadas para verificação da presença do votor recombinante através de extração de DNA plasmidial e observação em gel de agarose (0,8%). Confirmados os recombinantes, o DNA propagado foi usado para expressão das sequencias alvo. Cada votor pAE recombinante foi caracterização por endonucleases de restrição e por sequenciamento de DNA pelo método de Sanger automatizado.

#### **4.6 Expressão, purificação e caracterização das proteínas recombinantes**

Cada votor recombinante contendo a sequência codificadora para uma das proteínas selecionadas foi utilizado para transformar *E. coli* BL21 (DE3) Star. As culturas foram crescidas em meio LB com a adição de 100 µg/ml de AMP, a 37 °C, em agitação até que atingissem a absorbância de 0,6-0,8 em densidade óptica de 600

nm (fase log de crescimento). Nesse momento elas foram induzidas a expressar a proteína recombinante pela adição de 1 mM de Isopropil  $\beta$ -D-tiogalactosídeo (ITPG), recebendo nova incubação nas mesmas condições por 3-4 horas. Após a indução foi realizada a coleta das células por centrifugação e o *pellet* de células foi congelado para posterior avaliação. Uma alíquota de células induzidas para cada proteína foi utilizada para análise da expressão por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). O *pellet* de células foi suspenso em solução de lise celular ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 20 mM) e posteriormente sonicado. Em seguida as células lisadas foram centrifugadas a  $12000 \times g$  por 40 minutos e o sobrenadante contendo as proteínas solúveis neste tampão foi armazenado a 4 °C após adição de *phenylmethylsulfonyl fluoride* (PMSF). O *pellet* foi suspenso no mesmo tampão de lise, acrescido de 8 M de ureia. Após uma nova centrifugação nas mesmas condições, o sobrenadante contendo as proteínas insolúveis foi separado do *pellet* e armazenado a 4 °C. Ambas as frações insolúveis e solúveis foram analisadas por SDS-PAGE para identificar a solubilidade da proteína recombinante.

As proteínas recombinantes foram purificadas através de cromatografia de afinidade de metal imobilizado (IMAC), utilizando uma coluna His-Trap FF com níquel, no sistema automatizado AKTA-Start (GE). As proteínas ligadas a coluna através da cauda de histidina (6×His) foram eluídas sobre 20 volumes de coluna com o eluente ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20 mM, 500 mM NaCl, pH 8,0) em um gradiente de 20 a 500 mM de Imidazol. As frações de eluição foram avaliadas por SDS-PAGE, e aquelas que continham a proteína purificada foram combinadas e dialisadas contra o tampão fosfato-salino (PBS) a 4°C em homogeneizador (uma hora de intervalo entre as dialises, 6 trocas de PBS ao total). As alíquotas purificadas e dialisadas foram combinadas, PMSF foi adicionado novamente, e as proteínas purificadas foram armazenadas a 4°C até serem quantificadas. A quantificação das proteínas foi realizada utilizando kit comercial BCA Pierce (Thermo) através do método do Ácido Bicinconílico (BCA). As proteínas recombinantes purificadas e quantificadas foram novamente analisadas por SDS-PAGE juntamente com curva de diferentes concentrações de BSA e caracterizadas por WB utilizando anticorpos específicos contra a cauda de 6 histidinas (anti-6×His).

#### **4.7 Produção de anticorpos policlonais contra as proteínas preditas como localizadas na membrana externa de *L. interrogans***

Para obtenção dos anticorpos policlonais (pAb), dois ratos para cada proteína foram inoculados com 50 µg de proteína recombinante, diluída em PBS e emulsificada com volume equivalente de adjuvante de Freund (primeira dose com adjuvante completo e demais doses com incompleto) pela via intraperitoneal. Os inoculados possuíram intervalos de três semanas entre a primeira e segunda dose e duas semanas entre as demais doses. O número de reforços variou entre dois e três, dependendo da capacidade de reconhecimento dos anticorpos as proteínas no qual eram testados por WB. O sangue dos animais foi coletado por punção cardíaca após overdose de anestésico e armazenado a 4 °C por uma hora para coagulação. Em seguida o soro foi separado por centrifugação a 5000 × g por 5 min a 4 °C. O soro contendo pAbs contra cada proteína recombinante foi identificado, alíquotado e armazenado a -20 °C para posterior uso.

#### **4.8 Caracterização dos pAbs por *Western blotting***

Os pAbs produzidos contra cada proteína foram testados através da capacidade de reconhecer sua respectiva proteína recombinante em diversas concentrações e sua proteína nativa obtidas por cultivos *in vitro* a 28 °C e em DMCs. Para realização da técnica de WB foram realizados SDS-PAGE contendo 200 a 1,5 ng de proteína recombinante ou extrato bruto de *L. interrogans* L1-130 ( $2 \times 10^8$ ) por poço no gel. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose. O bloqueio da membrana foi realizado com solução de leite em pó 5% em PBS durante uma hora, em temperatura ambiente, sob agitação. Para a detecção das proteínas nativas e recombinantes, foi utilizada a diluição de 1:1000 dos pAbs produzidos contra cada proteína e anticorpos anti-rato conjugados a *Horseradish peroxidase* (HRP). Cada incubação com anticorpos seguiu os mesmos detalhes da etapa de bloqueio. Após a última incubação com anticorpo secundário, foi feita a revelação utilizando solução reveladora (Tris-HCl 50 mM pH 7.6, NiSO<sub>4</sub> 0,03%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 3,3' diaminobenzidina - DAB) até que as bandas ficassem suficientemente coradas.

#### **4.9 Imunofluorescência em *L. interrogans* fixada por metanol**

Leptospiros com poucas passagens *in vitro* (<10) foram cultivadas a 28 °C e quando atingiram fase log de crescimento foram depositadas diretamente sobre lâminas de vidro (aproximadamente  $10^6$  leptospiros por ponto na lâmina) e incubadas a temperatura ambiente até que o líquido (meio de cultura) secasse. Em seguida, as lâminas foram incubadas com metanol previamente gelado (-20°C) durante 10 minutos a -20 °C para permeabilizar a membrana, desnaturar (parcialmente) as proteínas e fixar as leptospiros. Os anticorpos (pAbs e mAbs) em diferentes diluições foram adicionados diretamente sobre a lâmina e a reação foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente. Após 4 lavagens (3 com PBS-T e 1 com água), foi adicionado anti-Ig de rato conjugado a FITC 1:1000. Após novas lavagens a lâmina foi montada, adicionando o marcador de DNA DAPI, presente no meio de montagem (Fluoroshield, Sigma-Aldrich). Os controles utilizados incluíram o extrato bruto de leptospiros (para controle positivo da reação) e o soro negativo, de animal que não foi inoculado (para controle negativo de reações não-específicas). A análise das lâminas foi realizada por visualização das bactérias em microscópio de imunofluorescência e todas as imagens foram obtidas utilizando a mesma exposição para cada filtro.

#### **4.10 Imunofluorescência de superfície**

Foram realizados ensaios de IF com as bactérias depositadas diretamente sobre as lâminas. O protocolo utilizado foi adaptado de Pinne and Haake (2009). Leptospiros cultivadas a 28 °C com poucas passagens *in vitro* (<10) e em fase log de crescimento foram coletadas por centrifugação a 2000 ×g por 7 min em temperatura ambiente e em seguida foram gentilmente ressuspendidas em PBS-5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.2. O ensaio foi realizado sobre um ponto na lâmina, onde as leptospiros foram depositadas no centro de uma marcação circular. As células ficaram aderindo às lâminas durante 80 minutos e em seguida foram incubadas ou com metanol previamente gelado (-20 °C) durante 20 minutos a -20 °C para permeabilizar a

membrana, desnaturar parcialmente as proteínas e fixar as leptospiras ou com paraformaldeído 2% (diluído em PBS-5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.2) durante 40 minutos a 28 °C para manter a integridade da membrana. A solução de bloqueio de ligações inespecíficas utilizada foi BSA 1% (diluída em PBS) e a incubação realizada a 28 °C por 90 minutos. Todos os volumes utilizados foram de 300 µl por lâmina, incluindo os cultivos ( $5 \times 10^8$  células em 300 µl). O marcador de DNA utilizado para a detecção de leptospiras independente da ligação dos anticorpos foi o DAPI, presente no meio de montagem (Fluoroshield, Sigma-Aldrich). Os controles utilizados incluíram o extrato bruto de leptospiras (controle positivo para superfície), as flagelinas FlaA1, FlaB1 e FcpA (controle de sub-superfície) e o soro negativo, de animal que não foi inoculado (controle negativo para reações não-específicas). Também foram avaliados mAbs anti-LipL32 e anti-LigB. A diluição dos pAbs e mAbs variaram de 1:25 a 1:300, enquanto que a diluição do anti-rato (ou anti-camundongo para os mAbs) conjugado a FITC foi de 1:1000 e foram incubados por 1 hora e 45 minutos, respectivamente. A análise das lâminas foi realizada por visualização das bactérias em microscópio de imunofluorescência e todas as imagens foram obtidas utilizando a mesma exposição para cada filtro.

#### **4.11 Imunofluorescência em microesferas de agarose**

Os ensaios de IF em microesferas de agarose foram realizados com adaptações a partir do protocolo de Cox et al. (1995). Uma solução de 2% de ABPF tipo VII foi preparada em PBS e mantida a 42 °C em banho maria. Uma cultura de  $1 \times 10^8$  células em 0,5 ml de EMJH foi adicionada em um tubo de 50 ml e mantida aquecida a 42 °C por 45-60 s, até que fosse adicionado 0,5 ml da ABPF também aquecida a 42 °C. Em seguida o conteúdo do tubo foi misturado por vortex leve (15-20 s) e retornou ao banho maria a 42 °C (30 s). Cinco ml de óleo mineral a 42 °C foi adicionado ao tubo e foi homogeneizado por vortex (10-15 s), e os tubos foram rapidamente transferidos para gelo, onde permaneceram por 5 minutos. Foi adicionado 5 ml de PBS e as esferas foram coletadas por centrifugação a 500 ×g por 15 minutos.

Aproximadamente 50 µl de esferas (contendo as leptospiras) foram transferidas para tubos de 1,5 ml e processadas em PBS para manter a membrana íntegra; Triton X-100 (0,00001, 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 5, 10 e 25%); Triton X-114 (0,00001, 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 5, 10 e 25%); EDTA (10, 25, 50, 75 e 100 mM); etanol (0,5, 1, 2,5, 5 e 10, 50, 70 e 80%); metanol (puro) ou EDTA + etanol (100 mM e 50%, respectivamente) para permeabilização da ME e lise celular. O tempo de cada tratamento variou de 10 a 30 minutos em temperatura ambiente (20-25 °C). Os pAbs ou mAbs, puros ou em diluições de até 1:1000, foram incubados em agitação junto as esferas a 4 °C por 16 horas. Na etapa seguinte foi adicionado o anti-Ig de rato (ou anti-Ig de camundongo) conjugado a FITC na diluição de 1:1000 e incubado em agitação por 1 hora em temperatura ambiente. Para marcação do DNA da bactéria, as amostras foram incubadas por 30 minutos com Hoechst ou montadas diretamente com meio de montagem contendo DAPI (Fluoroshield, Sigma-Aldrich). Os controles utilizados incluíram o extrato bruto de leptospiras (para controle positivo da reação) e o soro negativo, de animal que não foi inoculado (para controle negativo de reações não-específicas). A observação das leptospiras foi realizada por microscopia de imunofluorescência. Todos os ensaios foram realizados comparando os mesmos soros entre si em diferentes tratamentos (células íntegras e permeabilizadas).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Identificação *in silico* de alvos vacinais contra leptospirose

A análise de VR realizada utilizando diversas ferramentas de bioinformática para minerar o genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 em busca de proteínas que compõem a superfície de espécies patogênicas de *Leptospira* está descrita em detalhes em Grassmann et al. (2017a). Esta análise resultou em uma lista inicial de 165 proteínas barril-β de membrana externa (bβ-OMPs) e 54 lipoproteínas da ME. Dentre estas 219 proteínas, 18 bβ-OMPs e 9 lipoproteínas da ME foram selecionadas baseadas na predição de alta confiança (utilizando o algoritmo CoVira). Estas proteínas foram analisadas quanto a presença de ortólogos em outras *Leptospira* spp.; uma lipoproteína de ME foi removida da lista por não apresentar ortólogos na maioria das espécies patogênicas. As demais proteínas selecionadas apresentam ortólogos em todas as espécies patogênicas. Nenhuma das proteínas restantes apresentou similaridade com proteínas de hospedeiros de *Leptospira*. A modelagem estrutural foi realizada com sucesso para todas as proteínas selecionadas, gerando modelos com grau de qualidade satisfatório. A anotação funcional das 18 bβ-OMPs selecionadas está descrita na tabela 1. Como esperado, a maioria das bβ-OMPs apresentou domínios relacionados a esta conformação estrutural, por exemplo receptores dependentes de TonB (TBDR), transportadores, bombas de efluxo (TolC), dentre outros. Todas estas proteínas apresentaram epítopes imunogênicos preditos por bioinformática com alto grau de afinidade a diferentes receptores de MHCII humano. A alocação estrutural destes epítopes imunogênicos permitiu a identificação de porções imunogênicas das bβ-OMPs expostas na superfície de *L. interrogans* – figura 2 em (Grassmann et al., 2017a).

No alinhamento da sequência da bβ-OMP LIC10881 com as sequências de seus ortólogos em outras *Leptospira* spp. indicou que a proteína da cepa L1-130 apresentava a ausência de uma porção C-terminal. Ao analisar o genoma, foi constatado uma possível falha no sequenciamento do gene correspondente, que quando corrigido para o consenso entre as espécies, fusionava as sequências de

LIC10881 com LIC10882. Um novo alinhamento da nova sequência (LIC10881+LIC10882) com os ortólogos de LIC10881 indicou que a ausência da porção C-terminal não existia mais.

**Tabela 1.** Anotação funcional das 18 b $\beta$ -OMPs preditas por bioinformática. Proteínas preditas como novos alvos vacinais e anotação funcional das sequências correspondentes.

Gene	Produto/Anotação original <sup>1</sup>	Análise no InterProScan
LIC10496	<i>conserved hypothetical protein</i>	<i>Outer membrane efflux protein</i>
LIC10714	<i>outer membrane receptor protein</i>	<i>TonB-dependent receptor</i>
LIC10881	<i>outer membrane protein, TonB dependent</i>	<i>TonB-dependent receptor (plug and beta-barrel domains)<sup>2</sup></i>
LIC10896	<i>TonB-dependent outer membrane receptor</i>	<i>TonB-dependent receptor</i>
LIC10964	<i>TonB-dependent outer membrane hemin receptor</i>	<i>TonB-dependent receptor</i>
LIC11086	<i>conserved hypothetical protein</i>	<i>MetA-pathway of phenol degradation, putative</i>
LIC11211	<i>hypothetical protein</i>	<i>none predicted</i>
LIC11268	<i>conserved hypothetical protein</i>	<i>Alginate export domain</i>
LIC11458	<i>outer membrane protein, porin superfamily</i>	<i>none predicted</i>
LIC11506	<i>outer membrane protein</i>	<i>Predicted outer membrane protein, Leptospiraceae</i>
LIC11623	<i>outer membrane protein</i>	<i>Bacterial surface antigen (D15) / Surface antigen variable number</i>
LIC12254	<i>outer membrane protein</i>	<i>Bacterial surface antigen (D15)</i>
LIC12374	<i>outer membrane protein, TonB dependent</i>	<i>TonB-dependent receptor, beta barrel, plug domain</i>
LIC12575	<i>cytoplasmic membrane protein</i>	<i>Outer membrane efflux protein</i>
LIC13477	<i>conserved hypothetical protein</i>	<i>none predicted</i>
LIC20019	<i>conserved hypothetical protein</i>	<i>Putative porin/Porin 6</i>
LIC20087	<i>outer membrane protein</i>	<i>none predicted</i>
LIC20151	<i>TonB-dependent outer membrane receptor</i>	<i>TonB-dependent receptor, beta barrel (IPR000531), plug domain (IPR012910)</i>

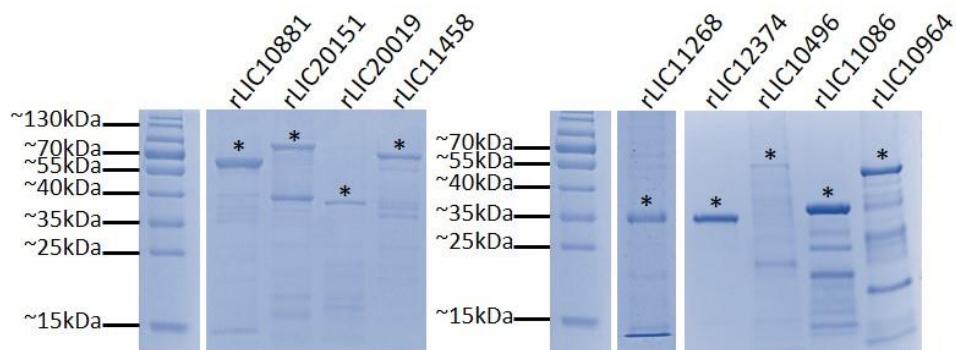
<sup>1</sup>Tal qual anotada no genoma de *L. interrogans* L1-130.

<sup>2</sup>Referente à sequência de LIC10881 e LIC10882 corrigidas.

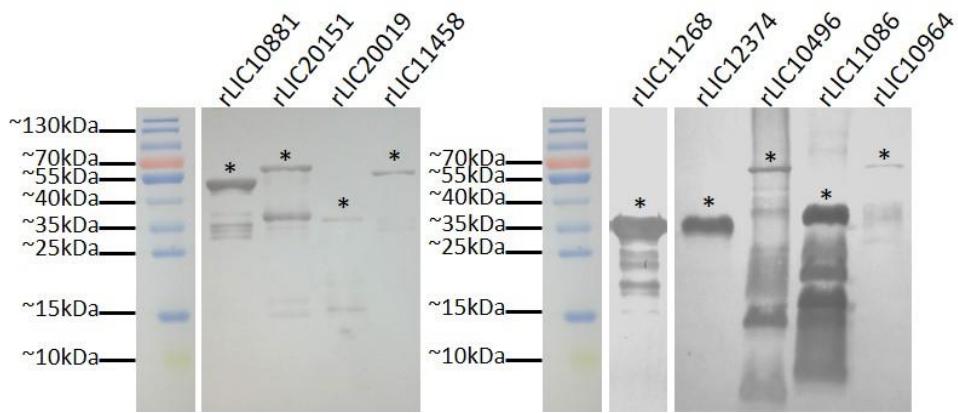
## 5.2 Clonagem e expressão de proteína recombinantes

Das 18 b $\beta$ -OMPs, foram selecionadas nove proteínas para análise de localização celular (Tabela 1). Para isso, as sequências codificadoras foram amplificadas por PCR, clonadas no vetor pAE e expressas em *E. coli*. Todas as proteínas recombinantes foram expressas em corpos de inclusão e necessitaram de solubilização utilizando tampão de solubilização com desnaturante (contendo ureia). As proteínas foram purificadas, dialisadas contra PBS e analisadas por SDS-PAGE (Figura 5). Além destas, outras proteínas de interesse foram produzidas da mesma forma: rFlaA1, rFlaB1, rFcpA, rLigBrep, rLcpA e rLenA. As primeiras três são proteínas flagelares (Wunder et al., 2016a), enquanto as últimas são lipoproteínas descritas como proteínas expostas na superfície de *L. interrogans* (Barbosa et al., 2010, Verma et al., 2010, Matsunaga et al., 2013). Devido ao alto PM de algumas destas proteínas, como LIC11458 (113 kDa), LIC10964 (86 kDa) e LigB (200 kDa), apenas porções dos genes que as codificam foram clonados para expressão de respectivas porções recombinantes.

A análise em SDS-PAGE das proteínas b $\beta$ -OMPs purificadas (Figura 5) confirmam o PM aparente esperado (Tabela 2) para cada proteína recombinante. Várias destas proteínas apresentam bandas adicionais de menor PM. Estas bandas foram reconhecidas pelo anticorpo anti-6 $\times$ His no WB (Figura 6).



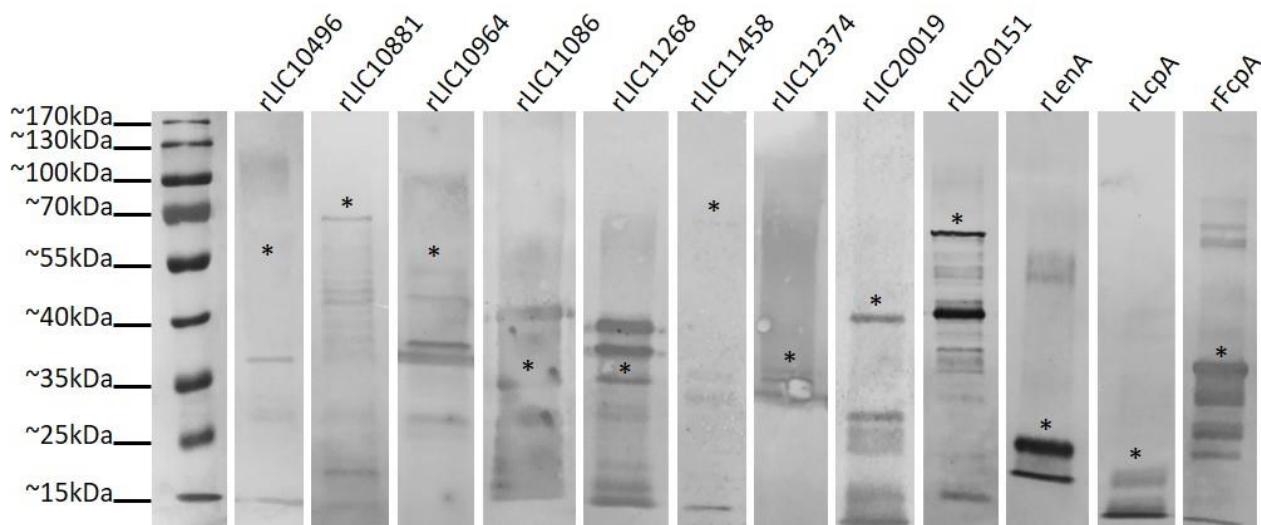
**Figura 5:** SDS-PAGE: Expressão de proteínas recombinantes. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% apresentando as proteínas barril- $\beta$  transmembrana de ME expressas em *E. coli* e purificadas por cromatografia de afinidade. As proteínas foram dialisadas contra PBS antes da realização do SDS-PAGE. O asterisco representa o tamanho de banda correspondente a proteína recombinante. A coluna da esquerda corresponde ao marcador de peso molecular *PageRuler Prestained* (ThermoFisher Scientific).



**Figura 6:** *Western blotting*: reconhecimento das proteínas recombinantes pelo anticorpo anti-histidina. WB após separação por eletroforese das proteínas barril- $\beta$  transmembrana de ME para o reconhecimento destas com anticorpo anti-histidina conjugado a HRP. O asterisco representa o tamanho de banda correspondente a proteína recombinante. A coluna da esquerda corresponde ao marcador de peso molecular *PageRuler Prestained* (ThermoFisher Scientific).

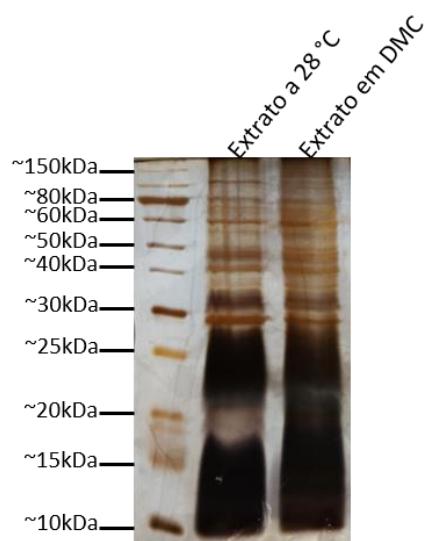
### 5.3 Obtenção e caracterização dos anticorpos policlonais

Após as inoculações de ratos, foram obtidos pAbs capazes de reconhecer as proteínas recombinantes utilizadas na inoculação. A tabela 2 apresenta a quantidade mínima detectada de cada proteína recombinante no WB utilizando o soro específico para cada proteína. As quantidades detectadas variaram de 1,5 ng para os soros anti-rLIC11086, anti-rFlaA1 e anti-rFcpA até 200 ng para o soro anti-rLIC11458. A figura 7 apresenta as reações obtidas com cada pAb em relação a proteína recombinante correspondente. Nesta figura, são mostradas as reações contra 200 ng de cada proteína.

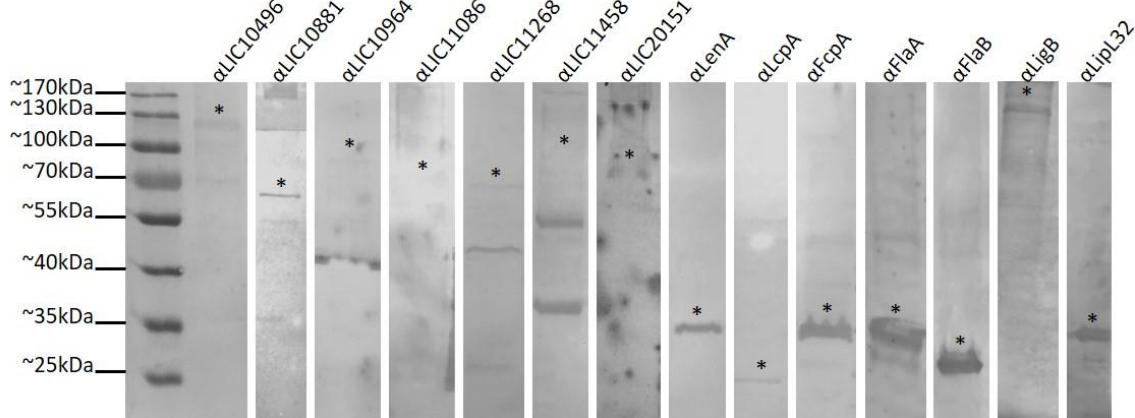


**Figura 7:** *Western blotting*: reconhecimento das proteínas recombinantes pelos seus respectivos pAbs. Foi adicionado 200 ng de cada proteína recombinante por poço. O asterisco representa o tamanho de banda correspondente a proteína recombinante. A coluna da esquerda corresponde ao marcador de peso molecular *PageRuler Prestained* (ThermoFisher Scientific).

Os pAbs gerados também foram avaliados quanto a capacidade de reconhecimento da proteína nativa por WB. Para isso, foram separados por SDS-PAGE extratos brutos de *L. interrogans* crescida *in vitro* e cultivadas em DMCs (Figura 8). Os extratos foram eletrotransferidos para membrana de nitrocelulose e reagidos com os pAbs contra cada proteína de interesse. A maioria dos anticorpos (13/16) reconheceu a proteína alvo no extrato de *L. interrogans* obtida de pelo menos uma das condições de cultivo (Figura 9). Em alguns casos (LIC11086, LIC12374, LIC20019), não foi possível detectar bandas no WB ou a reação observada era de baixa intensidade, impossibilitando conclusões ou documentação apropriada da reação. Nestes casos, os resultados foram considerados inconclusivos. O pAb anti-rLIC10496 reconheceu uma proteína de cerca de 120 kDa, sendo que uma cadeia polipeptídica desta proteína deveria ter PM de aproximadamente 57,7 kDa. Esta proteína foi predita como um TolC, o componente da ME de uma bomba de efluxo (Tabela 1), normalmente assumindo a estrutura quaternária de trímero, portanto, aparentemente a banda observada sugere que são dímeros da proteína (configuração intermediária). Também foi avaliado um anticorpo monoclonal anti-LipL32, que reconheceu especificamente a LipL32 nativa.



**Figura 8:** SDS-PAGE: Extrato bruto de *L. interrogans* L1-130. Foram analisados extratos cultivados *in vitro* (28 °C) ou em DMCs. O gel foi corado por impregnação por prata. A coluna da esquerda corresponde ao marcador de peso molecular *Unstained Protein Ladder* (New England BioLabs).



**Figura 9:** *Western blotting*: reconhecimento das proteínas nativas pelos seus respectivos pAbs. Para o preparo do extrato bruto foram utilizados  $2 \times 10^8$  leptospiras/coluna de *L. interrogans* L1-130 cultivadas *in vitro* a 28°C. O asterisco representa o tamanho de banda correspondente a proteína nativa. A coluna da esquerda corresponde ao marcador de peso molecular *PageRuler Prestained* (ThermoFischer Scientific).

**Tabela 2.** Análise geral das proteínas e anticorpos. Resumo das análises aplicadas as proteínas selecionadas e aos anticorpos policlonais correspondentes.

Alvo do PAb	Proteínas (kDa)			Detecção da proteína em WB			Imunofluorescência				
	Proteína recombinante <sup>1</sup>	Proteína nativa, predito <sup>2</sup>	Proteína nativa, observado <sup>3</sup>	DMC	IVC	LD (ng) <sup>4</sup>	Fixada por metanol	IF de superfície	IF em esferas de agarose		
								Intacta	Lisada	Intacta	Lisada
LIC10496	55,9	57,6	~120*	P	P	12,5	P	S	S	NA	NA
LIC10881	61,9	63,2	~65	P	P	12,5	P	P	P	NA	NA
LIC10964	55,0	86,6	~85	P	P	100	P	S	P	NA	NA
LIC11086	36,7	37,4	~60?	IC	IC	1,5	S	S	S	NA	NA
LIC11268	35,2	68,8	~70	IC	P	12,5	P	S	P	NA	NA
LIC11458	65,4	113,6	~115	IC	P	200	P	S	P	NA	NA
LIC12374	34,8	80,2	x	IC	IC	25	S	S	P	NA	NA
LIC20019	39,5	43,4	x	IC	IC	12,5	P	S	P	NA	NA
LIC20151	63,8	80,9	~80	P	P	12,5	P	S	S	NA	NA
LigB/LigA	54,0	200,8/128,1	~200 e ~130	P	P	3,12	P	S	P	P	P
LcpA (LIC11947)	20,0	22,6	~22	P	P	3,12	P	S	P	P	P
LenA (LIC10009)	24,0	27,7	~34	P	P	6,25	P	S	P	S	S
FlaA1	33,0	34,9	~35	P	P	1,5	P	S	S	NA	NA
FlaB1	32,0	31,3	~30	P	P	25	P	S	P	S	S
FcpA (LIC13166)	35,7	36,2	~35	P	P	1,5	P	P	P	S	P
LipL32	28,5	29,6	~30	P	P	NA	P	NA	NA	P	P

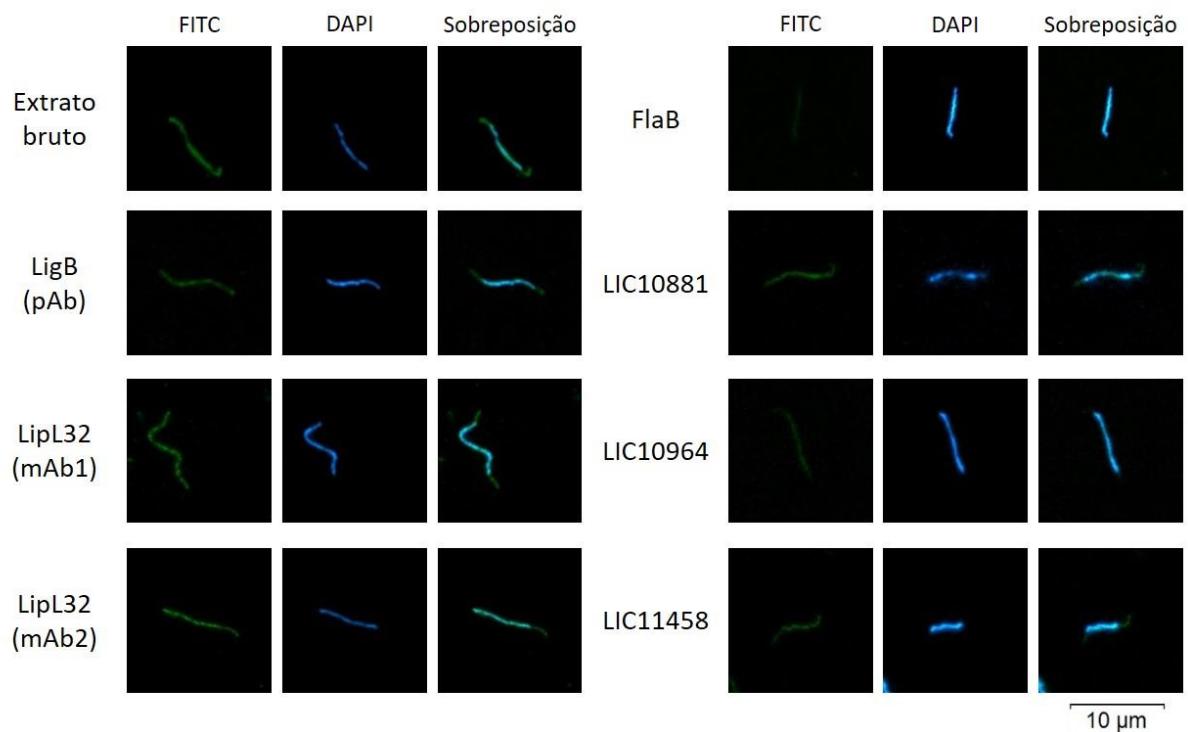
<sup>1</sup>Predito pelo Vector NTI 11. <sup>2</sup>Predito pelo Uniprot. <sup>3</sup>Conforme observado na figura 9. <sup>4</sup>Quantidade mínima de proteína recombinante detectada por WB utilizando pAb específico. IC = inconclusivo. LD = Limite de Detecção. NA = não avaliado. P = detecção positiva. S = sem detecção. DMC = câmara de membrana de diálise. IVC = cultura *in vitro*. IF = imunofluorescência.

#### **5.4 Imunofluorescência de *L. interrogans* fixada com metanol**

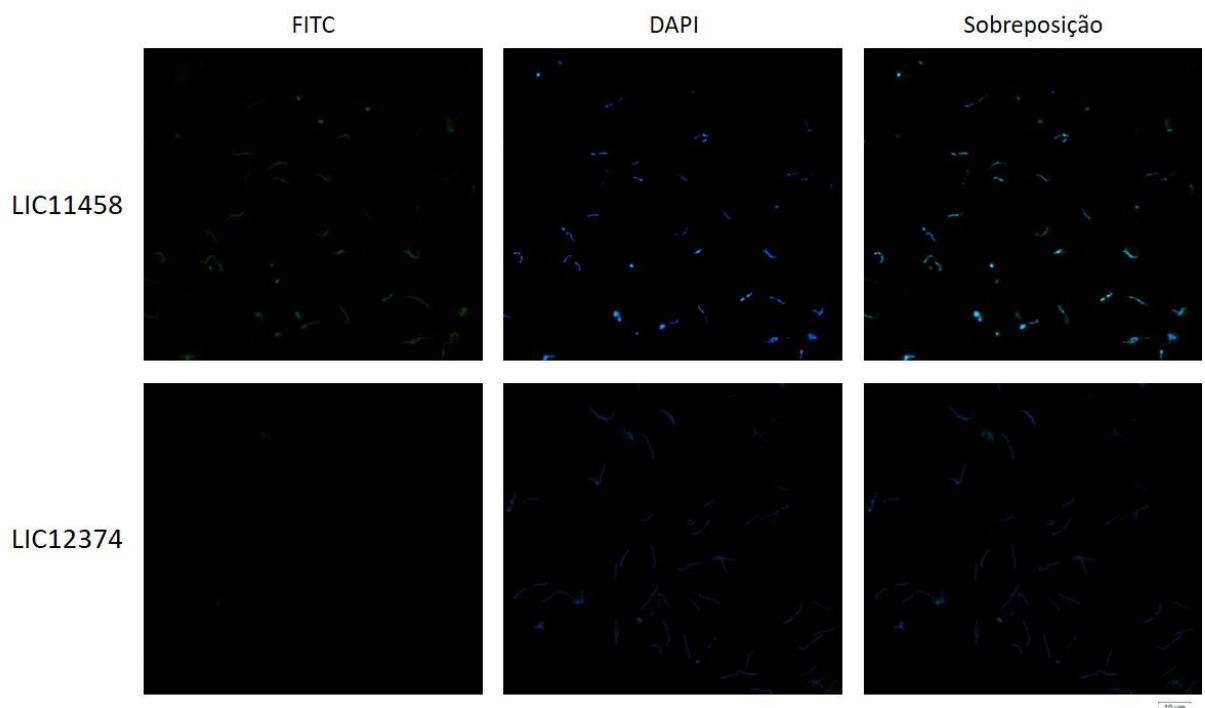
Todos os pAbs foram avaliados quanto a capacidade de reconhecimento da bactéria fixada por metanol em lâminas de microscopia. Além dos pAbs produzidos, foram avaliados três anticorpos monoclonais, dois produzidos contra LipL32 e um contra LigB, gentilmente doados por colaboradores. Com exceção dos pAbs anti-rLIC11086 e anti-rLIC12374, todos os demais reconheceram a bactéria fixada por metanol, onde a membrana encontra-se permeabilizada e as proteínas desnaturadas (Figura 10 e Tabela 2). As diluições encontradas para cada anticorpo variaram entre de 1:1000 a 1:25. A figura 11 é uma demonstração da visualização pelo campo de visão do microscópio. Nesta imagem são representados um ensaio com resultado positivo (LIC11458) e um sem detecção de fluorescência (LIC12374).

#### **5.5 Avaliação da localização de proteínas de membrana externa por IF de superfície**

O controle positivo, anti-extrato bruto reconheceu a bactéria tanto permeabilizada (fixada por metanol) quanto fixada por paraformaldeído (Figura 12 e Tabela 2). Todos os soros testados por esta técnica, com exceção do soro de rato não inoculado (controle negativo) reconheceram a bactéria permeabilizada. A bactéria fixada por paraformaldeído, em teoria intacta, foi reconhecida pelos pAbs anti-rLigBrep e anti-rFcpA, enquanto os demais soros não reconheceram a bactéria neste estado. Alguns pAbs não reconheceram a *L. interrogans* em nenhuma situação (Tabela 2). O controle para proteínas abaixo da superfície da célula, o anti-rFlaB1 não reconheceu a proteína nativa quando a bactéria estava intacta, mas apresentou ligação ao flagelo quando a bactéria foi permeabilizada.



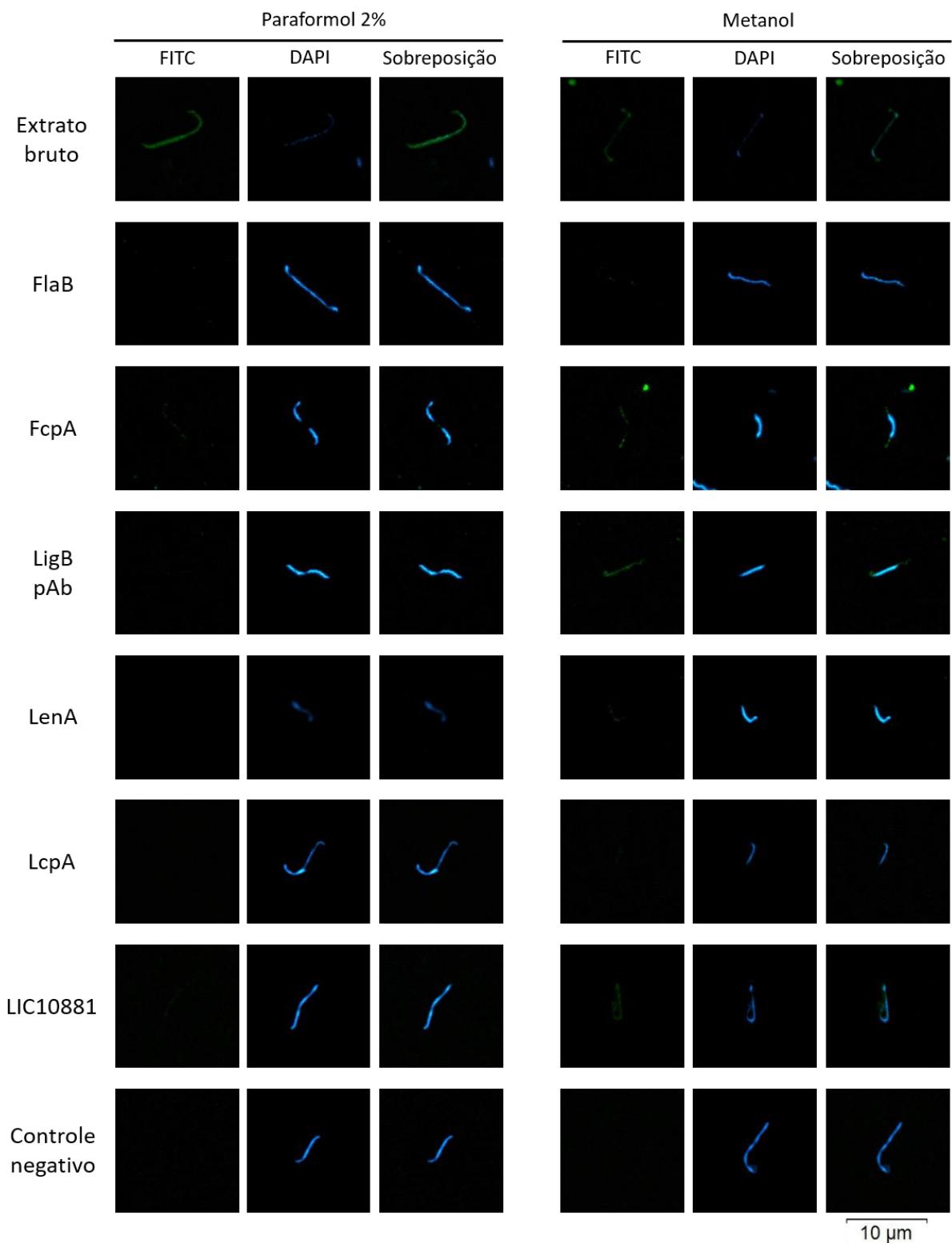
**Figura 10:** Imunofluorescência de leptospiros fixadas por metanol. Foram utilizadas leptospiros cultivadas *in vitro* a 28 °C e fixadas por metanol para reconhecimento da proteína nativa na bactéria. As imagens foram tratadas e montadas utilizando o software ImageJ. Os anticorpos secundários da IF foram marcados com FITC (verde) e o DNA foi marcado com DAPI (azul).



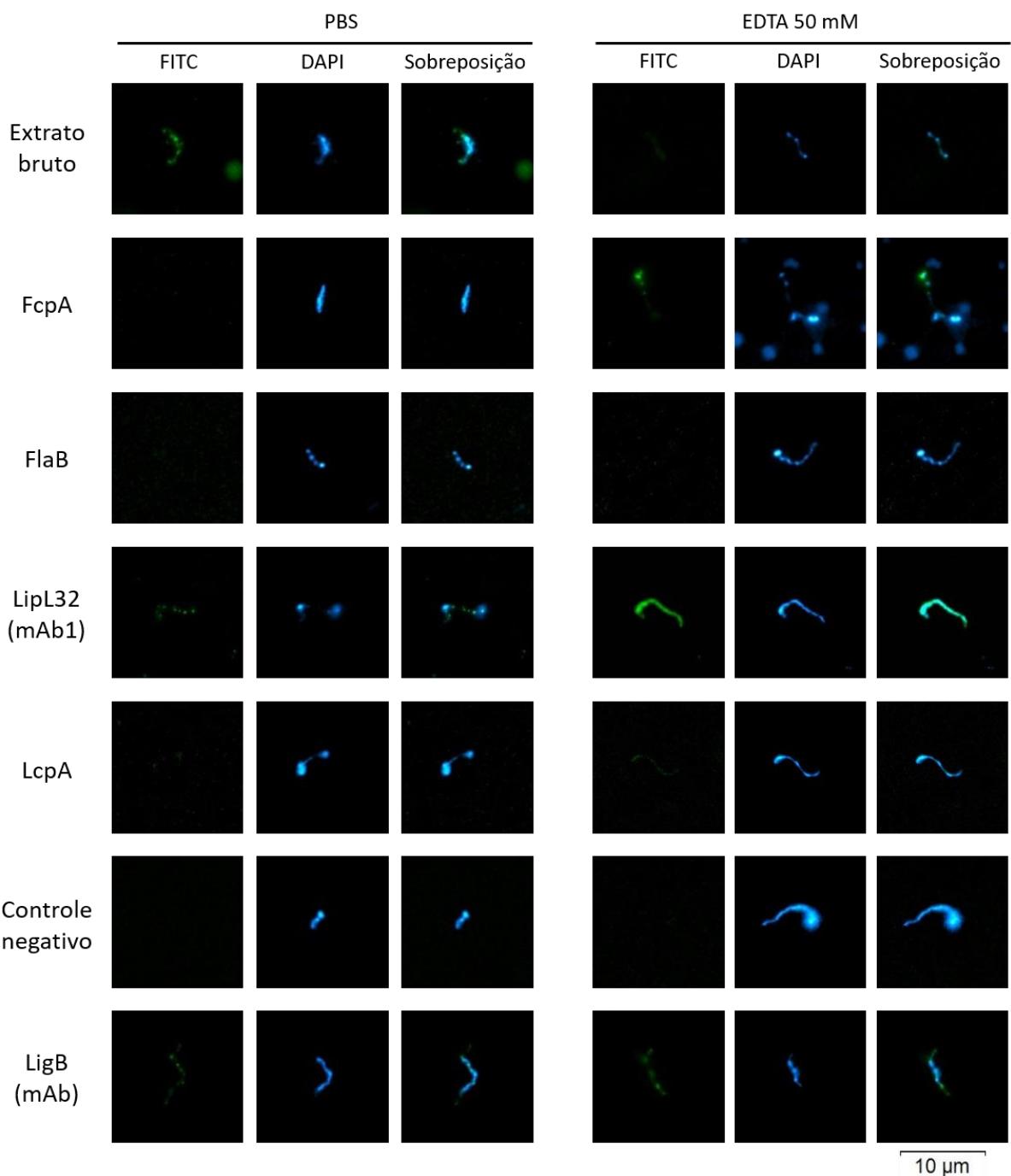
**Figura 11:** Imunofluorescência leptospiras fixadas por metanol – visão do campo. Imagem representativa da visualização de leptospiras fixadas por campo. Linha LIC11458 representação de fluorescência positiva; linha LIC12374 representação de ausência de fluorescência. As imagens foram tratadas e montadas utilizando o software ImageJ. Os anticorpos secundários da IF foram marcados com FITC (verde) e o DNA foi marcado com DAPI (azul).

### **5.6 Padronização do encapsulamento de leptospiras em esferas de ABPF para determinação da localização de proteínas expostas na superfície da bactéria**

O protocolo avaliado para encapsulamento de leptospiras em esferas de ABPF foi realizado com sucesso. As leptospiras foram observadas em abundância dentro das esferas de agarose por microscopia de campo escuro (dados não mostrados). Ao incubar as esferas com anticorpos anti-extrato bruto de *L. interrogans* e consequente IF, novamente, foi possível observar leptospiras fluorescentes (Figura 13 e Tabela 2). Nenhum anticorpo gerado contra proteínas localizadas abaixo da superfície da bactéria apresentou ligação quando a mesma era mantida intacta (incubação com PBS). Porém, surpreendentemente, a incubação com estes anticorpos não apresentava fluorescência quando incubados com leptospiras, mesmo depois que estas sofreram tratamentos para a remoção e permeabilização da ME com detergentes, álcool ou EDTA. A única exceção observada foi o tratamento com 50 mM de EDTA por 30 minutos, que parece ter permeabilizado a célula, permitindo a ligação dos anticorpos anti-rFcpA. Da mesma forma, o tratamento com EDTA 50 mM permitiu a ligação dos anticorpos anti-LcpA (pAb), anti-LipL32 e anti-LigB (mAbs). Estes anticorpos também reconheceram a superfície da bactéria intacta, sugerindo que as proteínas LcpA, LipL32 e LigB estão localizadas na superfície da bactéria. O soro de rato não inoculado (controle negativo) não teve ligação à célula inteira ou permeabilizada.



**Figura 12:** Imunofluorescência de superfície. As IFs da direita correspondem a células de *L. interrogans* L1-130 fixadas por metanol, enquanto as situadas na esquerda foram fixadas com 2% de paraformaldeído. O anticorpo secundário anti-lgs de rato era conjugado com FITC (verde), enquanto o DNA foi marcado com DAPI (azul). As imagens foram tratadas e montadas utilizando o software ImageJ.



**Figura 13:** Imunofluorescência em esferas de ABPF. As IFs da direita correspondem a células de *L. interrogans* L1-130 permeabilizadas por EDTA (50 mM), enquanto as da esquerda apresentam células intactas, tratadas apenas com PBS. O anticorpo secundário anti-lgs de rato era conjugado com FITC (verde), enquanto o DNA foi marcado com DAPI (azul). As imagens foram tratadas e montadas utilizando o software ImageJ.

## 6 DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

A VR é uma metodologia que visa identificar alvos vacinais a partir da análise *in silico* do proteoma codificado no genoma do patógeno, com uso de ferramentas de bioinformática (Rappuoli, 2000). Esta abordagem foi originalmente empregada em *Neisseria meningitidis* sorogrupo B, levando ao descobrimento dos antígenos vacinais protetores que atualmente compõem a vacina recombinante Bexsero (GlaxoSmithKline), em uso para prevenir a meningite causada por este patógeno (Pizza et al, 2000). A VR segue sendo empregada com frequência em diferentes doenças, incluindo leptospirose (Dellagostin et al., 2017). Todavia, os resultados de VR em leptospirose são variados. Uma análise simplificada do genoma de *L. interrogans* identificou nove lipoproteínas apontadas como alvos vacinais potenciais (Hartwig et al., 2011) e dentre elas LemA se mostrou protetora (Hartwig et al., 2013). Outro trabalho avaliou o genoma de *L. borgpetersenii* e identificou 262 proteínas de ME e secretadas, das quais 238 foram testadas em modelo animal e nenhuma demonstrou proteção contra leptospirose (Murray et al., 2013). A análise de VR apresentada neste trabalho é a mais completa realizada até o momento em *Leptospira* spp., não apenas pela diversidade de análises a nível de estrutura primária para identificar os alvos vacinais, mas também por investigar características estruturais das proteínas avaliadas, caracterizando a primeira abordagem de Vacinologia Estrutural (VE) para este patógeno. Além disso, todos os alvos identificados possuem proteínas ortólogas em todas as espécies patogênicas de *Leptospira*, com exceção de LIC10881 em *L. kmetyi*. Esta espécie, apesar de classificada taxonomicamente como uma *Leptospira* patogênica, foi originalmente isolada de amostras ambientais e a virulência da mesma não é esclarecida (Fouts 2016). A análise combinada de VR e VE permitiu a identificação de novos alvos vacinais e sugere que estas proteínas possuem porções imunogênicas expostas na superfície da bactéria. Atualmente, estão sendo avaliadas pelo nosso grupo pesquisa, proteínas quiméricas compostas pelas regiões preditas como expostas na superfície de *L. interrogans*, que além de altamente conservadas entre as espécies infecciosas de *Leptospira*, também foram preditas como contendo epítopes de células T e B. Finalmente, o fluxograma para análise de VR e VE mostrado na figura 4 pode ser aplicado para outras bactérias didermes – mais informações em Grassmann et al. (2017a).

Das 18 proteínas barril- $\beta$  transmembrana preditas, 9 foram clonadas, expressas em *E. coli* e purificadas com sucesso. Devido ao alto PM de algumas destas proteínas, como LIC11458 (113 kDa) e LIC10964 (86 kDa), apenas porções dos genes que as codificam foram clonados para expressão de respectivas porções recombinantes. Na figura 5, podem ser visualizadas bandas adicionais com PM menor do que o esperado para a proteína em questão. A maior parte destas bandas foi reconhecida pelo anticorpo anti-6×His (Figura 6), sugerindo que não sejam contaminações por proteínas de *E. coli* e sim degradação da proteína recombinante ou produção de proteína truncada durante a expressão. O inibidor de serina proteases PMSF foi adicionado às amostras logo após a lise celular e novamente após purificação, previamente ao armazenamento a 4°C, a fim de reduzir a degradação das proteínas recombinantes expressas. As bandas adicionais já eram observadas nos testes de expressão e solubilidade quando avaliados por WB com anti-6×His (dados não mostrados) logo após a expressão. Estas observações sustentam a ideia de expressão das proteínas recombinantes truncadas por *E. coli*. Estas proteínas foram utilizadas para a produção de pAbs pela inoculação das proteínas em ratos. O protocolo foi o mesmo utilizado para obtenção de pAbs contra proteínas barril- $\beta$  transmembrana de *Treponema* spp. e *Borrelia* spp., extensivamente validado para estas espiroquetas (Cox et al., 1995, Cox et al., 1996). Como esperado, os diferentes pAbs apresentaram grande sensibilidade no WB ao reconhecer mesmo 1,5 ng de proteína recombinante. Todavia, o reconhecimento da proteína nativa pelos diferentes pAbs não foi tão consistente quanto o reconhecimento da proteína recombinante correspondente (Figura 9). O WB realizado com extrato de *L. interrogans* com alguns pAbs, incluindo anti-LIC11086, anti-LIC12374 e anti-LIC20019, tiveram resultados inconclusivos. Nestas análises, as bandas observadas foram muito sutis, impossibilitando a visualização e/ou documentação dos resultados. Ao analisar o extrato de *L. interrogans* adaptada ao hospedeiro (cultivada em DMC) por WB utilizando os diferentes pAbs, novamente alguns soros foram incapazes de detectar a proteína nativa. Estes resultados podem ser reflexo de uma baixa expressão destas proteínas na célula de *L. interrogans* ou ainda, a incapacidade do pAb em reconhecer a proteína nativa. De fato, algumas destas proteínas b $\beta$ -OMPs são expressas em baixíssima quantidade na célula de *L. interrogans* cultivada *in vitro* (<10 cópias/célula) (Malmstrom et al., 2009). Estas proteínas foram preparadas em PBS para as inoculações e por serem extremamente hidrofóbicas – são transmembrana –

apresentaram precipitação e consequentemente não estavam corretamente dobradas. Isto pode ter gerado uma grande quantidade de anticorpos que reconhecem apenas a conformação linear e/ou desnaturada da proteína recombinante e no geral reconhecem a proteína nativa de forma menos eficiente. Existem alternativas para solubilização de b $\beta$ -OMPs que favorecem o dobramento correto, tais como a incorporação em micelas ou lipossomas e uso de detergentes anfipáticos e agentes desnaturantes. Enquanto lipossomas podem contribuir para a imunogenicidade dos抗ígenos, alguns detergentes e agentes que facilitam a solubilização destas proteínas podem ser tóxicos, impossibilitando a sua inoculação em animais. Estas alternativas para o correto dobramento das b $\beta$ -OMPs ainda precisam ser avaliadas.

Neste trabalho foi adaptado o protocolo descrito por Caimano et al. (2014) e Grassmann et al. (2015) para obtenção de *L. interrogans* adaptada ao hospedeiro através do cultivo em DMCs implantadas no peritônio de ratos. Nestas condições, as leptospiras regulam a expressão de centenas de genes, contribuindo para a adaptação da célula aos sinais percebidos durante a infecção. Análise comparativa a nível de transcrição (por sequenciamento de RNA total – RNASeq) de leptospiras cultivadas em DMC em comparação com cultivo *in vitro* (Caimano et al., 2014) demonstraram que 166 genes são diferencialmente expressos (DE) nestas condições. Porém, dados ainda não publicados indicam que não existe uma correlação entre os genes e as proteínas que são DE nas mesmas condições (comunicação pessoal, realizada por Expressão Diferencial em Eletroforese em Gel Bidimensional – 2D-DIGE). Por outro lado, os dados de 2D-DIGE sugerem que *L. interrogans* regula uma série de modificações proteicas pós-traducionais (MPT) em DMCs. Recentemente, foi demonstrado que MPTs (trimetilação de lisinas) na lipoproteína LipL32 nativa são responsáveis pelo reconhecimento deficiente da proteína recombinante por anticorpos gerados contra a proteína nativa, indicando uma possível estratégia de evasão imune baseada em MPTs. Essa poderia ser uma possível causa da dificuldade de reconhecimento de algumas proteínas nativas que eventualmente sofrem MPTs, por anticorpos produzidos contra proteínas recombinantes que não possuem estas modificações. O modelo DMC de cultivo de *Leptospira* spp. no hospedeiro foi reproduzido com sucesso na UFPel, podendo contribuir para o entendimento da patogenicidade desta bactéria, consequentemente facilitando o desenvolvimento de vacinas contra a leptospirose.

Em geral, os anticorpos gerados contra as proteínas recombinantes analisadas foram capazes de reconhecer a proteína nativa desnaturada na IF com leptospiras fixadas por metanol. As exceções foram anti-rLIC20019 e anti-rLIC11086 que não apresentaram fluorescência detectável nas análises realizadas, semelhantemente ao observado no WB com estes soros. Em seguida, os pAbs foram utilizados para avaliar a exposição das proteínas investigadas na superfície de *L. interrogans* pela técnica de IF de superfície, descrita por Pinne (2009). Nesta técnica, as leptospiras foram incubadas vivas sobre lâmina de vidro para aderirem e em seguida fixadas por paraformaldeído para manter a integridade da membrana ou metanol para permeabilizar a célula. Como esperado, somente houve ligação do anti-FlaB1 ao flagelo quando a célula foi permeabilizada por metanol. Esta abordagem sugeriu que LIC10881 está exposta na superfície de *L. interrogans* (Figura 11). Todavia, assim como no trabalho original que descreve esta técnica, o pAb gerado contra FcpA reconheceu a bactéria teoricamente intacta. Este foi o motivo que levou Pinne e colaboradores (2009) a sugerir que esta proteína é uma proteína de ME, nomeando-a OmpL36. Porém, foi demonstrado que ela é na verdade um componente da bainha do flagelo periplasmático em um completo e elegante experimento, que a renomeou como FcpA. Naturalmente, não é esperado que uma proteína do flagelo esteja exposta na superfície de *Leptospira*, colocando a confiabilidade desta técnica em dúvida. Uma possível explicação para qual os pAbs gerados contra as bβ-OMPs não reconhecerem a proteína na superfície da bactéria é a pouca exposição da molécula fora da célula. Como pode ser observado na figura 2 em Grassmann et al. (2017a), apenas uma pequena porção do barril-β fica exposto fora da ME, e possíveis regiões imunodominantes da proteína podem estar localizadas na porção não exposta da proteína. Uma solução possível é a obtenção de genes sintéticos compostos apenas pelas regiões preditas como expostas na superfície, aumentando consideravelmente as chances de gerar anticorpos capazes de reconhecer a porção exposta da proteína alvo.

LIC10881 foi predita por bioinformática como um TBDR (Tabela 1). TBDRs são bβ-OMPs caracterizados por possuírem 22 folhas-β transmembrana e um domínio *plug* globular que se dobra no interior do barril. A predição da molécula que de fato é transportada por um TBDR é difícil de ser realizada de forma confiável por bioinformática. Ainda assim, a análise comparativa do modelo estrutural gerado para

LIC10881 (Grassmann et al., 2017a) indicou semelhança estrutural com TbpA, um transportador de transferrina em *Neisseria* spp. A função desta proteína, bem como sua participação no processo de patogênese ainda precisam ser demonstrados experimentalmente. A análise de conservação de LIC10881 em diferentes *Leptospira* spp. indicou que, em relação aos seus ortólogos, esta proteína era consideravelmente menor em relação ao tamanho das proteínas. Atualmente, experimentos estão em andamento a fim de avaliar a capacidade protetora de rLIC10881 contra a leptospirose aguda no modelo hamster.

A correta demonstração *in vitro* da localização de proteínas de superfície é essencial para confirmação dos dados obtidos *in silico* por análises de VR e VE. Dessa forma é possível selecionar racionalmente alvos que serão testados em seguida, reduzindo o número de animais utilizados e aumentando as chances de encontrar um antígeno protetor (Rappuoli, 2000). As técnicas para determinação da localização subcelular de proteínas de *Leptospira* spp. atualmente em uso apresentam uma série de limitações, conforme apresentado no Item 2.10 da Revisão Bibliográfica. Estas técnicas são amplamente utilizadas em outros microrganismos, porém, a relativa fragilidade da estrutura celular de *Leptospira* spp., particularmente a ME, produz resultados contraditórios e inesperados (como suposta localização na superfície de抗ígenos sabidamente citoplasmáticos). Mesmo a técnica de IF de superfície apresenta limitações, como a localização da FcpA/OmpL36 já discutida. Além disso, esta técnica inicialmente indicou LipL32 como proteína de superfície (Pinne and Haake, 2009) e em seguida, os mesmos autores revisaram seus achados e sugeriram que LipL32 não estaria localizada na superfície da bactéria (Pinne and Haake, 2013). Dentre as alternativas para demonstração *in vitro* da localização de proteínas em *Leptospira*, o encapsulamento da bactéria em esferas de ABPF se destaca pela simplicidade, facilidade de obtenção e pouca manipulação das células, sem necessidade de centrifugação, por exemplo. Esta técnica foi inicialmente descrita para *T. pallidum* e em seguida adaptada para *B. burgdorferi*, espiroquetas ainda mais frágeis que *Leptospira* spp. Com o uso desta técnica, uma série de proteínas bβ-OMPs foram caracterizadas quanto a localização na superfície destas espiroquetas. Este trabalho descreve pela primeira vez a adaptação desta técnica para *Leptospira*.

Durante o estabelecimento da técnica de aprisionamento de leptospiras em esferas de ABPF, foi utilizado o anticorpo anti-extrato bruto de leptospiras, a fim de

confirmar a funcionalidade da técnica. Em seguida, foi realizada a tentativa de permeabilização da ME utilizando 0,01% de Triton X-100, conforme realizado para as outras espiroquetas, combinado com o uso de pAbs anti-flagelinas. De forma inesperada, esta abordagem não resultou em sinal positivo na IF. A partir deste ponto, uma série de tentativas com diferentes tratamentos foi realizado, até encontrar marcação para anti-FcpA no tratamento com 50 mM de EDTA por 30 minutos. Este protocolo foi repetido, juntamente com a manutenção de leptospiras intactas (tratamento com PBS por 30 minutos), desta vez utilizando anticorpos contra as lipoproteínas LigB, LipL32, LcpA e LenA. Foram utilizados apenas anticorpos direcionados contra lipoproteínas previamente demonstradas como localizadas na superfície da bactéria visando possibilidade de detecção de ligação à molécula inteira da lipoproteína, uma vez que como mencionado, b $\beta$ -OMPs contém a maior parte da proteína no interior da ME. Enquanto não foi possível detectar fluorescência com a marcação de anti-LenA, o pAb anti-LcpA e os mAbs anti-LipL32 e anti-LigB ligaram a proteína nativa tanto na bactéria permeabilizada (50 mM de EDTA) quanto intacta (PBS). Estes dados confirmam relatos anteriores que apontam LipL32, LigB e LcpA de fato expostas na superfície de *L. interrogans*.

Apesar de detectada a ligação de anti-FcpA na célula lisada de *L. interrogans* aprisionada nas esferas de ABPF, isso só foi observado numa concentração de EDTA e em nenhuma outra abordagem de permeabilização celular. Essas observações encorajam a avaliação de outros marcadores internos na célula em busca de maior repetibilidade, tais como proteínas citoplasmáticas ou proteínas de MI – como transportadores ABC ou as proteínas do motor e âncora do flagelo. Outra possibilidade é a utilização de iodeto de propídeo para diferenciar células inteiras de células permeabilizadas, já que esta molécula tem pouca capacidade de atravessar membranas intactas. Nesta mesma linha, outra possibilidade para determinação da localização de proteínas de superfície celular em *Leptospira* spp. pode ser a utilização de técnicas como a LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability kit, em citometria de fluxo para diferenciar células integrais das permeabilizadas. Recentemente, um trabalho descreveu uma técnica para enumeração de leptospiras vivas por citometria de fluxo, a partir da marcação diferencial de DNA por fluoróforos capazes de atravessar ou não a membrana intacta (Fontana et al., 2017). Essa abordagem em conjunto com a marcação da proteína nativa com os pAbs gerados (mais a marcação

destes com anticorpo fluorescente), pode possibilitar a distinção entre células inteiras e permeabilizadas e se há marcação por pAb em células inteiras. A segunda situação seria um indício de que a proteína alvo está exposta na superfície da bactéria. Atualmente, esta técnica está em fase inicial de desenvolvimento.

Por fim, a técnica de encapsulamento das leptospiras em esferas de agarose é promissora e pode fornecer informações importantes sobre a localização de proteínas de ME, fator essencial na busca por antígenos vacinais contra a leptospirose. Neste trabalho foi gerado dados complementares que ajudam a confirmar que as lipoproteínas LigB, LipL32 e LcpA estão localizadas na superfície de *L. interrogans*. Além disso, há indícios de que LIC10881 possa estar igualmente exposta, tornando-a um alvo atrativo para avaliação de novas vacinas recombinantes contendo a LIC10881 inteira ou seus epítópos imunogênicos isolados. Apesar dos avanços obtidos, ainda são necessários mais experimentos avaliando a fundo estas técnicas, incluindo novas abordagens e eventualmente considerando diferentes abordagens em conjunto.

## 7 CONCLUSÃO GERAL

- A triagem *in silico* para a busca de novos alvos vacinais por VR e VE foi eficiente e reduziu o número proteínas a serem avaliadas *in vitro*;
- O soro produzido contra proteínas recombinantes selecionadas foi capaz de reconhecer a sua respectiva proteína recombinante e nativa;
- As flagelinas funcionaram como controles de subsuperfície nas IFs;
- A técnica de imunofluorescência de superfície não foi capaz de diferenciar, de forma precisa, os controles de superfície e subsuperfície;
- A técnica de encapsulamento de *Leptospira* sp. em agarose de baixo ponto de fusão se demonstrou promissora para a localização de proteínas de ME, mas ainda precisa ser aprimorada;
- Há indícios de que LIC10881, LipL32, LigB e LcpA são proteínas expostas na superfície de *L. interrogans*.

## 8 REFERÊNCIAS

- ADLER, B. 2015a. History of leptospirosis and leptospira. *Curr Top Microbiol Immunol*, 387, 1-9.
- ADLER, B. 2015b. *Leptospira and Leptospirosis*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- ADLER, B. 2015c. Vaccines against leptospirosis. *Curr Top Microbiol Immunol*, 387, 251-72.
- ADLER, B. & FAINE, S. 1976. Susceptibility of mice treated with cyclophosphamide to lethal infection with *Leptospira interrogans* Serovar pomona. *Infect Immun*, 14, 703-8.
- ANDRE-FONTAINE, G., AVIAT, F. & THORIN, C. 2015. Waterborne Leptospirosis: Survival and Preservation of the Virulence of Pathogenic *Leptospira* spp. in Fresh Water. *Curr Microbiol*, 71, 136-42.
- ANDRE-FONTAINE, G., BRANGER, C., GRAY, A. W. & KLAASEN, H. L. 2003. Comparison of the efficacy of three commercial bacterins in preventing canine leptospirosis. *Vet Rec*, 153, 165-9.
- ASOH, T., SAITO, M., VILLANUEVA, S. Y., KANEMARU, T., GLORIANI, N. & YOSHIDA, S. 2014. Natural defense by saliva and mucosa against oral infection by *Leptospira*. *Can J Microbiol*, 60, 383-9.
- 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. 2008. *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. *Acta Trop*, 105, 176-80.
- BABUDIERI, B., CARLOS, E. R. & CARLOS, E. T., JR. 1973. Pathogenic leptospira isolated from toad kidneys. *Trop Geogr Med*, 25, 297-9.
- BAITCHMAN, E. J., CALLE, P. P., JAMES, S. B., LINN, M. J. & RAPHAEL, B. L. 2006. Leptospirosis in Wied's marmosets (*Callithrix kuhlii*). *J Zoo Wildl Med*, 37, 182-5.
- BANDEIRA, M., SANTOS, C. S., DE AZEVEDO, E. C., SOARES, L. M., MACEDO, J. O., MARCHI, S., DA SILVA, C. L., CHAGAS-JUNIOR, A. D., MCBRIDE, A. J., MCBRIDE, F. W., REIS, M. G. & ATHANAZIO, D. A. 2011. Attenuated nephritis in inducible nitric oxide synthase knockout C57BL/6 mice and pulmonary hemorrhage in CB17 SCID and recombination activating gene 1 knockout C57BL/6 mice infected with *Leptospira interrogans*. *Infect Immun*, 79, 2936-40.
- BARBOSA, A. S., MONARIS, D., SILVA, L. B., MORAIS, Z. M., VASCONCELLOS, S. A., CIANCIARULLO, A. M., ISAAC, L. & ABREU, P. A. 2010. Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of *Leptospira* spp. that binds the human complement regulator C4BP. *Infect Immun*, 78, 3207-16.
- BAULU, J., EVERARD, C. O. & EVERARD, J. D. 1987. Leptospires in vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops Sabaeus*) on Barbados. *J Wildl Dis*, 23, 60-6.
- BHARTI, A. R., NALLY, J. E., RICALDI, J. N., MATTHIAS, M. A., DIAZ, M. M., LOVETT, M. A., LEVETT, P. N., GILMAN, R. H., WILLIG, M. R., GOTUZZO, E. & VINETZ, J. M. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*, 3, 757-71.
- BRANGER, C., CHATRENET, B., GAUVRIT, A., AVIAT, F., AUBERT, A., BACH, J. M. & ANDRE-FONTAINE, G. 2005. Protection against *Leptospira interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. *Infect Immun*, 73, 4062-9.

- BRANGER, C., SONRIER, C., CHATRENET, B., KLONJKOWSKI, B., RUVOEN-CLOUET, N., AUBERT, A., ANDRE-FONTAINE, G. & ELOIT, M. 2001. Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. *Infect Immun*, 69, 6831-8.
- CAIMANO, M. J., SIVASANKARAN, S. K., ALLARD, A., HURLEY, D., HOKAMP, K., GRASSMANN, A. A., HINTON, J. C. & NALLY, J. E. 2014. A model system for studying the transcriptomic and physiological changes associated with mammalian host-adaptation by *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *PLoS Pathog*, 10, e1004004.
- CAMERON, C. E. 2015. Leptospiral structure, physiology, and metabolism. *Curr Top Microbiol Immunol*, 387, 21-41.
- CAMERON, C. E., ZUERNER, R. L., RAVERTY, S., COLEGROVE, K. M., NORMAN, S. A., LAMBOURN, D. M., JEFFRIES, S. J. & GULLAND, F. M. 2008. Detection of pathogenic *Leptospira* bacteria in pinniped populations via PCR and identification of a source of transmission for zoonotic leptospirosis in the marine environment. *J Clin Microbiol*, 46, 1728-33.
- CAO, Y., FAISAL, S. M., YAN, W., CHANG, Y. C., McDONOUGH, S. P., ZHANG, N., AKEY, B. L. & CHANG, 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, 7379-86.
- CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M., FRAGA, T. R., SILVA, L. B., MONARIS, D., ABREU, P. A., STROBEL, S., JOZSI, M., ISAAC, L. & BARBOSA, A. S. 2012. Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with human complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. *J Infect Dis*, 205, 995-1004.
- CHARON, N. W. & GOLDSTEIN, S. F. 2002. Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes. *Annu Rev Genet*, 36, 47-73.
- CHARON, N. W., GREENBERG, E. P., KOOPMAN, M. B. & LIMBERGER, R. J. 1992. Spirochete chemotaxis, motility, and the structure of the spirochetal periplasmic flagella. *Res Microbiol*, 143, 597-603.
- CHARON, N. W., JOHNSON, R. C. & MUSCHEL, L. H. 1975. Antileptospiral activity in lower-vertebrate sera. *Infect Immun*, 12, 1386-91.
- CHASSIN, C., PICARDEAU, M., GOUPON, J. M., BOURHY, P., QUELLARD, N., DARCHE, S., BADELL, E., D'ANDON, M. F., WINTER, N., LACROIX-LAMANDE, S., BUZONI-GATEL, D., VANDEWALLE, A. & WERTS, C. 2009. TLR4- and TLR2-Mediated B Cell Responses Control the Clearance of the Bacterial Pathogen, *Leptospira interrogans*. *J Immunol*.
- 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.
- CHRISTOPHER, W. L., ADLER, B. & FAINE, S. 1982. Immunogenicity of leptospiral vaccines grown in protein-free medium. *J Med Microbiol*, 15, 493-501.
- CONRAD, N. L., CRUZ MCBRIDE, F. W., SOUZA, J. D., SILVEIRA, M. M., FELIX, S., MENDONCA, K. S., SANTOS, C. S., ATHANAZIO, D. A., MEDEIROS, M. A., REIS, M. G., DELLAGOSTIN, O. A. & MCBRIDE, A. J. 2017. LigB subunit vaccine confers sterile immunity against challenge in the hamster model of leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis*, 11, e0005441.
- COSTA, F., HAGAN, J. E., CALCAGNO, J., KANE, M., TORGERSON, P., MARTINEZ-SILVEIRA, 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, e0003898.
- COUTINHO, M. L., CHOY, H. A., KELLEY, M. M., MATSUNAGA, J., BABBITT, J. T., LEWIS, M. S., ALEIXO, J. A. & HAAKE, D. A. 2011. A LigA three-domain region protects hamsters from lethal infection by *Leptospira interrogans*. *PLoS Negl Trop Dis*, 5, e1422.
- COUTINHO, M. L., MATSUNAGA, J., WANG, L. C., DE LA PENA MOCTEZUMA, A., LEWIS, M. S., BABBITT, J. T., ALEIXO, J. A. & HAAKE, D. A. 2014. Kinetics of *Leptospira interrogans* infection in hamsters after intradermal and subcutaneous challenge. *PLoS Negl Trop Dis*, 8, e3307.
- COX, D. L., AKINS, D. R., BOURELL, K. W., LAHDENNE, P., NORGARD, M. V. & RADOLF, J. D. 1996. Limited surface exposure of *Borrelia burgdorferi* outer surface lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 7973-8.
- COX, D. L., AKINS, D. R., PORCELLA, S. F., NORGARD, M. V. & RADOLF, J. D. 1995. *Treponema pallidum* in gel microdroplets: a novel strategy for investigation of treponemal molecular architecture. *Mol Microbiol*, 15, 1151-64.
- CULLEN, P. A., HAAKE, D. A., BULACH, D. M., ZUERNER, R. L. & ADLER, B. 2003. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. *Infect Immun*, 71, 2414-21.
- CULLEN, P. A., XU, X., MATSUNAGA, J., SANCHEZ, Y., KO, A. I., HAAKE, D. A. & ADLER, B. 2005. Surfaceome of *Leptospira* spp. *Infect Immun*, 73, 4853-63.
- DA SILVA, L. B., MIRAGAIA LDOS, S., BREDA, L. C., ABE, C. M., SCHMIDT, M. C., MORO, A. M., MONARIS, D., CONDE, J. N., JOZSI, M., ISAAC, L., ABREU, P. A. & BARBOSA, A. S. 2015. Pathogenic *Leptospira* species acquire factor H and vitronectin via the surface protein LcpA. *Infect Immun*, 83, 888-97.
- DELANY, I., RAPPOLI, R. & SEIB, K. L. 2013. Vaccines, reverse vaccinology, and bacterial pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3, a012476.
- 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., GRASSMANN, A. A., RIZZI, C., SCHUCH, R. A., JORGE, S., OLIVEIRA, T. L., MCBRIDE, A. J. & HARTWIG, D. D. 2017. Reverse Vaccinology: An Approach for Identifying Leptospiral Vaccine Candidates. *Int J Mol Sci*, 18.
- DIESCH, S. L., MCCULLOCH, W. F., BRAUN, J. L. & ELLINGHAUSEN, H. C., JR. 1966. Leptospires isolated from frog kidneys. *Nature*, 209, 939-40.
- DIETRICH, M., MUHLDORFER, K., TORTOSA, P. & MARKOTTER, W. 2015. *Leptospira* and Bats: Story of an Emerging Friendship. *PLoS Pathog*, 11, e1005176.
- DIKKEN, H., KMETY, E., DE GEUS, A., ADINARAYANAN, N. & TIMMER, V. E. 1978. Two new leptospira serovars belonging to the Hebdomadis serogroup. *Trop Geogr Med*, 30, 537-42.
- ELLINGHAUSEN, H. C., JR. & MCCULLOUGH, W. G. 1965. Nutrition of *Leptospira* Pomona and Growth of 13 Other Serotypes: Fractionation of Oleic Albumin Complex and a Medium of Bovine Albumin and Polysorbate 80. *Am J Vet Res*, 26, 45-51.
- ELLIS, W. A. 2015. Animal leptospirosis. *Curr Top Microbiol Immunol*, 387, 99-137.
- ELLIS, W. A., CASSELLS, J. A. & DOYLE, J. 1986a. Genital leptospirosis in bulls. *Vet Rec*, 118, 333.

- ELLIS, W. A., HOVIND-HOUGEN, K., MOLLER, S. & BIRCH-ANDRESEN, A. 1983. Morphological changes upon subculturing of freshly isolated strains of *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]*, 255, 323-35.
- ELLIS, W. A., JJ, O. B., CASSELLS, J. A., NEILL, S. D. & HANNA, J. 1985. Excretion of *Leptospira interrogans* serovar hardjo following calving or abortion. *Res Vet Sci*, 39, 296-8.
- ELLIS, W. A., MCPARLAND, P. J., BRYSON, D. G., THIERMANN, A. B. & MONTGOMERY, J. 1986b. Isolation of leptospires from the genital tract and kidneys of aborted sows. *Vet Rec*, 118, 294-5.
- ESHGHI, A., HENDERSON, J., TRENT, M. S. & PICARDEAU, M. 2015. *Leptospira interrogans* IpxD Homologue Is Required for Thermal Acclimatization and Virulence. *Infect Immun*, 83, 4314-21.
- FAINE, S. 1957a. Virulence in *Leptospira*. I. Reactions of guinea-pigs to experimental infection with *Leptospira icterohaemorrhagiae*. *Br J Exp Pathol*, 38, 1-7.
- FAINE, S. 1957b. Virulence in leptospira. II. The growth in vivo of virulent *Leptospira icterohaemorrhagiae*. *Br J Exp Pathol*, 38, 8-14.
- FAINE, S. B., ADLER, B., BOLIN, C. & PEROLAT, P. 1999. *Leptospira and leptospirosis*, Melbourne, MediSci.
- FAISAL, S. M., YAN, W., CHEN, C. S., PALANIAPPAN, R. U., MCDONOUGH, S. P. & CHANG, Y. F. 2008. Evaluation of protective immunity of *Leptospira* immunoglobulin like protein A (LigA) DNA vaccine against challenge in hamsters. *Vaccine*, 26, 277-87.
- FAISAL, S. M., YAN, W., MCDONOUGH, S. P. & CHANG, Y. F. 2009. *Leptospira* immunoglobulin-like protein A variable region (LigAvar) incorporated in liposomes and PLGA microspheres produces a robust immune response correlating to protective immunity. *Vaccine*, 27, 378-87.
- FANTON D'ANDON, M., QUELLARD, N., FERNANDEZ, B., RATET, G., LACROIX-LAMANDE, S., VANDEWALLE, A., BONECA, I. G., GOUJON, J. M. & WERTS, C. 2014. *Leptospira Interrogans* induces fibrosis in the mouse kidney through Inos-dependent, TLR- and NLR-independent signaling pathways. *PLoS Negl Trop Dis*, 8, e2664.
- FELZEMBURGH, R. D., RIBEIRO, G. S., COSTA, F., REIS, R. B., HAGAN, J. E., MELENDEZ, A. X., FRAGA, D., SANTANA, F. S., MOHR, S., DOS SANTOS, B. L., SILVA, A. Q., SANTOS, A. C., RAVINES, R. R., TASSINARI, W. S., CARVALHO, M. S., REIS, M. G. & KO, A. I. 2014. Prospective study of leptospirosis transmission in an urban slum community: role of poor environment in repeated exposures to the *Leptospira* agent. *PLoS Negl Trop Dis*, 8, e2927.
- FERNANDES, L. G., DE MORAIS, Z. M., VASCONCELLOS, S. A. & NASCIMENTO, A. L. 2015. *Leptospira interrogans* reduces fibrin clot formation by modulating human thrombin activity via exosite I. *Pathog Dis*, 73.
- FERRIS, D. H., RHOADES, H. E., HANSON, L. E., GALTON, M. & MANSFIELD, M. E. 1961. Research into the nidality of *Leptospira ballum* in campestral hosts including the hog-nosed snake (*Heterodon platyrhinus*). *Cornell Vet*, 51, 405-19.
- FONTANA, C., CRUSSARD, S., SIMON-DUFAY, N., PIALOT, D., BOMCHIL, N. & REYES, J. 2017. Use of flow cytometry for rapid and accurate enumeration of live pathogenic *Leptospira* strains. *J Microbiol Methods*, 132, 34-40.

- FORSTER, K. M., HARTWIG, D. D., SEIXAS, F. K., BACELO, K. L., AMARAL, M., HARTLEBEN, C. P. & DELLAGOSTIN, O. A. 2013. A conserved region of leptospiral immunoglobulin-like A and B proteins as a DNA vaccine elicits a prophylactic immune response against leptospirosis. *Clin Vaccine Immunol*, 20, 725-31.
- FRAGA, T. R., BARBOSA, A. S. & ISAAC, L. 2011. Leptospirosis: Aspects of Innate Immunity, Immunopathogenesis and Immune Evasion from the Complement System. *Scand J Immunol*, 73, 408-419.
- GALLAGHER, A. 2011. Leptospirosis in a dog with uveitis and presumed cholecystitis. *J Am Anim Hosp Assoc*, 47, e162-7.
- GEISEN, V., STENGEL, C., BREM, S., MULLER, W., GREENE, C. & HARTMANN, K. 2007. Canine leptospirosis infections - clinical signs and outcome with different suspected *Leptospira* serogroups (42 cases). *J Small Anim Pract*, 48, 324-8.
- GLOSSER, J. W., SULZER, C. R., EBERHARDT, M. & WINKLER, W. G. 1974. Cultural and serologic evidence of *Leptospira interrogans* serotype Tarassovi infection in turtles. *J Wildl Dis*, 10, 429-35.
- GOLDSTEIN, S. F. & CHARON, N. W. 1988. Motility of the spirochete *Leptospira*. *Cell Motil Cytoskeleton*, 9, 101-10.
- GOLDSTEIN, S. F. & CHARON, N. W. 1990. Multiple-exposure photographic analysis of a motile spirochete. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 4895-9.
- GOMES-SOLECKI, M., SANTECCHIA, I. & WERTS, C. 2017. Animal Models of Leptospirosis: Of Mice and Hamsters. *Front Immunol*, 8, 58.
- GOUVEIA, E. L., METCALFE, J., DE CARVALHO, A. L., AIRES, T. S., VILLASBOAS-BISNETO, J. C., QUEIRROZ, A., SANTOS, A. C., SALGADO, K., REIS, M. G. & KO, A. I. 2008. Leptospirosis-associated Severe Pulmonary Hemorrhagic Syndrome, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis*, 14, 505-508.
- GRASSMANN, A. A., FELIX, S. R., DOS SANTOS, C. X., AMARAL, M. G., SEIXAS NETO, A. C., FAGUNDES, M. Q., SEIXAS, F. K., DA SILVA, E. F., CONCEICAO, F. R. & DELLAGOSTIN, O. A. 2012. Protection against lethal leptospirosis after vaccination with LipL32 coupled or coadministered with the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Clin Vaccine Immunol*, 19, 740-5.
- GRASSMANN, A. A., KREMER, F. S., DOS SANTOS, J. C., SOUZA, J. D., PINTO, L. D. S. & MCBRIDE, A. J. A. 2017a. Discovery of Novel Leptospirosis Vaccine Candidates Using Reverse and Structural Vaccinology. *Front Immunol*, 8, 463.
- GRASSMANN, A. A., MCBRIDE, A. J., NALLY, J. E. & CAIMANO, M. J. 2015. Generation of Mammalian Host-adapted *Leptospira interrogans* by Cultivation in Peritoneal Dialysis Membrane Chamber Implantation in Rats. *Bio Protoc*, 5, e1536.
- GRASSMANN, A. A., SOUZA, J. D. & MCBRIDE, A. J. 2017b. A Universal Vaccine against Leptospirosis: Are We Going in the Right Direction? *Front Immunol*, 8, 256.
- GRAVEKAMP, C., KORVER, H., MONTGOMERY, J., EVERARD, C. O., CARRINGTON, D., ELLIS, W. A. & TERPSTRA, W. J. 1991. Leptospires isolated from toads and frogs on the Island of Barbados. *Zentralbl Bakteriol*, 275, 403-11.
- HAAKE, D. A. 2006. Hamster model of leptospirosis. *Curr Protoc Microbiol*, Chapter 12, Unit 12E 2.
- 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.
- HAAKE, D. A. & MATSUNAGA, J. 2002. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. *Infect Immun*, 70, 4936-45.
- HAAKE, D. A., MAZEL, M. K., MCCOY, A. M., MILWARD, F., CHAO, G., MATSUNAGA, J. & WAGAR, E. A. 1999. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infect Immun*, 67, 6572-82.
- HAAKE, D. A., WALKER, E. M., BLANCO, D. R., BOLIN, C. A., MILLER, M. N. & LOVETT, M. A. 1991. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar grippotyphosa during in vitro cultivation. *Infect Immun*, 59, 1131-40.
- HAAKE, D. A. & ZUCKERT, W. R. 2015. The leptospiral outer membrane. *Curr Top Microbiol Immunol*, 387, 187-221.
- 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.
- 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, 1337-41.
- HIGGINS, R. J., HARBOURNE, J. F., LITTLE, T. W. & STEVENS, A. E. 1980. Mastitis and abortion in dairy cattle associated with *Leptospira* of the serotype hardjo. *Vet Rec*, 107, 307-10.
- 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, 5408-17.
- HUNG, C. C., CHANG, C. T., TIAN, Y. C., WU, M. S., YU, C. C., PAN, M. J., VANDEWALLE, A. & YANG, C. W. 2006. Leptospiral membrane proteins stimulate pro-inflammatory chemokines secretion by renal tubule epithelial cells through toll-like receptor 2 and p38 mitogen activated protein kinase. *Nephrol Dial Transplant*, 21, 898-910.
- HYAKUTAKE, S., BIASI, P. D., BELLUOMINI, H. E. & SANTA ROSA, C. A. 1980. Leptospiroses in Brazilian snakes. *Int J Zoonoses*, 7, 73-7.
- INADA, R., IDO, Y., HOKI, R., KANEKO, R. & ITO, H. 1916. The Etiology, Mode of Infection, and Specific Therapy of Weil's Disease (Spirochaetosis Icterohaemorrhagica). *J Exp Med*, 23, 377-402.
- JOBBINS, S. E. & ALEXANDER, K. A. 2015. Evidence of *Leptospira* sp. infection among a diversity of African wildlife species: beyond the usual suspects. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 109, 349-51.
- JOHNSON, R. C. & HARRIS, V. G. 1967. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. I. Growth at low temperatures. *J Bacteriol*, 94, 27-31.
- KAISER, G. E. & DOETSCH, R. N. 1975. Letter: Enhanced translational motion of *Leptospira* in viscous environments. *Nature*, 255, 656-7.
- KMETY, E. & DIKKEN, H. 1993. Classification of the species *Leptospira interrogans* and history of its serovars. Groningen, The Netherlands: University Press.

- KO, A. I., GOARANT, C. & PICARDEAU, M. 2009. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol*, 7, 736-47.
- KOIZUMI, N. & WATANABE, H. 2004. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. *Vaccine*, 22, 1545-52.
- LACERDA, H. G., MONTEIRO, G. R., OLIVEIRA, C. C., SUASSUNA, F. B., QUEIROZ, J. W., BARBOSA, J. D., MARTINS, D. R., REIS, M. G., KO, A. I. & JERONIMO, S. M. 2008. Leptospirosis in a subsistence farming community in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*.
- LAWRENCE, J. J. 1951. The growth of Leptospirae in semi-solid media. *Aust J Exp Biol Med Sci*, 29, 195-9.
- LEVETT, P. N. 1999. Leptospirosis: Re-emerging or re-discovered disease? *Journal of Medical Microbiology*, 48, 417-418.
- LEVETT, P. N. 2001. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*, 14, 296-326.
- LIU, Y., ZHENG, W., LI, L., MAO, Y. & YAN, J. 2007. Pathogenesis of leptospirosis: interaction of Leptospira interrogans with in vitro cultured mammalian cells. *Med Microbiol Immunol*, 196, 233-9.
- LOURDAULT, K., AVIAT, F. & PICARDEAU, M. 2009. Use of quantitative real-time PCR for studying the dissemination of Leptospira interrogans in the guinea pig infection model of leptospirosis. *J Med Microbiol*, 58, 648-55.
- LOURDAULT, K., WANG, L. C., VIEIRA, A., MATSUNAGA, J., MELO, R., LEWIS, M. S., HAAKE, D. A. & GOMES-SOLECKI, M. 2014. Oral immunization with Escherichia coli expressing a lipidated form of LigA protects hamsters against challenge with Leptospira interrogans serovar Copenhageni. *Infect Immun*, 82, 893-902.
- LUCAS, D. S., CULLEN, P. A., LO, M., SRIKRAM, A., SERMSWAN, R. W. & ADLER, B. 2011. Recombinant LipL32 and LigA from Leptospira are unable to stimulate protective immunity against leptospirosis in the hamster model. *Vaccine*, 29, 3413-8.
- MACIEL, E. A., DE CARVALHO, A. L., NASCIMENTO, S. F., DE MATOS, R. B., GOUVEIA, E. L., REIS, M. G. & KO, A. I. 2008. Household transmission of leptospira infection in urban slum communities. *PLoS Negl Trop Dis*, 2, e154.
- MALMSTROM, J., BECK, M., SCHMIDT, A., LANGE, V., DEUTSCH, E. W. & AEBERSOLD, R. 2009. Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen Leptospira interrogans. *Nature*, 460, 762-5.
- MANEEWATCH, S., SAKOLVAREE, Y., SAENGJARUK, P., SRIMANOTE, P., TAPCHAISRI, P., TONGTAWE, P., KLAYSING, B., WONGRATANACHEEWIN, S., CHONGSA-NGUAN, M. & CHAICUMPA, W. 2008. Monoclonal antibodies to LipL32 protect against heterologous Leptospira spp. challenge. *Hybridoma (Larchmt)*, 27, 453-65.
- MARCSISIN, R. A., BARTPHO, T., BULACH, D. M., SRIKRAM, A., SERMSWAN, R. W., ADLER, B. & MURRAY, G. L. 2013. Use of a high-throughput screen to identify Leptospira mutants unable to colonize the carrier host or cause disease in the acute model of infection. *J Med Microbiol*, 62, 1601-8.
- MATSUNAGA, J., SCHLAX, P. J. & HAAKE, D. A. 2013. Role for cis-acting RNA sequences in the temperature-dependent expression of the multiadhesive lig proteins in Leptospira interrogans. *J Bacteriol*, 195, 5092-101.
- MATSUNAGA, J., YOUNG, T. A., BARNETT, J. K., BARNETT, D., BOLIN, C. A. & HAAKE, D. A. 2002. Novel 45-kilodalton leptospiral protein that is processed to

- a 31-kilodalton growth-phase-regulated peripheral membrane protein. *Infection and Immunity*, 70, 323-334.
- MCBRIDE, A. J., ATHANAZIO, D. A., REIS, M. G. & KO, A. I. 2005. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis*, 18, 376-86.
- MGODE, G. F., MACHANG'U, R. S., MHAMPHI, G. G., KATAKWEBA, A., MULUNGU, L. S., DURNEZ, L., LEIRS, H., HARTSKEERL, R. A. & BELMAIN, S. R. 2015. Leptospira Serovars for Diagnosis of Leptospirosis in Humans and Animals in Africa: Common Leptospira Isolates and Reservoir Hosts. *PLoS Negl Trop Dis*, 9, e0004251.
- MONAHAN, A. M., CALLANAN, J. J. & NALLY, J. E. 2008. Proteomic analysis of *Leptospira interrogans* shed in urine of chronically infected hosts. *Infect Immun*, 76, 4952-8.
- MURRAY, G. L. 2013. The lipoprotein LipL32, an enigma of leptospiral biology. *Vet Microbiol*, 162, 305-14.
- 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., SRIKRAM, A., HENRY, R., HARTSKEERL, R. A., SERMSWAN, R. W. & ADLER, B. 2010. Mutations affecting *Leptospira interrogans* lipopolysaccharide attenuate virulence. *Mol Microbiol*, 78, 701-9.
- MURRAY, G. L., SRIKRAM, A., HOKE, D. E., WUNDER, E. A., JR., HENRY, R., LO, M., ZHANG, K., SERMSWAN, R. W., KO, A. I. & ADLER, B. 2009. Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*. *Infect Immun*, 77, 952-8.
- MWACHUI, M. A., CRUMP, L., HARTSKEERL, R., ZINSSTAG, J. & HATTENDORF, J. 2015. Environmental and Behavioural Determinants of Leptospirosis Transmission: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis*, 9, e0003843.
- NAHORI, M. A., FOURNIE-AMAZOUZ, E., QUE-GEWIRTH, N. S., BALLOY, V., CHIGNARD, M., RAETZ, C. R., SAINT GIRONS, I. & WERTS, C. 2005. Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. *J Immunol*, 175, 6022-31.
- NAKAMURA, S., LESHANSKY, A., MAGARIYAMA, Y., NAMBA, K. & KUDO, S. 2014. Direct measurement of helical cell motion of the spirochete leptospira. *Biophys J*, 106, 47-54.
- NALLY, J. E., CHOW, E., FISHBEIN, M. C., BLANCO, D. R. & LOVETT, M. A. 2005. Changes in lipopolysaccharide O antigen distinguish acute versus chronic *Leptospira interrogans* infections. *Infect Immun*, 73, 3251-60.
- OLIVEIRA, T. L., GRASSMANN, A. A., SCHUCH, R. A., SEIXAS NETO, A. C., MENDONCA, M., HARTWIG, D. D., MCBRIDE, A. J. & DELLAGOSTIN, O. A. 2015. Evaluation of the *Leptospira interrogans* Outer Membrane Protein OmpL37 as a Vaccine Candidate. *PLoS One*, 10, e0142821.
- 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, 1745-50.
- PALIT, A., HAYLOCK, L. M. & COX, J. C. 1986. Storage of pathogenic leptospires in liquid nitrogen. *J Appl Bacteriol*, 61, 407-11.

- PANAPHUT, T., DOMRONGKITCHAIPORN, S. & THINKAMROP, B. 2002. Prognostic factors of death in leptospirosis: A prospective cohort study in Khon Kaen, Thailand. *International Journal of Infectious Diseases*, 6, 52-59.
- PANGBURN, M. K., SCHREIBER, R. D. & MULLER-EBERHARD, H. J. 1977. Human complement C3b inactivator: isolation, characterization, and demonstration of an absolute requirement for the serum protein beta1H for cleavage of C3b and C4b in solution. *J Exp Med*, 146, 257-70.
- PEREIRA, M. M., DA SILVA, J. J., PINTO, M. A., DA SILVA, M. F., MACHADO, M. P., LENZI, H. L. & MARCHEVSKY, R. S. 2005. Experimental leptospirosis in marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*): a new model for studies of severe pulmonary leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg*, 72, 13-20.
- PEROLAT, P., POINGT, J. P., VIE, J. C., JOUANEAU, C., BARANTON, G. & GYSIN, J. 1992. Occurrence of severe leptospirosis in a breeding colony of squirrel monkeys. *Am J Trop Med Hyg*, 46, 538-45.
- PETRINO, M. G. & DOETSCH, R. N. 1978. 'Viscotaxis', a new behavioural response of *Leptospira interrogans* (biflexa) strain B16. *J Gen Microbiol*, 109, 113-7.
- PICARDEAU, M. 2017. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? *Nat Rev Microbiol*, 15, 297-307.
- PINNE, M. & HAAKE, D. 2011. Immuno-fluorescence assay of leptospiral surface-exposed proteins. *J Vis Exp*.
- PINNE, M. & HAAKE, D. A. 2009. A comprehensive approach to identification of surface-exposed, outer membrane-spanning proteins of *Leptospira interrogans*. *PLoS One*, 4, e6071.
- PINNE, M. & HAAKE, D. A. 2013. LipL32 Is a Subsurface Lipoprotein of *Leptospira interrogans*: presentation of new data and reevaluation of previous studies. *PLoS One*, 8, e51025.
- PRAGER, K. C., GREIG, D. J., ALT, D. P., GALLOWAY, R. L., HORNSBY, R. L., PALMER, L. J., SOPHER, J., WU, Q., ZUERNER, R. L., GULLAND, F. M. & LLOYD-SMITH, J. O. 2013. Asymptomatic and chronic carriage of *Leptospira interrogans* serovar Pomona in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Vet Microbiol*, 164, 177-83.
- RADDI, G., MORADO, D. R., YAN, J., HAAKE, D. A., YANG, X. F. & LIU, J. 2012. Three-dimensional structures of pathogenic and saprophytic *Leptospira* species revealed by cryo-electron tomography. *J Bacteriol*, 194, 1299-306.
- RADOLF, J. D., DEKA, R. K., ANAND, A., SMAJS, D., NORRIS, M. V. & YANG, X. F. 2016. *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete: making a living as a stealth pathogen. *Nat Rev Microbiol*, 14, 744-759.
- RAPPOLI, R. 2000. Reverse vaccinology. *Curr Opin Microbiol*, 3, 445-50.
- RATET, G., VEYRIER, F. J., FANTON D'ANDON, M., KAMMERSCHEIT, X., NICOLA, M. A., PICARDEAU, M., BONECA, I. G. & WERTS, C. 2014. Live Imaging of Bioluminescent *Leptospira interrogans* in Mice Reveals Renal Colonization as a Stealth Escape from the Blood Defenses and Antibiotics. *PLoS Negl Trop Dis*, 8, e3359.
- REID, H. A., HERRON, A. J., HINES, M. E. D., ORCHARD, E. A. & ALTMAN, N. H. 1993. Leptospirosis in a white-lipped tamarin (*Saguinus labiatus*). *Lab Anim Sci*, 43, 258-9.
- REIS, R. B., RIBEIRO, G. S., FELZEMBURGH, R. D., SANTANA, F. S., MOHR, S., MELENDEZ, A. X., QUEIROZ, A., SANTOS, A. C., RAVINES, R. R., TASSINARI, W. S., CARVALHO, M. S., REIS, M. G. & KO, A. I. 2008. Impact

- of environment and social gradient on leptospira infection in urban slums. *PLoS Negl Trop Dis*, 2, e228.
- RISTOW, P., BOURHY, P., KERNEIS, S., SCHMITT, C., PREVOST, M. C., LILENBAUM, W. & PICARDEAU, M. 2008. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. *Microbiology*, 154, 1309-17.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. 2000. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SCHARFSTEIN, J., FERREIRA, A., GIGLI, I. & NUSSENZWEIG, V. 1978. Human C4-binding protein. I. Isolation and characterization. *J Exp Med*, 148, 207-22.
- SCHARRIG, E., CARESTIA, A., FERRER, M. F., CEDOLA, M., PRETRE, 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.
- SEGURA, E. R., GANOZA, C. A., CAMPOS, K., RICALDI, J. N., TORRES, S., SILVA, H., CESPEDES, M. J., MATTHIAS, M. A., SWANCUTT, M. A., LOPEZ LINAN, R., GOTUZZO, E., GUERRA, H., GILMAN, R. H., VINETZ, J. M. & PERU-UNITED STATES LEPTOSPIROSIS, C. 2005. Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden. *Clin Infect Dis*, 40, 343-51.
- 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.
- SEJVAR, J., BANCROFT, E., WINTHROP, K., BETTINGER, J., BAJANI, M., BRAGG, S., SHUTT, K., KAISER, R., MARANO, N., POPOVIC, T., TAPPERO, J., ASHFORD, D., MASCOLA, L., VUGIA, D., PERKINS, B. & ROSENSTEIN, N. 2003. Leptospirosis in "Eco-Challenge" athletes, Malaysian Borneo, 2000. *Emerg Infect Dis*, 9, 702-7.
- SETHI, S., SHARMA, N., KAKKAR, N., TANEJA, J., CHATTERJEE, S. S., BANGA, S. S. & SHARMA, M. 2010. Increasing trends of leptospirosis in northern India: a clinico-epidemiological study. *PLoS Negl Trop Dis*, 4, e579.
- SHAW, R. D. 1992. Kayaking as a risk factor for leptospirosis. *Mo Med*, 89, 354-7.
- SHIVE, R. J., GREEN, S. S., EVANS, L. B. & GARNER, F. M. 1969. Leptospirosis in barbary apes (*Macaca sylvana*). *J Am Vet Med Assoc*, 155, 1176-8.
- 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.
- SMYTHE, L., DOHNT, M., NORRIS, M., SYMONDS, M. & SCOTT, J. 1997. Review of leptospirosis notifications in Queensland 1985 to 1996. *Commun Dis Intell*, 21, 17-20.
- STALHEIM, O. H. 1968. Vaccination of hamsters, swine, and cattle with viable, avirulent *Leptospira pomona*. *Am J Vet Res*, 29, 1463-8.
- STALHEIM, O. H. 1971. Duration of immunity in cattle in response to a viable, avirulent *Leptospira pomona* vaccine. *Am J Vet Res*, 32, 851-4.
- STENERODEN, K. K., HILL, A. E. & SALMAN, M. D. 2011. Zoonotic disease awareness in animal shelter workers and volunteers and the effect of training. *Zoonoses Public Health*, 58, 449-53.

- STERLING, C. R. & THIERMANN, A. B. 1981. Urban rats as chronic carriers of leptospirosis: an ultrastructural investigation. *Vet Pathol*, 18, 628-37.
- STEVENSON, B., CHOY, H. A., PINNE, M., ROTONDI, M. L., MILLER, M. C., DEMOLL, E., KRAICZY, P., COOLEY, A. E., CREAMER, T. P., SUCHARD, M. A., BRISSETTE, C. A., VERMA, A. & HAAKE, D. A. 2007. Leptospira interrogans Endostatin-Like Outer Membrane Proteins Bind Host Fibronectin, Laminin and Regulators of Complement. *PLoS ONE*, 2, e1188.
- STIMSON, A. M. 1907. Note on an organism found in Yellow-fever tissue. *Public Health Reports* 22.
- TAKABE, K., NAKAMURA, S., ASHIHARA, M. & KUDO, S. 2013. Effect of osmolarity and viscosity on the motility of pathogenic and saprophytic Leptospira. *Microbiol Immunol*, 57, 236-9.
- TANGEMAN, L. E. & LITTMAN, M. P. 2013. Clinicopathologic and atypical features of naturally occurring leptospirosis in dogs: 51 cases (2000-2010). *J Am Vet Med Assoc*, 243, 1316-22.
- THOMAS, D. D. & HIGBIE, L. M. 1990. In vitro association of leptospires with host cells. *Infect Immun*, 58, 581-5.
- TOMA, C., OKURA, N., TAKAYAMA, C. & SUZUKI, T. 2011. Characteristic features of intracellular pathogenic Leptospira in infected murine macrophages. *Cell Microbiol*, 13, 1783-92.
- TORTEN, M., SHENBERG, E., GERICHTER, C. B., NEUMAN, P. & KLINGBERG, M. A. 1973. A new leptospiral vaccine for use in man. II. Clinical and serologic evaluation of a field trial with volunteers. *J Infect Dis*, 128, 647-51.
- TRUCCOLO, J., CHARAVAY, F., MERIEN, F. & PEROLAT, P. 2002. Quantitative PCR assay to evaluate ampicillin, ofloxacin, and doxycycline for treatment of experimental leptospirosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 848-853.
- TRUEBA, G., ZAPATA, S., MADRID, K., CULLEN, P. & HAAKE, D. 2004. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic Leptospira to survive in fresh water. *Int Microbiol*, 7, 35-40.
- VERMA, A., BRISSETTE, C. A., BOWMAN, A. A., SHAH, S. T., ZIPFEL, P. F. & STEVENSON, B. 2010. Leptospiral endostatin-like protein A is a bacterial cell surface receptor for human plasminogen. *Infect Immun*, 78, 2053-9.
- VERMA, A., HELLWAGE, J., ARTIUSHIN, S., ZIPFEL, P. F., KRAICZY, P., TIMONEY, J. F. & STEVENSON, B. 2006. LfhA, a novel factor H-binding protein of Leptospira interrogans. *Infect Immun*, 74, 2659-66.
- VINOD KUMAR, K., LALL, C., RAJ, R. V., VEDHAGIRI, K., SUNISH, I. P. & VIJAYACHARI, P. 2016. In Vitro Antimicrobial Susceptibility of Pathogenic Leptospira Biofilm. *Microb Drug Resist*, 22, 511-514.
- 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. *Nature Immunology*, 2, 346-352.
- WITCHELL, T. D., ESHGHI, A., NALLY, J. E., HOF, R., BOULANGER, M. J., WUNDER, E. A., JR., KO, A. I., HAAKE, D. A. & CAMERON, C. E. 2014. Post-translational modification of LipL32 during Leptospira interrogans infection. *PLoS Negl Trop Dis*, 8, e3280.
- WOLFF, D. G., CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M., ABE, C. M., MONARIS, D., MORAIS, Z. M., SOUZA, G. O., VASCONCELLOS, S. A., ISAAC, L., ABREU,

- P. A. & BARBOSA, A. S. 2013. Interaction of leptospira elongation factor tu with plasminogen and complement factor h: a metabolic leptospiral protein with moonlighting activities. *PLoS One*, 8, e81818.
- WUNDER, E. A., FIGUEIRA, C. P., BENAROUDJ, N., HU, B., TONG, B. A., TRAJTENBERG, F., LIU, J., REIS, M. G., CHARON, N. W., BUSCHIAZZO, A., PICARDEAU, M. & KO, A. I. 2016a. A novel flagellar sheath protein, FcpA, determines filament coiling, translational motility and virulence for the Leptospira spirochete. *Mol Microbiol*.
- WUNDER, E. A., JR., FIGUEIRA, C. P., SANTOS, G. R., LOURDAULT, K., MATTHIAS, M. A., VINETZ, J. M., RAMOS, E., HAAKE, D. A., PICARDEAU, M., DOS REIS, M. G. & KO, A. I. 2016b. Real-Time PCR Reveals Rapid Dissemination of Leptospira interrogans after Intraperitoneal and Conjunctival Inoculation of Hamsters. *Infect Immun*, 84, 2105-15.
- WUTHIEKANUN, V., CHIERAKUL, W., LIMMATHUROTSAKUL, D., SMYTHE, L. D., SYMONDS, M. L., DOHNT, M. F., SLACK, A. T., LIMPAIBOON, R., SUPUTTAMONGKOL, Y., WHITE, N. J., DAY, N. P. & PEACOCK, S. J. 2007. Optimization of culture of Leptospira from humans with leptospirosis. *J Clin Microbiol*, 45, 1363-5.
- YAN, W., FAISAL, S. M., MCDONOUGH, S. P., DIVERS, T. J., BARR, S. C., CHANG, C. F., PAN, M. J. & CHANG, Y. F. 2009. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant Leptospira immunoglobulin-like protein B (rLigB) in a hamster challenge model. *Microbes Infect*, 11, 230-7.
- ZHANG, Y., LOU, X. L., YANG, H. L., GUO, X. K., ZHANG, X. Y., HE, P. & JIANG, X. C. 2012. Establishment of a leptospirosis model in guinea pigs using an epicutaneous inoculations route. *BMC Infect Dis*, 12, 20.
- ZILBER, A. L., BELLI, P., GREZEL, D., ARTOIS, M., KODJO, A. & DJELOUADJI, Z. 2016. Comparison of Mucosal, Subcutaneous and Intraperitoneal Routes of Rat Leptospira Infection. *PLoS Negl Trop Dis*, 10, e0004569.
- ZUERNER, R. L. 2005. Laboratory maintenance of pathogenic Leptospira. *Curr Protoc Microbiol*, Chapter 12, Unit 12E.1.
- ZUERNER, R. L. 2015. Host response to leptospira infection. *Curr Top Microbiol Immunol*, 387, 223-50.
- ZUERNER, R. L., KNUDTSON, W., BOLIN, C. A. & TRUEBA, G. 1991. Characterization of outer membrane and secreted proteins of Leptospira interrogans serovar pomona. *Microb Pathog*, 10, 311-22.

## 9 ANEXOS

### 9.1 Anexo I: Artigo publicado

#### **A Universal Vaccine Against Leptospirosis: Are We Going in the Right Direction?**

Grassmann AA, **Souza JD**, McBride AJA

**Frontiers in Immunology**. 8:256 (2017)

doi:10.3389/fimmu.2017.00256

Fator de Impacto: 5,695 (Qualis A1)

**9.2 Anexo II: Artigo publicado****Discovery of Novel Leptospirosis Vaccine Candidates Using Reverse and Structural Vaccinology**

Grassmann AA, Kremer FS, Santos JC, **Souza JD**, Pinto LS, McBride AJA

**Frontiers in Immunology**. 8:463 (2017)

doi:10.3389/fimmu.2017.00463

Fator de Impacto: 5,695 (Qualis A1)

### **9.3 Anexo III: Artigo publicado**

#### **LigB Subunit Vaccine Confers Sterile Immunity Against Challenge in the Hamster Model of Leptospirosis**

Conrad NL, McBride FWC, **Souza JD**, Silveira MM, Félix SR, Mendonça KS, Santos CS, Athanazio DA, Medeiros MA, Reis MG, Dellagostin OA, McBride AJA

**PLoS Neglected Tropical Diseases.** 11(3):e0005441 (2017)

doi:10.1371/journal.pntd.0005441

Fator de Impacto: 3,948 (Qualis A2)