

GABRIELA PACHECO SÁNCHEZ

**Desenvolvimento de uma vacina de subunidade contra
a leptospirose**

São Paulo

2019

GABRIELA PACHECO SÁNCHEZ

Desenvolvimento de uma vacina de subunidade contra a leptospirose

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dra. Patrícia Antonia Estima Abreu de Aniz

Co-orientador:

Dra. Denize Monaris

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2019

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3816
FMVZ

Sánchez, Gabriela Pacheco
Desenvolvimento de uma vacina de subunidade contra a leptospirose / Gabriela Pacheco Sánchez. – 2019.
93 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Antonia Estima Abreu de Aniz.

Coorientadora: Dra. Denize Monaris.

1. Leptospira. 2. Leptospirose. 3. LigA. 4. LcpA. 5. Vacina de subunidade. I. Título.



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 19 de setembro de 2018
CEUA N 7643121115

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Patrícia Antonia Estima Abreu De Aniz
Área: Epidemiologia Experimental Aplicada As Zoonoses

Título da proposta: ""Desenvolvimento de uma vacina de subunidade contra a leptospirose."".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ (ID 003764)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 13/agosto/2018) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Gostaria de solicitar a inclusão da aluna de doutorado Gabriela Pacheco Sánchez. A Gabriela é veterinária e aluna do VPS."

Comentário da CEUA: "Aprovada a inclusão de membro da equipe."

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo



São Paulo, 18 de outubro de 2018
CEUA N [7643121115](#)

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Patrícia Antonia Estima Abreu De Aniz

Área: Epidemiologia Experimental Aplicada As Zoonoses

Título da proposta: ""Desenvolvimento de uma vacina de subunidade contra a leptospirose.""

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ (ID 003973)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 09/outubro/2018) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Prezados senhores, Esta emenda tem a finalidade de solicitar alteração de vigência do projeto por um período adicional de um ano devido à demora na importação da resina utilizada na purificação das proteínas recombinantes. A vigência atual é janeiro/2016 até janeiro de 2019. A nova vigência será de janeiro de 2016 até janeiro de 2020. Declaro que não houve alteração da metodologia e das técnicas descritas inicialmente para esta presente solicitação. Agradeço a atenção, Patrícia".

Comentário da CEUA: "De acordo com a solicitação de alteração de vigência do projeto por um período adicional de um ano. A solicitação foi realizado devido à demora na importação da resina utilizada na purificação das proteínas recombinantes, a vigência atual era de janeiro/2016 até janeiro de 2019 e agora será prorrogada para janeiro de 2020".

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: PACHECO SANCHEZ, Gabriela

Título: **Desenvolvimento de uma vacina de subunidade contra a leptospirose**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, de sangue e de vida, pelo amor e apoio incondicional e por esse sempre sincero “Tú puedes”.

AGRADECIMENTOS

Á meus amados pais, por apoiar cada louca e impulsiva decisão minha, por querer sempre o melhor para mim e por me amar incondicionalmente; mesmo não tendo dado netos para eles, ainda 😊!. Madre, siempre mi más grande y ferviente fan. Mil “gracias” nunca serán suficientes para ti. Sé que piensas que como académica te superaré, y eso aún no lo sabemos con seguridad; pero lo que si aseguro es que salí completamente parecida a ti y ese es mi mayor orgullo. Amooooo!

Á meus irmãos. Obrigada pelo apoio moral nesta jornada académica. Obrigada por serem esses seres complicados que vocês são. Obrigada por me permitirem apreender de vocês. Obrigada por estar sempre aí para mim. Gracias por ser los hermanos federicos más complicadamente especiales. Los amo!

Á Gianella, aquela que sempre me apresenta como “minha madrinha”. Aquela que está motivando minhas decisões profissionais, aquela que aprendeu (junto comigo) que brincar a distância e por chamadas de vídeo também pode ser muito divertido. Aquela que diz parecer mais comigo que com a própria mãe, aquela mini-pessoa competitiva, aquela minha *mini-me*! Es tanto lo que me enseñas a cada día, Gia pipi, que espero poder retribuir guiando tus pasos por un buen tiempo. Contigo, hasta el fin y más allá!

Ás minhas orientadoras, Patrícia e Denize. Obrigada pelos exemplos de orientação. Obrigada pelo recebimento, pela oportunidade de apreender com vocês, pela paciência, pelas correções e pelos conselhos de vida.

Às leptospiradas, às atuais (Ma, Ka, Da, Pri, Le, Jo e Julinha) e às que passaram pelo laboratório (Aline, Dri, Laris e Lud) durante meus anos de doutorado. Obrigada por todas as risadas, pelos bons papos e pelo apoio moral de sempre. Obrigada por fazerem parte da minha jornada de vida e por me permitir fazer parte da jornada de vocês. Aprendi e desaprendi muito com vocês nesses três anos. Aprendi com o jeito

especial e único de cada uma de vocês, aprendi sobre a riqueza das diferenças e desaprendi sobre a pobreza dos julgamentos. Até sempre 😊!

Ao pessoal do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan e ao pessoal de qualidade de vida do Instituto Butantan (Eliane e Renan). Obrigada por me ensinar tanto em tão pouco tempo e pela disponibilidade de sempre. Obrigada pelos cafés, pelos bons dias, pelas horas de boa convivência e por ter me apresentando minha mais nova paixão: a corrida de rua.

Ao Laboratório de Zoonoses Bacterianas da FMVZ-USP, liderado pelo Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann, pela colaboração nos experimentos realizados.

À equipe colaboradora da Unidade de Farmacologia e Imunologia, Instituto de Biologia e Tecnologia de Saclay – CEA, França, liderado pelo Dr. Michel Léonetti, pela colaboração com as clonagens das fusões às proteínas recombinantes e pela parceria profissional.

Aos professores que me orientaram como aluna PAE: Nilson Benites, Marcos Heinemann e Simone Balian. Obrigada pela motivação acadêmica. Foi um prazer ter vivenciado o ensino na graduação veterinária brasileira através das suas disciplinas.

Aos lasabianos (amigos do mestrado), a Simone (orientadora de mestrado), a Lina (parceira colombiana de vida) e a Katty (parceira chilena de vida). Obrigada por manter essa forte união que começou há alguns anos. Obrigada por estar sempre ali para mim quando precisei de alguma coisa, conselho ou simples palavras de bom ânimo. Mais um ciclo terminou e vocês continuam comigo. Até sempre 😊!

À CAPES (Proex -1651785) pela bolsa de doutorado concedida.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – código de Financiamento 001”

“Recognizing the problem is the key to find the solution”

(Rino Rappuoli)

RESUMO

SANCHEZ, G.P. **Desenvolvimento de uma vacina de subunidade contra a leptospirose.** 2019. 93 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A leptospirose é uma zoonose reemergente de grande impacto na saúde animal e pública, que tem como agente etiológico às espécies patogênicas do gênero *Leptospira*. As vacinas comerciais contra esta doença são preparações de culturas de leptospiros de sorovares patogênicos, inativadas pela ação do calor ou formol (bacterinas). Estas vacinas são sorovar específicas e estimulam predominantemente a resposta imune humoral, reforçando a necessidade de revacinação anual para manter os níveis de anticorpos protetores. Além disso, há controvérsias sobre este tipo de vacina em relação à inibição da colonização renal. Por isso, novos antígenos têm sido avaliados para compor uma vacina mais eficaz contra a leptospirose, que confira proteção contra as diversas espécies patogênicas, previna a colonização bacteriana, gere resposta imune duradoura e apresente mínimos efeitos adversos. Os candidatos vacinais mais promissores são as proteínas de superfície LigA e LigB (*Leptospiral immunoglobulin-like proteins*), que são expressas durante a infecção e participam dos mecanismos de adesão às células do hospedeiro. Outra proteína promissora é a LcpA (*Leptospiral complement regulator-acquiring protein A*), cuja função é a interação com o fator regulador C4BP, sugerindo uma estratégia das leptospiros de evasão do sistema complemento. LcpA é conservada entre as espécies patogênicas e expressa durante o curso da infecção, sugerindo um papel potencial como antígeno vacinal. Assim, o objetivo geral deste trabalho foi desenvolver uma vacina de subunidade contra a leptospirose utilizando as proteínas recombinantes LigAC (porção C-terminal da proteína LigA) e a proteína LcpA como antígenos. Com o intuito de aumentar a imunogenicidade destas proteínas, através do melhoramento da eficiência dos mecanismos de captura, processamento e apresentação do antígeno ao sistema imune, foram utilizadas duas estratégias vacinais. A primeira consistiu na fusão das proteínas ao domínio ZZ da proteína A de *Staphylococcus aureus*, capaz de se ligar à região Fc das imunoglobulinas; e ao domínio R da toxina diftérica (DTR), um ligante à heparam sulfato. A segunda estratégia consistiu na utilização de três adjuvantes: hidróxido de alumínio (Alum), CpG-ODN (agonista de TLR-9) e o anticorpo monoclonal anti-MHC II (clone

14.4.4S). Os resultados obtidos mostraram que a formulação vacinal contendo a proteína LcpA fusionada aos domínios ZZ e DTR mais Alum foi capaz de induzir 100% e 60% de proteção contra a morte nos desafios homólogo e heterólogo, respectivamente. A proteína LcpA não fusionada induziu proteção parcial (60%) na presença de Alum. Estes resultados sugerem que os domínios ZZ e DTR são capazes de apresentar o antígeno de maneira mais eficiente. As formulações vacinais contendo LigAC e LcpA fusionadas aos domínios, independente do adjuvante utilizado, foram capazes de induzir proteção contra a morte, mas não foram capazes de inibir a colonização renal, apesar dos altos títulos de anticorpos, direcionados principalmente à proteína LigAC. Assim, conclui-se que as proteínas LigAC e LcpA fusionadas aos domínios ZZ e DTR são candidatos vacinais promissores; e que outras estratégias vacinais utilizando essas proteínas precisam ser testadas para melhorar a imunogenicidade das mesmas e conseguir imunidade esterilizante contra a leptospirose.

Palavras-chave: Leptospira, Leptospirose, LigA, LcpA, Vacina de subunidade.

ABSTRACT

SANCHEZ, G.P. **Development of a subunit vaccine against leptospirosis**. 2019. 93 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Leptospirosis is a reemerging zoonosis of great impact in animal and public health, which has the pathogenic species of genus *Leptospira* as its etiological agent. Commercial vaccines against this disease consist of leptospiral culture preparations from pathogenic serovars, inactivated by heat or formaldehyde (bacterins). These vaccines are serovar specific and stimulate predominantly humoral immune response, reinforcing the need for annual revaccination to maintain the protective antibody levels. Moreover, there is controversy about these type of vaccines regarding inhibition of renal colonization and bacterial dissemination. Thus, new antigens have been evaluated to compose an effective vaccine against leptospirosis that confers protection against different pathogenic species, prevents bacterial colonization, generates long-lasting immune responses, and exhibits minimum adverse effects. The most promising vaccine candidates are surface proteins LigA and LigB (Leptospiral immunoglobulin-like), which are expressed during infection and play a role in the mechanisms of adhesion to the host cells. Another promising protein is LcpA (Leptospira complement regulator-acquiring protein), which interacts with the regulator factor C4BP, suggesting leptospires' strategy for evading the complement system. LcpA is conserved among pathogenic species and expressed during infection, suggesting a potential role as a vaccine antigen. Therefore, this work aimed to develop a subunit vaccine against leptospirosis, using recombinant leptospiral proteins LigAC (C-terminal region of protein LigA) and LcpA, as antigens. Two strategies were used for increasing the immunogenicity of these proteins, through improvement of the efficiency of antigen capture, processing, and presentation to the immune systems mechanisms. The first consisted of fusion of proteins to domain ZZ of protein A of *Staphylococcus aureus*, capable of binding to the Fc region of immunoglobulins; and to R domain of diphtheria toxin (DTR), which is a ligand of heparan sulfate. The second strategy consisted of testing three adjuvants: aluminium hydroxide (Alum), CpG-ODN and monoclonal antibody anti-MHC II (14.4.4S). Results obtained showed that the vaccine formulation containing LcpA protein fused to domains ZZ and DTR plus Alum was capable of inducing 100%

and 60% of protection against death in both homologous and heterologous challenge, respectively. Protein LcpA not fused induced partial protection (60%) in presence of Alum. These results suggest that domains ZZ and DTR are capable of presenting antigens in a much efficient manner. Vaccine formulations consisting of LigAC and LcpA fused to domains, independently of the adjuvant used, were able to induce protection against death caused by leptospirosis in hamsters, but they were not capable of inhibiting renal colonization, despite the high antibody titers directed to the LigAC protein. Thus, it can be concluded that proteins LigAC and LcpA fused to domains ZZ and DTR are promising vaccine candidates; and that other vaccines strategies, using these proteins need to be tested to enhance their immunogenicity and achieve sterilizing immunity against leptospirosis.

Keywords: Leptospira, leptospirosis, LigA, LcpA, subunit vaccine

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Leptospira sob microscopia eletrônica.....	22
Figura 2 - Classificação das espécies de leptospiros	23
Figura 3 - Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína LcpA em espécies de leptospiros patogênicas.....	31
Figura 6 - Calendário dos ensaios de imunoproteção em modelo animal.	43
Figura 7 - Análise da purificação das proteínas recombinantes após a diálise contra tampão PBS.....	51
Figura 8 - Análise da purificação da proteína recombinante ZZ-DTR-LigAC.....	52
Figura 9 - Representação esquemática da predição teórica da estrutura do domínio ZZ da proteína A de S. aureus e do domínio R da toxina diftérica (DTR).....	54
Figura 10 - Representação esquemática da predição teórica da estrutura das cinco proteínas recombinantes utilizadas no estudo.	54
Figura 11 – Espectros de dicroísmo circular das estruturas secundárias proteicas.	55
Figura 12 – Espectros de dicroísmo circular obtidos para as proteínas recombinantes LigAC (A), ZZ-LigAC-DTR (B), ZZ-DTR-LigAC (C), LcpA (D) e ZZ-LcpA-DTR (E).	56
Figura 13 – Análise do processo de purificação do anticorpo anti-MHC de classe II (14.4.4S) a partir do sobrenadante do cultivo do hibridoma HB-32 em coluna IgG-Sepharose.	57
Figura 14 – Ensaio 1: Análise da carga bacteriana dos rins dos animais sobreviventes ao desafio, pela técnica de PCR quantitativo (qPCR).....	61
Figura 15 – Ensaio 1: Avaliação de IgG total em hamsters imunizados com as diferentes formulações vacinais, com placas adsorvidas com LigAC e LcpA.	63
Figura 16 – Ensaio 1: Avaliação das subclasses de IgG (IgG1, IgG2/3 e IgG3) em hamsters imunizados com diferentes formulações vacinais.....	64
Figura 17 – Ensaio 2: Análise da carga bacteriana dos rins dos animais sobreviventes ao desafio, pela técnica de PCR quantitativo (qPCR).....	66
Figura 18 – Ensaio 2: Avaliação de IgG total em hamsters imunizados com as diferentes formulações vacinais.....	67
Figura 19 – Ensaio 2: Avaliação das subclasses de IgG (IgG1, IgG2/3 e IgG3) em hamsters imunizados com as diferentes formulações vacinais.....	68
Figura 20 – Ensaio 3: Avaliação de IgG total em hamsters imunizados com as diferentes formulações vacinais.....	71

Figura 21 – Ensaio 3: Avaliação das subclasses de IgG (IgG1, IgG2/3 e IgG3) em hamsters imunizados com diferentes formulações vacinais.....	72
Figura 22 – Ensaio 4: Análise da carga bacteriana dos rins dos animais sobreviventes ao desafio, pela técnica de PCR quantitativo (qPCR).....	75
Figura 23 – Ensaio 4: Avaliação de IgG total em hamsters imunizados com as diferentes formulações vacinais.....	76
Figura 24 – Ensaio 4: Avaliação das subclasses de IgG (IgG1, IgG2/3 e IgG3) em hamsters imunizados com diferentes formulações vacinais.....	78

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Conservação da proteína LcpA entre as espécies patogênicas de leptospiras.....	30
Quadro 2 – Composição das formulações vacinais utilizadas no primeiro ensaio de imunoproteção.....	44
Quadro 3 – Composição das formulações vacinais utilizadas no segundo ensaio de imunoproteção.....	45
Quadro 4 – Composição das formulações vacinais utilizadas no terceiro e quarto ensaio de imunoproteção.....	46
Quadro 5 – Oligonucleotídeos e sonda utilizados para quantificar DNA genômico de leptospiras presente nos rins dos animais que sobreviveram ao desafio com estirpes virulentas de Leptospiras.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados das proteínas recombinantes do estudo.....	50
Tabela 2 – Predição teórica de estruturas secundárias das proteínas recombinantes do estudo.....	53
Tabela 3 – Ensaio 1: Desafio homólogo de imunoproteção em hamsters.	60
Tabela 4 – Ensaio 2: Desafio heterólogo de imunoproteção em hamsters.	65
Tabela 5 – Ensaio 3: Desafio homólogo de imunoproteção em hamsters.	70
Tabela 6 – Ensaio 4: Desafio homólogo de imunoproteção em hamsters.	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
ABTS	<i>2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)</i> (solução de revelação de <i>ELISA</i>)
Al(OH) ₃	Hidróxido de alumínio
Alum	Hidróxido de alumínio
APC	Célula apresentadora de antígenos
ATCC	<i>American type culture collection</i>
C4BP	<i>C4b-binding protein</i>
CFR	<i>Code of Federal Regulations</i>
cm ²	Centímetro quadrado
CO ₂	Dióxido de carbono
DALY	<i>Disability Adjusted Life Years</i>
DC	Dicroísmo circular
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTR	Domínio R da toxina diftérica
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMJH	<i>Ellinghausen McCullough Johnson Harris</i> (meio de cultura padrão para leptospiros)
EqG	Equivalentes genômicos
HCl	Ácido clorídrico
IFN-γ	Interferon gamma
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
kDa	Quilodáton
LB	Meio Luria-Bertani
LB-Amp	Meio Luria-Bertani com ampicilina
LcpA	<i>Leptospiral complement regulator-acquiring protein A</i>
Lig	<i>leptospiral immunoglobulin-like</i>
LipL32	Lipoproteína L32
LMW	<i>Low Molecular Weigh</i>

	(marcador de massa molecular)
LO4	<i>L. interrogans</i> sorovar <i>Canicola</i>
LPF	<i>L. interrogans</i> sorovar <i>Kenewicki</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MAT	Soroaglutinação microscópica
MHC II	<i>Major histocompatibility complex type II</i>
mL/min	Mililitros por minuto
NaCl	Cloreto de sódio
NiSO ₄	Sulfato de níquel
nM	Nanomolar
Omp	<i>Outer Membrane Protein</i>
p	Valor estatístico p
p/v	Partes por volume
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
PGHS	Proteoglicano de heparam sulfato
pH	Poder de hidrogênio
pI	Ponto isoelétrico
PMSF	Fenilmetilsulfonilflúor (inibidor de protease)
qPCR	PCR quantitativo
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (meio de cultura)
SFB	Soro fetal bovino
TLR-9	Receptores do tipo Toll-9
Tris-HCl	<i>Tris Hydrochloride</i>
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1 LEPTOSPIRA E LEPTOSPIROSE	22
1.2 VACINAS CONTRA A LEPTOSPIROSE	27
1.2.2. Candidatos Vacinais	28
1.2.3. Estratégias Vacinais	32
1.2.3.1. Proteínas fusionadas a domínios imunogênicos	32
1.2.3.2. Uso de adjuvantes nas formulações vacinais	34
2. OBJETIVO	36
2.1. OBJETIVO GERAL	36
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 ESTIRPES BACTERIANAS	37
3.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	37
3.2.1 Proteínas recombinantes com cauda de histidina	38
3.2.2 Proteínas recombinantes de fusão	39
3.3 ANÁLISE DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA POR DICROÍSMO CIRCULAR	40
3.4 PRODUÇÃO DO ANTI-MHC CLASSE II.....	41
3.5 ENSAIOS DE IMUNOPROTEÇÃO EM MODELO ANIMAL	42
3.5.1 Cultura em meio semissólido de Fletcher	46
3.5.2 PCR quantitativo dos rins de hamsters vacinados e infectados	47
3.5.3 Avaliação da resposta imune dos hamsters por ELISA	48
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
4. RESULTADOS	50
4.1 ANÁLISE DA PRESENÇA DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES PURIFICADAS	52
4.2 PRODUÇÃO DE ANTI-MHC II.....	57
4.3 ENSAIOS DE IMUNOPROTEÇÃO EM MODELO ANIMAL	57
4.3.1. Primeiro ensaio de imunoproteção	58

4.3.1.1	Análise geral da avaliação contra a morte e colonização renal.	58
4.3.1.2	Análise da carga bacteriana nos rins de hamsters por qPCR.....	59
4.3.1.3	Análise da resposta imune humoral para IgG total e as subclasses IgG1, IgG2/3 e IgG3 por ELISA.	61
4.3.2.	Segundo ensaio de imunoproteção.....	65
4.3.2.1	Análise geral da avaliação contra a morte e colonização renal.	65
4.3.2.2	Análise da carga bacteriana nos rins de hamsters por qPCR.....	66
4.3.2.3	Análise da resposta imune humoral para IgG total e as subclasses IgG1, IgG2/3 e IgG3 por ELISA.	67
4.3.3.	Terceiro ensaio de imunoproteção.....	69
4.3.3.1	Análise geral da avaliação contra a morte.....	69
4.3.3.2	Análise da resposta imune humoral para IgG total e as subclasses IgG1, IgG2/3 e IgG3 por ELISA:	70
4.3.4.	Quarto ensaio de imunoproteção	73
4.3.4.1	Análise geral da avaliação contra a morte e colonização renal:	73
4.3.4.2	Análise da carga bacteriana nos rins de hamsters por qPCR:.....	74
4.3.4.3	Análise da resposta imune humoral para IgG total e as subclasses IgG1, IgG2/3 e IgG3 por ELISA:	75
5.	DISCUSSÃO	79
6.	CONCLUSÕES	87
	REFERENCIAS	89

1. INTRODUÇÃO

1.1 LEPTOSPIRA E LEPTOSPIROSE

A leptospirose é uma zoonose reemergente que tem como agente etiológico as espécies patogênicas do gênero *Leptospira* (ACHA; SZYFRES, 2003). O gênero *Leptospira* é constituído por espiroquetas finas (10-20 μm de comprimento e 0,15 μm de diâmetro), flexíveis, móveis e de forma espiral (Figura 1) (EVANGELISTA; COBURN, 2010; PICARDEAU, 2017). Estas bactérias possuem membrana dupla, sendo que a membrana interna e a parede de peptidoglicano estão intimamente associadas e cobertas por uma membrana externa que contém lipoproteínas de superfície e lipopolissacarídeos (LPS) (HAAKE; MATSUNAGA, 2010). Os extremos das leptospiras são característicos em forma de ganchos e a motilidade deve-se à rotação dos flagelos axiais inseridos nos extremos opostos das bactérias, estendendo-se pelo espaço periplasmático (região central) (ACHA; SZYFRES, 2003; PICARDEAU, 2013). Estas bactérias são aeróbias obrigatórias e crescem sob temperatura de 28-30 °C em meios líquidos ou semissólidos, os quais devem conter nutrientes como vitaminas B1 e B12, ácidos graxos, aminoácidos e sais minerais (FAINE et al., 1999; PICARDEAU, 2013). As leptospiras são rapidamente inativadas quando expostas ao calor excessivo, radiação ultravioleta, desinfetantes e a temperaturas de congelamento. Porém, quando as condições são favoráveis, podem sobreviver na água e no solo úmido durante semanas e até meses (ACHA; SZYFRES, 2003; ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

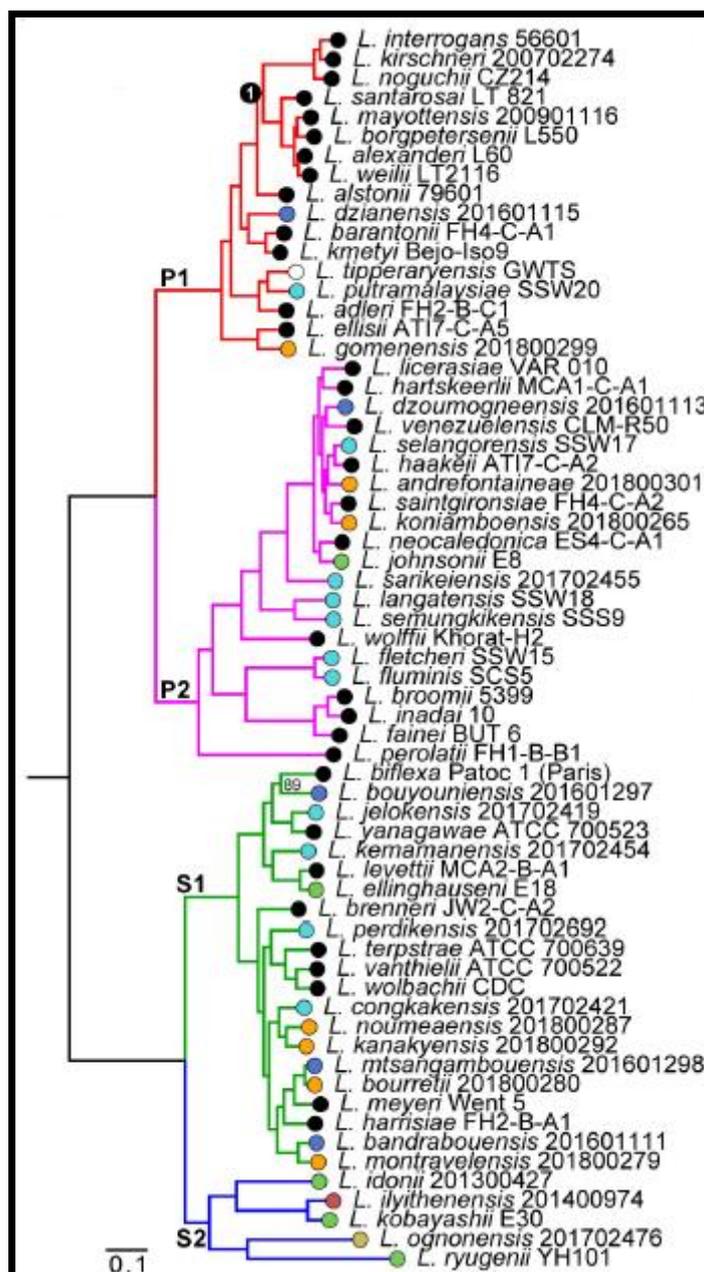
Figura 1 - Leptospira sob microscopia eletrônica



Fonte: PICARDEAU, 2013.

Na classificação taxonômica atual das leptospiiras, realizada mediante o uso da técnica de sequenciamento completo do genoma, são descritas 64 espécies de *Leptospira* spp., divididas por filogenia molecular em duas grandes subclades: patogênicas (P1 e P2) e saprófitas (S1 e S2) (VINCENT et al., 2019).

Figura 2 - Classificação das espécies de leptospiiras



Fonte: VINCENT et al, 2019.

Além da classificação taxonômica, as leptospiiras são classificadas em sorovares, através do teste de aglutinação microscópica com absorção cruzada

usando antígenos homólogos (BHARTI et al., 2003). São descritos mais de 300 sorovares agrupados em 25 sorogrupos, sendo que a lista se mantém em constante atualização (GOARANT, 2016; PICARDEAU, 2017). A correlação entre a classificação sorológica e a taxonômica é nula, já que em um mesmo sorogrupo podem ser encontradas mais de uma espécie. Por conseguinte, os sistemas de classificação baseados em semelhanças genéticas devem ser usados em conjunto com a classificação antigênica, principalmente em estudos epidemiológicos (CERQUEIRA; PICARDEAU, 2009).

A leptospirose é uma doença que está presente em áreas com climas tropicais e subtropicais, em zonas urbanas e rurais, apresentando grande impacto na saúde animal e saúde pública. Diferentes condições climáticas e sociais favorecem a incidência e a distribuição da doença, como chuvas intensas, alta densidade populacional em condições de pobreza e ausência de serviços sanitários (BHARTI et al., 2003; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003; PICARDEAU, 2013). A transmissão desta doença ocorre por contato direto com urina e/ou outros fluidos corporais de animais infectados, como secreções uterinas pós-aborto, feto, placenta infectada e sêmen (ELLIS, 2015); ou por contato indireto com solo, pastagem, fontes de água e/ou alimentos contaminados com urina de hospedeiros de manutenção (agentes disseminadores das bactérias) ou com fluidos corporais de hospedeiros acidentais (que desenvolvem a doença) (LEVETT, 2004; PICARDEAU, 2013). De forma geral, cada sorovar pode estar adaptado a uma espécie particular de hospedeiro de manutenção ou reservatório, estes não manifestam sinais clínicos da doença aguda, mas apresentam colonização renal por leptospiras. Os principais reservatórios urbanos e rurais são os roedores sinantrópicos: *Rattus norvegicus* (ratazana ou rato de esgoto), *Rattus rattus* (rato de telhado) e *Mus musculus* (camundongo) (JOBINS; ALEXANDER, 2015).

Tem-se estimado a ocorrência de um milhão de casos humanos de leptospirose por ano no mundo, resultando em mais de 58.000 mortes (COSTA et al., 2015), além de 2,90 milhões de anos de vida perdidos por morte precoce ou incapacidade (DALY - *Disability Adjusted Life Years*) (TORGERSON et al., 2015). As regiões endêmicas para leptospirose são o Caribe, América do Sul, América Central, Sudeste Asiático e Oceania (PAPPAS et al., 2008). Na Europa, a doença é considerada reemergente, tendo como incidência 0,13 casos a cada 100.000

habitantes em 2010 (DUPOUEY et al., 2014). No Brasil, a doença é de notificação compulsória e de caráter endêmico, podendo ser epidêmica nos períodos chuvosos. Dados oficiais publicados pelo Ministério da Saúde relatam 10.456 casos de leptospirose confirmados no Brasil no período 2015-2017, sendo que as regiões mais afetadas (ou com mais casos notificados) foram as regiões sul e sudeste, com 3.854 e 2.863 casos, respectivamente (BRASIL, 2019).

A infecção começa com o ingresso das leptospiras no sistema sanguíneo, o que pode acontecer via membranas mucosas ou através da pele que apresenta soluções de continuidade (lesões macro ou micro) e/ou imersão em água (ADLER, 2014). A lesão primária é o rompimento da integridade das membranas celulares endoteliais, levando a hemorragias e petéquias vasculares. A partir daí as leptospiras podem alcançar diversos órgãos por disseminação hematogênica (SAMBASIVA et al., 2003). O período de incubação é de aproximadamente uma a duas semanas (alguns relatam até 20 dias). Após passar pela corrente sanguínea, as leptospiras colonizam preferencialmente os rins e o fígado. Os pulmões, pericárdio e gônadas são colonizados em menor proporção (SAMBASIVA et al., 2003; JANWITTHAYANAN et al., 2013). Estas bactérias têm a capacidade de persistir em órgãos imunológica e anatomicamente privilegiados, tendo como sítio anatômico predileto os túbulos proximais renais, onde podem permanecer até quatro semanas após uma infecção aguda em humanos e de maneira intermitente por anos em animais (LEVETT; HAAKE, 2010). Nestes últimos, tem sido relatada a presença de leptospiras em secreções como sêmen e fluidos vaginais, indicando a presença destas bactérias nas gônadas (HEINEMANN et al., 2000; LILENBAUM et al., 2008; HAMOND et al., 2014b).

A apresentação clínica da leptospirose animal varia desde uma apresentação subclínica até um comprometimento reprodutivo, hepático, renal e pulmonar. Em cães, o caso típico de leptospirose aguda tem como sinais clínicos febre, icterícia, vômitos, diarreia, coagulação intravascular disseminada, uremia e hemorragias (ANDRÉ-FONTAINE, 2006; GOLDSTEIN, 2010). Em animais de produção, como bovinos, ovinos, caprinos e suínos, a apresentação da doença pode ser aguda ou crônica, sendo que os sinais clínicos incluem falhas reprodutivas como abortamentos, nascimentos de bezerros fracos e mumificação fetal, causando perdas econômicas ao setor pecuário (ADLER; DE LA PEÑA

MOCTEZUMA, 2010). Em cavalos, descreve-se como manifestação clínica de leptospirose a uveíte recidivante, que parece ser mediada por mecanismos autoimunes envolvendo reações cruzadas entre tecidos conjuntivais e proteínas leptospirais (VERMA; STEVENSON; ADLER, 2013; HAMOND et al., 2014a). O tratamento de referência consiste em penicilina durante a fase aguda da doença e estreptomicina para curar a colonização renal (MARTINS; LILENBAUM, 2017), sendo que nos casos mais graves recomendam-se altas doses de penicilina intravenosa (até quatro vezes por dia) e nos casos menos complicados, antibióticos orais como amoxicilina, ampicilina, doxiciclina ou eritromicina podem ser prescritos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

A leptospirose humana tem como particularidade a apresentação bifásica, sendo que a fase aguda é caracterizada por febre alta, cefaleia e mialgia, enquanto na fase crônica observam-se meningites, miocardites, pneumonia, hepatite e nefrite. A síndrome de Weil e a síndrome hemorrágica pulmonar são as apresentações mais graves em humanos, e são caracterizadas pelo comprometimento de múltiplos órgãos, como fígado, rins e pulmões (VINETZ, 2001; GOUVEIA et al., 2008). O risco humano de contrair leptospirose é principalmente ocupacional, por exemplo, coletores de lixo, trabalhadores de plantações de arroz, cana de açúcar, de abatedouros, de esgotos, entre outros, apresentam alto risco de contaminação. A doença também está associada a atividades recreativas como natação, *rafting* e pescaria, além de catástrofes naturais, como enchentes, ciclones, etc. Em países desenvolvidos, esta zoonose tem atingido importância por estar relacionada ao ecoturismo, ao turismo de aventura e atividades aquáticas. Por outro lado, em países em desenvolvimento, as precárias condições de moradia somadas à falta de saneamento básico e de drenagem de águas pluviais favorecem o surgimento de epidemias (DREYFUS et al., 2014; DUPOUEY et al., 2014).

Para o diagnóstico clínico da doença utilizam-se, principalmente, dois métodos sorológicos: a soroaglutinação microscópica (MAT), teste padrão ouro; e o ELISA IgM, de uso comum em humanos (PICARDEAU, 2013). O MAT tem a vantagem de ser específico para sorogrupos de *Leptospira* spp.; portanto, tem grande valor nos estudos epidemiológicos. Dentre as desvantagens destacam-se a falta de discriminação entre anticorpos IgM e IgG, o requerimento de muito

investimento econômico para manter a bateria de leptospiras vivas (usadas como antígeno) e a necessidade de pessoal experiente qualificado para a realização da leitura dos resultados (AHMAD; SHAH; AHMAD, 2005; OIE, 2014). O teste de ELISA é usado como primeira linha no diagnóstico da leptospirose humana em muitos países. Este teste tem a vantagem de não precisar de uma bateria de leptospiras vivas, porém não tem a especificidade do sorogrupo que o MAT proporciona. Contudo, tem se desenvolvido muitos ELISA's usando proteínas recombinantes, como LipL32. (BAJANI et al., 2003; MUSSO; LA SCOLA, 2013). Outro tipo de diagnóstico é o isolamento de leptospiras em meios de culturas (semissólido de Fletcher ou meio *Ellinghausen McCullough Johnson Harris - EMJH*); porém o isolamento não constitui um exame de rotina prático devido ao período de incubação prolongado (até três meses, com exames semanais ou a cada 15 dias), requerimento de amostras recém-coletadas de animais que não tenham sido submetidos ao tratamento e o risco de contaminação da cultura (FAINE et al., 1999; ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Os testes moleculares podem ser usados para o diagnóstico da fase aguda da doença, onde prevalece a leptospiremia; técnicas como a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) convencional e/ou PCR quantitativo (qPCR) apresentam-se também como bons recursos para pesquisa da doença (PICARDEAU 2013).

1.2 VACINAS CONTRA A LEPTOSPIROSE

As vacinas contra leptospirose vêm sendo usadas desde 1920. São constituídas por culturas de leptospiras inativadas por uma variedade de métodos, como calor, formalina, fenol, irradiação, etc. (FAINE et al., 1999; ADLER, 2015). Estas vacinas comerciais são sorovar específica com uma resposta imune predominantemente humoral (do tipo Th2) ao LPS leptospiral, antígeno que gera um tipo de resposta imune celular timo-independente que não é capaz de produzir células de memória; conseqüentemente, estas bacterinas induzem imunidade de curto prazo. Por estes motivos, se faz necessária a revacinação, para manter os títulos de anticorpos protetores (DELLAGOSTIN et al., 2017). Por outro lado, a importante participação da imunidade adquirida de tipo celular na resposta imunológica à leptospirose tem sido relatada em bovinos. Uma vacina comercial

monovalente contra *L. borgpeterseni* sorovar Hardjo induziu imunidade protetora associada à resposta Th1, caracterizada por linfócitos T CD4⁺ e altos níveis de interferon gamma (IFN- γ), e preveniu a colonização renal e a leptospirúria (NAIMAN et al., 2001). Este resultado sugere um importante papel da resposta celular na imunidade esterilizante nesta espécie. A vacinação em humanos é restrita para certas populações de risco de alguns países como China, Cuba, Japão e França; sendo que os efeitos colaterais descritos incluem fortes reações locais e sistêmicas. A vacinação em animais domésticos e de produção pecuária é comum no mundo todo (OIE, 2014).

A obtenção de uma vacina ideal contra a leptospirose tem se apresentado como um grande desafio, pois tanto os fatores de virulência quanto os mecanismos de patogenicidade das leptospirosas ainda não estão completamente entendidos (ADLER, 2014). Esta vacina ideal teria que induzir resposta imune prolongada, conferir proteção contra diversos sorovares patogênicos, prevenir a colonização bacteriana e apresentar mínimos efeitos adversos.

1.2.2. Candidatos Vacinais

A produção de vacinas de subunidade é uma boa alternativa, especialmente quando se considera a segurança e a proteção cruzada (DELLAGOSTIN et al., 2011). Diferentes antígenos têm sido avaliados como candidatos vacinais, entre os quais se encontram as proteínas OmpL1, OmpL37, LipL41, LipL21, Loa22 (primeira proteína identificada como essencial para a virulência) e LipL32. Entretanto, estas proteínas foram capazes de induzir apenas proteção parcial contra leptospirose em hamsters (RISTOW et al., 2007; HUMPHRYES et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015; SILVEIRA et al., 2017).

Os resultados mais promissores de proteção contra leptospirose têm como protagonistas as proteínas Ligs (*Leptospiral immunoglobulin-like*): LigA e LigB. Estas proteínas de membrana são codificadas por genes presentes somente em leptospirosas patogênicas, sendo que o gene *ligB* é encontrado em pelo menos seis espécies de leptospirosas: *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*, *L. noguchii*, *L. weilii* e *L. santarosai*; enquanto o gene *ligA* é restrito para as espécies *L. interrogans* e *L. kirschneri* (CERQUEIRA et al., 2009; DELLAGOSTIN et al., 2017).

Estas proteínas participam dos processos de invasão e adesão das leptospiras aos tecidos do hospedeiro, interagindo com componentes da matriz extracelular, como colágeno I e IV, laminina, fibronectina e fibrinogênio. Além disso, recentemente foi mostrado que estas proteínas se ligam a fatores do hospedeiro que podem ser importantes para evasão do sistema complemento durante a infecção (VERNEL-PAUILLAC e WERTS, 2018). Ambas as proteínas apresentam domínios N-terminais semelhantes e altamente conservados, e domínios C-terminais menos conservados, porém ambas as regiões são imunogênicas durante a infecção (MATSUNAGA et al., 2003), sendo que LigB é significativamente mais variável que LigA (MCBRIDE et al., 2009).

Resultados obtidos por diferentes grupos de estudo mostraram que estas proteínas foram capazes de induzir proteção contra leptospirose em camundongos C3H/HeJ e hamsters. Entretanto, em todos esses experimentos, vários animais sobreviventes foram positivos ao isolamento de leptospiras a partir de amostras de rins. Embora, estudos histopatológicos revelem menor gravidade das lesões dos rins, fígado e pulmões nos animais dos grupos experimentais quando comparados com os animais dos grupos controles (não imunizados) (PALANIAPPAN et al., 2002; KOIZUMI; WATANABE, 2005; SILVA et al., 2007; FAISAL et al., 2008; YAN et al., 2009; MONARIS et al., 2015; EVANGELISTA et al., 2017). Em um trabalho anterior, Monaris et al. (2015) avaliaram a imunidade protetora induzida pela proteína LigAC, porção carboxi-terminal (C-terminal) da proteína LigA, concluindo que esta proteína foi capaz de conferir proteção contra a morte por leptospirose, mas não preveniu a colonização renal (imunidade esterilizante). Até o momento, só um grupo de trabalho atingiu imunidade esterilizante (prevenção de colonização renal de 87,5 a 100%), avaliada por qPCR, utilizando como antígeno a proteína LigBrep, domínio N-terminal da proteína LigB (CONRAD et al., 2017). Cabe ressaltar que neste último trabalho os critérios de validação dos ensaios de imunoproteção foram diferentes aos critérios utilizados no trabalho de Monaris (et al). 2015.

Em trabalhos anteriores foi caracterizada uma proteína de superfície de *Leptospira* spp., nomeada LcpA (*leptospiral complement regulator-acquiring protein* A), que interage com o fator regulador do sistema complemento C4BP, sugerindo ser esta uma estratégia de evasão imune das leptospiras no hospedeiro. Esta

proteína é conservada entre as espécies patogênicas da bactéria (Quadro 1 e Figura 3), assim como expressa durante o curso da infecção; sugerindo um papel potencial como candidato vacinal (BARBOSA et al., 2009, 2010).

Quadro 1 – Conservação da proteína LcpA entre as espécies patogênicas de leptospiros.

Espécie	Sorovar	ID da sequência (NCBI)	Identidade (%)
<i>L. interrogans</i> (1)	Copenhageni estirpe Fiocruz L1-130	AAS70529.1	100
<i>L. interrogans</i> (2)	Pomona estirpe Kennewicki LC82-25	EJO77817.1	98,43
<i>L. interrogans</i> (3)	Canicola	OLZ32429.1	98,43
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa estirpe Moskv	EKQ81951.1	96,34
<i>L. noguchii</i>	Pomona estirpe CZ214	EQA69994.1	97,30
<i>L. borgpetersenii</i>	Hardjo-bovis estirpe L550	ABJ79224.1	80,31
<i>L. mayottensis</i>	200901122	EKS01016.1	80,83
<i>L. santarosai</i>	---	WP_046691624.1	79,27
<i>L. weilii</i>	Ranarum estirpe ICFT	EMY78210.1	81,77
<i>L. alexanderi</i>	---	WP_078125376.1	81,35
<i>L. alstonii</i>	Sichuan estirpe 7960	EMJ96116.1	78,75
<i>L. kmetyi</i>	---	WP_123179118.1	79,90

Fonte: SANCHEZ, 2019.

Legenda: Análise realizada no programa blastP (NCBI).

Figura 3 - Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína LcpA em espécies de leptospiros patogênicas

```

L. interrogans (1) MFKILVKINILFFFLV---YFLLFGCCAPSRLIEIVSMILCDHFNRVGCLEPVERNHHYK 57
L. interrogans (2) MFKILVKINILFFFLV---YFLLFGCCAPSRLIEIVSVILCDHFNRVGCLEPVEKNHHYK 57
L. interrogans (3) MFKILVKINILFFFLV---YFLLFGCCAPSRLIEIVSVILCDHFNRVGCLEPVEKNHHYK 57
L. kirschneri      MFKILVNLNILFFFLV---YFLIFGCCAPSRLIEIVSVVLCDFHNRVGCLEPVEKNHHYK 57
L. noguchii       MFKILVKINILFFFLV---YFLLFGCCTPSRLEIVSMILCDHFNRVGCLEPVEKNHHYK 57
L. borgpetersenii MFRISVKHNIVPFAFLFHL-LSFSGACVPVQLEITSVTLCDHFNRSGECLEPVEKDHYYK 59
L. mayottensis    MFKISVKPNILSFVAFVYL-LSFSGACVPVQLEITSVTLCDHFNRAGECLEPVEKDHYYK 59
L. santarosai     MFKISIKPNILSFASVLCM-SFLSGACSPVQLEIASVTLCDHFNRVGCLEPVEKNHHYK 59
L. weilii        MFKTFIKPKLLF--CVSGICLSLFGTCAQTRLEIETITLCDHFNRAGECLEPVEKNHHYK 58
L. alexanderi     MFKISVKPNILFFAFVYL-LSFLGACVPVQLEIASVTLCDHFNRAGECLEPVEKDHYYK 59
L. alstonii       MFKTFIKPKLLF--SVYGCICLSLFGTCAQTRLEVATITLCDHFNRAGECLEPVEKNHHYK 58
L. kmetyi         MFKTFIKSNIPIFLSALALCVACSVSCAPEPLSIASVSLCDHFNRAGECLEPIEKNHHYK 60
Recomb. LcpA     M-----HHHHHLEPSRLEIVSMILCDHFNRVGCLEPVERNHHYK 41
                  *.: : ***** :*: :****

L. interrogans (1) IEIPNHKKPDTWEKFSNYLYFHARETPGFLIRFNRKLT PSESKMIKDSYYATMSFSGTVE 117
L. interrogans (2) IEIPNHKKTDTWEKFSNYLYFHARETPGFLIRFNRKLT PSESKMIKDSYYATMSFSGTVE 117
L. interrogans (3) IEIPNHKKTDTWEKFSNYLYFHARETPGFLIRFNRKLT PSESKMIKDSYYATMSFSGTVE 117
L. kirschneri      IEIPNHKKPDTWEKFSNYLYFHARETPGFLIRFNRKLT PSESKMIKDSYYATMSFSGTVE 117
L. noguchii       IEIPNHKKPDTWEKFSNYLYFHARETPGFLIRFNRKLT PSESKMIKDSYYATMSLSTVE 117
L. borgpetersenii VEIPHIKKPDTWEKFANYLYFHARETPGFLIRFNRKLT PSESRAIQDSYYATMSFSGTVE 119
L. mayottensis    VEIPHIKKPDTWEKFANYLYFHARETPGFLIRFNRKLT PSESRAIKDSYYATMSLSTVE 119
L. santarosai     VEIPHVKKPDTWEKFANYLYFHARETPGFLVRFNRKLT PSESRAIRDSYYATMSLSTVE 119
L. weilii        VEIPNHRKPDTWEKFANYLYFHARETPGFLIRFNRKLT PSESRAIRDSYYATMSFSGTVE 118
L. alexanderi     VEIPHIKKPDTWEKFANYLYFHARETPGFLIRFNRKLT PSESRAIQDSYYATMNFSGTVE 119
L. alstonii       VEIPNHRKPDTWEKFANYLYFHARETPGFLIRFNRKLT PSESRAIRDSYYATMSFSGTVE 118
L. kmetyi         VEIPNHRKPDTWEKFANYLYFHARETPGFLVRFNRKLT PSESKAIKDSYYATMSLSTVE 120
Recomb. LcpA     IEIPNHKKPDTWEKFSNYLYFHARETPGFLIRFNRKLT PSESKMIKDSYYATMSFSGTVE 101
                  :***: :* *****:*****:*****: *:*****:*****

L. interrogans (1) RMEGFEMGEDWVGSFQYLGSI I KEKLLKENRLSSFPYTNSI FPAEVEFRFNSSLFEGEEK 177
L. interrogans (2) RMEGFEMGEDWVGSFQYLGSI I KEKLLKENRLSSFPYTNSI FPAEVEFRFNSSLFEGEEK 177
L. interrogans (3) RMEGFEMGEDWVGSFQYLGSI I KEKLLKENRLSSFPYTNSI FPAEVEFRFNSSLFEGEEK 177
L. kirschneri      RMEGFEMGEDWVGSFQYLGSI I KEKLLKENRLSSFPYTNSI FPAEVEFRFNSSLFEGEEK 177
L. noguchii       RMEGFEMGEDWVGSFQYLGSI I KEKLLKENRLASFPYTNSI FPAEVEFRFNSSLFEGEEK 177
L. borgpetersenii RMEGFELGEDWVGSFQYLGSI I KNKLLKENRLGSYPYTNMI FPAEVEFKFDSSLFEGEEK 179
L. mayottensis    RMEGFEMGEDWVGSFQYLGSI I KDKLLKENRLGSYPYTNMI FPAEVEFKFDSSLFKGGEEK 179
L. santarosai     RMEGFEMGEDWVGSFQYLGSI I KDKLLKENRLGSYPYTNMVFPAEVEFRFDSSLFEGEEK 179
L. weilii        RMEGFEMGEDWVGSFQYLGSI I KDKLLKENRLGSFPYTNSI FPAEVEFKFNSSLFEGEEK 178
L. alexanderi     RMEGFEMGEDWVGSFQYLGSI I KDKLLKENRLGSYPYTNMI FPAEVEFKFNSSLFEGEEK 179
L. alstonii       RMEGFEMGEDWVGSFQYLGSI I LKDKLRKENRLGSFPYTNAV FPAEVEFKFNSSLFEGEEK 178
L. kmetyi         RMEGFEMGEDWVGSFQYLGSI I MIKDKLLKENRLGSFPYTNTI FPAEVEFKFNSSLFEGEEK 180
Recomb. LcpA     RMEGFEMGEDWVGSFQYLGSI I KEKLLKENRLSSFPYTNSI FPAEVEFRFNSSLFEGEEK 161
                  *****:*****:*****: :*: :*: :*****: *:***** :*****: *: *****: * **

L. interrogans (1) TKINLSFIVLPPEK 191
L. interrogans (2) TKINLSFIVLPPEK 191
L. interrogans (3) TKINLSFIVLPPEK 191
L. kirschneri      TKINLSFIVLPPEK 191
L. noguchii       TKINLSFIVLPPEK 191
L. borgpetersenii TKINLSYIVLPPEK 193
L. mayottensis    TKINLSYIVLPPEK 193
L. santarosai     TKINVSYTVLPPEK 193
L. weilii        TKINLSYTVLPPEK 192
L. alexanderi     TKINLSYIVLPPEK 193
L. alstonii       TKINLSYTVLPPEK 192
L. kmetyi         TKINLSFTVLPPEK 194
Recomb. LcpA     TKINLSFIVLPPEK 175
                  *****: : *****

```

Fonte: SANCHEZ, 2019.

Legenda: Alinhamento realizado utilizando o programa Clustal W: (*) resíduo idêntico, (:) resíduo conservado e (.) resíduo parcialmente conservado. A proteína recombinante foi incluída na comparação (Recomb. LcpA).

1.2.3. Estratégias Vacinais

A proposta para o presente estudo visou ao aumento da imunogenicidade das proteínas recombinantes LigAC e LcpA com a finalidade de atingir imunidade esterilizante, além de proteção contra a morte por leptospirose. Para tanto, foram testadas duas estratégias.

1.2.3.1. Proteínas fusionadas a domínios imunogênicos

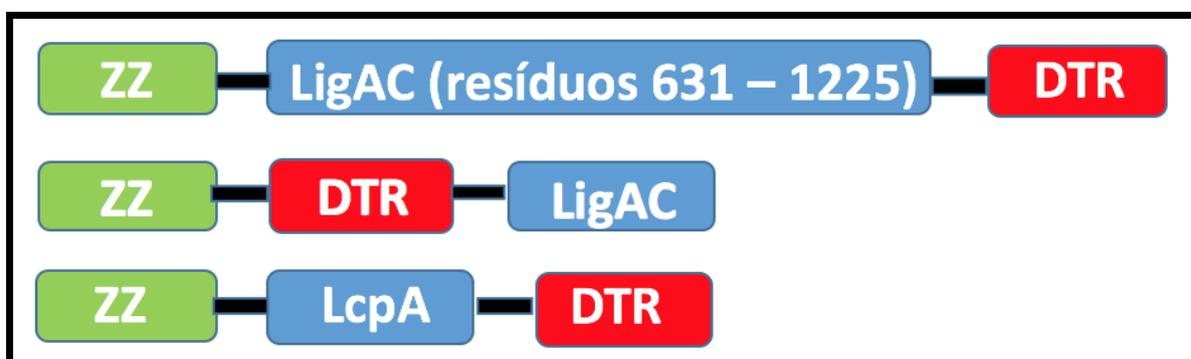
A primeira delas correspondeu à fusão dos antígenos vacinais (LigAC e LcpA) ao domínio ZZ da proteína A de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e ao domínio R da toxina diftérica (DTR) (Figura 4).

Dados da literatura sugerem que os antígenos fusionados à proteína A ou diretamente ao seu domínio ZZ são substancialmente mais imunogênicos do que os antígenos sem fusão (LOWENADLER et al., 1990; LÉONETTI et al., 1998; ZHAO et al., 2005). Tem sido proposto que esse fenômeno pode estar associado à afinidade do domínio ZZ pela região Fc das imunoglobulinas (Ig). Como as células apresentadoras de antígenos (APCs) possuem imunoglobulinas na superfície, a maior interação do complexo antígeno-ZZ às APCs poderia resultar em um aumento da capacidade de captura e apresentação do antígeno ao sistema imune (Figura 5) (LOWENADLER et al., 1992; LÉONETTI et al., 1998). Outra vantagem desta estratégia é facilitar o processo de purificação de proteínas recombinantes através do uso de cromatografia de afinidade a proteína A.

A toxina diftérica é uma exotoxina constituída pelo fragmento N-terminal (A) e o fragmento C-terminal (B) que permanecem ligados através de uma ponte dissulfeto. A estrutura cristalográfica de DTR revela a presença de três domínios funcionais, o domínio catalítico (domínio C) que se situa no fragmento A; o domínio de translocação (domínio T) que está localizado na parte N-terminal do fragmento B, e o domínio de ligação (domínio R) que está localizado na região C-terminal de fragmento B. A toxina liga-se aos receptores de superfície celular, através do seu domínio R; em seguida, é internalizada por endocitose e o fragmento A é translocado para o citosol. Uma vez no citosol, o fragmento A bloqueia a síntese de proteínas causando a morte celular (CHOE et al., 1992). O receptor da toxina

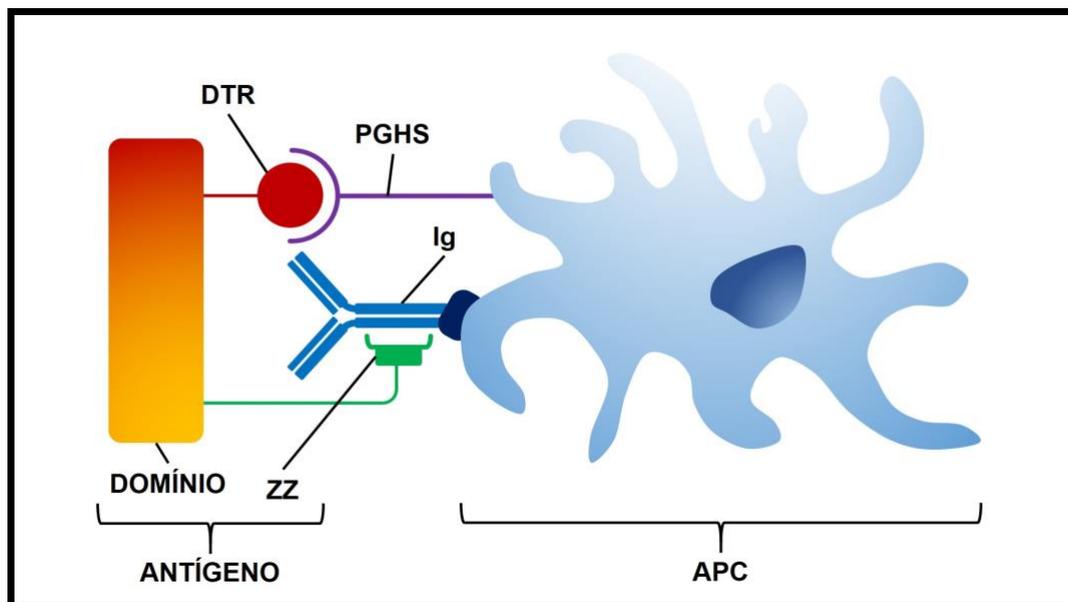
diftérica, originalmente identificado em células Vero, é o fator de crescimento epidérmico de ligação à heparina (HB-EGF), presente na superfície de muitas células eucarióticas (IWAMOTO et al., 1994). Resultados de um estudo anterior mostraram que DTR recombinante foi capaz de ligar-se à superfície das células Vero de maneira equivalente do que a toxina diftérica nativa (LOBECK et al., 1998). Além disso, o domínio DTR também é capaz de se ligar aos proteoglicanos de heparam sulfato (PGHSs), que são glicoproteínas onipresentes na superfície das células e na matriz extracelular, e que participam de muitos processos biológicos e também podem atuar como receptores para vários microrganismos, particularmente aqueles que apresentam um tropismo às células do sistema imune (BUTCHER et al., 1992; PATEL et al., 1993). Léonetti; Gardzinski; Moine (2010) demonstraram que os PGHSs expressos na superfície das APCs podem servir como receptores de antígenos fusionados a um ligante de heparina ou heparam sulfato como DTR, resultando em um aumento da internalização e apresentação do antígeno ao sistema imune (Figura 5).

Figura 4 – Representação esquemática dos antígenos vacinais fusionados ao domínio ZZ da proteína A de *S. aureus* e ao domínio R da toxina diftérica (DTR).



Fonte: SANCHEZ, 2019.

Figura 5 – Representação esquemática das estratégias utilizadas para aumentar a imunogenicidade das proteínas recombinantes.



Fonte: SANCHEZ, 2019.

Legenda: O domínio ZZ tem afinidade pela região Fc das imunoglobulinas, presentes na superfície das células apresentadoras de antígenos (APC). O domínio DTR liga-se aos proteoglicanos de heparano sulfato (PGHSs), também presentes na superfície das APCs.

1.2.3.2. Uso de adjuvantes nas formulações vacinais

A segunda estratégia testada consistiu em usar diferentes adjuvantes nas formulações vacinais. A imunização com antígenos de baixa imunogenicidade, como peptídeos e proteínas recombinantes, tipicamente induz uma modesta resposta imune humoral com pouca ou nenhuma resposta imune celular. Por isso, para melhorar o processo de captura e apresentação de antígenos às células do sistema imune, estratégias como o uso de adjuvantes podem ser utilizadas (REED; ORR; FOX, 2013).

Um dos adjuvantes testados foi o hidróxido de alumínio (Alum). Adjuvantes contendo sais de alumínio são os mais utilizados nas vacinas comerciais na atualidade. O Alum é composto por nanopartículas que formam agregados porosos e irregulares com antígenos solúveis. Estes agregados depositam-se no local da injeção, possibilitando a liberação lenta e maior interação do antígeno com as células apresentadoras de antígenos, resultando no estímulo da resposta imune (SHI et al., 2019). Vários estudos têm demonstrado que os adjuvantes contendo

sais de alumínio estimulam principalmente a resposta imune do tipo Th2 (O'HAGAN et al., 2017). Entre as vantagens dos adjuvantes que contêm sais de alumínio destaca-se o baixo custo de produção. Porém, diversos estudos têm sugerido que a resposta imune gerada pelo Alum não é suficiente para atingir proteção em desafios vacinais experimentais contra a leptospirose (ADLER, 2015). Por este motivo, outros dois adjuvantes foram testados.

Outro adjuvante testado neste projeto foi o anticorpo anti-MHC II. Trata-se de um anticorpo monoclonal comercial produzido por uma cultura de hibridomas de linfócitos B (ATCC®HB32™, clone 14.4.4S). O objetivo do uso deste adjuvante foi aumentar a estabilidade de ligação entre o antígeno e as células apresentadoras de antígeno (APCs), através da formação de um imunocomplexo entre o MHC II e o antígeno (proteína de fusão com domínio ZZ), melhorando o processamento antigênico (OZATO et al., 1980).

Outro adjuvante testado foi o oligonucleotídeo de CpG (CpG-ODN), agonista do receptor *Toll-like* 9 (TLR-9) (OLIVEIRA et al., 2016). Os CpG-ODNs são moléculas sintéticas de DNA compostas por um fosforotioato e CpGs não metilados. Os motivos CpGs ocorrem com maior frequência em DNA viral e bacteriano do que em vertebrados. A ativação de TLR9 por CpG-ODNs pode estimular tanto a resposta humoral quanto celular, melhorando o processamento de antígenos, através do aumento da expressão de MHC, CD40 e CD86 nas células apresentadoras de antígenos (SHI et al., 2019).

Assim, a finalidade do uso destas estratégias vacinais foi contribuir para o aumento da imunogenicidade das proteínas LigAC e LcpA, através da maior eficiência dos processos de apresentação do antígeno ao sistema imune, e consequentemente induzindo proteção contra a morte causada pela leptospirose e contra a colonização bacteriana dos órgãos.

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma vacina de subunidade contra a leptospirose utilizando as proteínas recombinantes LcpA (*Leptospiral complement regulator-acquiring protein A*) e LigAC, fragmento C-terminal da LigA (LigAC, *Leptospiral immunoglobulin-like protein A*) fusionadas ao domínio ZZ da proteína A de *Staphylococcus aureus* e ao domínio R da toxina diftérica (DTR).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fusionar as proteínas ao domínio ZZ da proteína A de *Staphylococcus aureus* e ao domínio R da toxina diftérica (DTR).
- Avaliar a ação protetora contra a morte por leptospirose e colonização renal por leptospirosas das proteínas LigAC e LcpA fusionadas aos domínios no desafio homólogo.
- Avaliar a ação protetora contra a morte por leptospirose e colonização renal por leptospirosas da proteína LcpA fusionada aos domínios no desafio heterólogo.
- Avaliar a ação dos adjuvantes hidróxido de alumínio e CpG-ODN e do complexo anti MHC II – antígenos fusionados, na ação protetora contra a morte por leptospirose e contra a colonização renal por leptospirosas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ESTIRPES BACTERIANAS

Para a realização dos experimentos deste trabalho foram utilizadas as culturas das estirpes patogênicas de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni estirpe Fiocruz L1-130, *Leptospira interrogans* sorovar Canicola estirpe LO4 e *Leptospira interrogans* sorovar Kennewicki estirpe LPF. As mesmas foram fornecidas pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas da FMVZ-USP.

A virulência das estirpes bacterianas foi mantida através de passagens em hamsters experimentalmente infectados (FAINE et al., 1999). Animais recém-desmamados foram inoculados pela via intraperitoneal com 200 μ L (10^8 células/mL) de cultura de leptospiros. Posteriormente, os animais foram monitorados diariamente para acompanhamento de manifestações clínicas de leptospirose como perda de peso, perda de mobilidade e anorexia. Após a morte dos animais, entre 5-10 dias após a inoculação, as bactérias foram recuperadas a partir do macerado do fígado ou rim e cultivadas em meio EMJH completo (Difco) por uma passagem *in vitro*.

As culturas foram mantidas a uma temperatura de 29°C sem agitação e monitoradas em microscópio de campo escuro. A contagem celular foi realizada em câmara de Petroff-Hausser.

A estirpe de *Escherichia coli* BL21(DE3) foi utilizada para a expressão das proteínas recombinantes contempladas nesse trabalho. Estas bactérias possuem o gene da T7 RNA polimerase integrado ao genoma, sob o controle do promotor *LacUV5*, induzível por isopropil β -D-tiogalactosídeo (IPTG). O cultivo foi realizado em meio Luria-Bertani (LB) a 37°C, com agitação.

3.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

As sequências codificantes das proteínas LigAC e LcpA foram clonadas em vetor pAE em trabalhos anteriores (BARBOSA et al., 2010; MONARIS et al., 2015). O vetor de expressão pAE foi escolhido pois adiciona seis resíduos de histidinas na

extremidade amino-terminal da proteína a ser expressa, e assim possibilita a purificação da proteína recombinante através de colunas de afinidade a metal.

As sequências codificantes das proteínas LigAC e LcpA foram clonadas em fusão ao domínio ZZ da proteína A de *Staphylococcus aureus* e ao domínio R da toxina diftérica (DTR) pelo nosso grupo colaborador da Unidade de Farmacologia e Imunologia, Instituto de Biologia e Tecnologia de Saclay – CEA, França (dados não mostrados). O vetor de expressão utilizado foi o pCP derivado do pET3a (LOBECK et al., 1998), com a posterior purificação em resina IgG-Sepharose, devido à capacidade do domínio ZZ da proteína A de *S. aureus* em ligar-se à região Fc das imunoglobulinas do tipo IgG.

3.2.1 Proteínas recombinantes com cauda de histidina

As proteínas recombinantes expressas e purificadas com cauda de histidina foram LigAC e LcpA. Para tal finalidade, a linhagem de bactérias *E. coli* BL21 (DE3) competentes foram obtidas segundo o protocolo descrito em Sambrook; Fritsch; Maniatis (1989). Posteriormente, realizou-se a transformação dessas bactérias com as construções pAE-LigAC e pAE-LcpA, seguido pela inoculação de colônias isoladas em 50 mL de meio LB suplementado com ampicilina (LB-Amp) e incubadas a 37°C sob agitação, durante 16 horas. Posteriormente, os 50 mL de cultura foram transferidos para um litro de meio LB-Amp até $DO_{600nm} = 0,6 - 0,8$, sendo a expressão das proteínas induzida com 1 mM IPTG e mantendo a incubação por mais quatro horas a 37°C, sob agitação 200 rpm. Finalmente, as células foram coletadas por centrifugação ($2.057 \times g$ por 15 minutos a 4°C) e o sedimento bacteriano foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

Posteriormente, o sedimento bacteriano foi ressuspenso em 30 mL de tampão 20 mM Tris-HCl e 0,5 M NaCl, pH 7,4, acrescido de 1 mM de inibidor de protease fenilmetilsulfonilflúor (PMSF) e lisado através da passagem pelo *French Pressure Cell Press* (SLM Aminco). A suspensão resultante da lise foi centrifugada a $12.857 \times g$ por 15 minutos, 4°C. O sobrenadante (fração solúvel) foi coletado e mantido a 4°C, enquanto o sedimento (corpúsculos de inclusão - fração insolúvel) foi armazenado a -20°C até o momento da purificação.

As proteínas recombinantes foram purificadas a partir da fração insolúvel utilizando cromatografia de afinidade a metal (*Fast Flow Chelating Sepharose™*, GE Healthcare). Para tanto, o sedimento de corpúsculos de inclusão foi ressuspensão em 10 volumes (p/v) de tampão de solubilização (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 5 mM imidazol, 8 M uréia e pH 7,4) e mantido a temperatura ambiente por 16 horas com leve agitação. Posteriormente, o solubilizado foi lentamente diluído 100 vezes em tampão de ligação (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 5 mM imidazol e pH 7,4). Esta solução foi adsorvida (fluxo 1 mL/min) à coluna de afinidade a metal previamente carregada *Fast Flow Chelating Sepharose* com cinco volumes de 100 mM NiSO₄ e equilibrada com três volumes de tampão de ligação, a temperatura ambiente. Após a adsorção das proteínas, a coluna foi lavada progressivamente com tampão Tris-HCl NaCl pH 7,4 contendo imidazol em concentrações crescentes (cinco, 20, 40, 60 e 100 mM imidazol). As proteínas recombinantes foram eluídas com tampão Tris-HCl NaCl contendo 1 M imidazol. Finalmente, as proteínas recombinantes purificadas, foram dialisadas a 4°C contra tampão PBS pH 7,4, realizando 4 trocas de tampão a cada 4 horas.

3.2.2 Proteínas recombinantes de fusão

As três sequências codificantes das proteínas LigAC e LcpA fusionadas ao domínio ZZ da proteína A de *Staphylococcus aureus*, e ao domínio R da toxina diftérica (DTR) que foram expressas e purificadas foram ZZ-LigAC-DTR, ZZ-DTR-LigAC e ZZ-LcpA-DTR. Para tal finalidade, os protocolos de transformação bacteriana na linhagem *E.coli* BL21 (DE3), indução de expressão de proteínas recombinantes e lise por passagem pelo *French Pressure Cell Press* (SLM Aminco) foram repetidos conforme protocolo descrito anteriormente, para as proteínas recombinantes com cauda de histidina (item 3.2.1).

As proteínas recombinantes de fusão foram purificadas por cromatografia de afinidade a proteína A, a partir dos corpúsculos de inclusão (fração insolúvel) utilizando a resina *IgG Sepharose™ 6 Fast Flow* (GE Healthcare), conforme protocolo do fabricante e descrito em Lobeck et al. (1998).

Para tanto, o sedimento de corpúsculos de inclusão foi ressuspensão em 25 mL de tampão de solubilização (Tris 0,05 M, NaCl 0,15 M, Tween20 0,05%, 8 M

uréia, pH 7,6) e mantido a temperatura ambiente por 16 horas com leve agitação. Posteriormente, o solubilizado foi lentamente diluído 100 vezes em tampão de ligação (Tris 0,05 M, NaCl 0,15 M, Tween 20 0,05%, pH 7,6). Esta solução foi adsorvida (fluxo 1 mL/min) à coluna de afinidade a *IgG Sepharose 6 Fast Flow*, previamente equilibrada com cinco volumes (p/v) de tampão de ligação, a temperatura ambiente. Após a adsorção das proteínas, a coluna foi lavada com três volumes (p/v) de tampão de lavagem (Acetato de Amônio 5 mM, pH 5,0). As proteínas recombinantes foram eluídas com dois a quatro volumes de tampão de eluição (Ácido Acético, 0,5 M, pH 3,4). Por último, as proteínas recombinantes purificadas, foram dialisadas a 4 °C contra tampão PBS pH 7,4, realizando 4 trocas de tampão a cada 4 horas.

As concentrações das proteínas recombinantes purificadas foram medidas através do aparelho *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Invitrogen) e seus reagentes *Qubit® Protein Assay Kit* (Invitrogen). Frações das etapas da purificação foram coletadas e analisadas em gel SDS-PAGE com 12% acrilamida.

3.3 ANÁLISE DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA POR DICROÍSMO CIRCULAR

A análise da presença de estrutura secundária nas proteínas recombinantes purificadas foi realizada através de dicróismo circular (DC). Esta é uma técnica útil para o estudo de moléculas que possuem unidades opticamente ativas, ou seja, que podem exibir sinal na espectroscopia de dicróismo circular, como as proteínas. Na interação entre estas moléculas e a luz circularmente polarizada, desencadeia-se uma alteração na luz incidente, que é detectada através da medida da diferença da absorção da luz circularmente polarizada em sentido horário e anti-horário, após a luz passar pela amostra. Esta técnica pode ser utilizada para detectar mudanças na conformação estrutural (KELLY; JESS; PRICE, 2005), e assim avaliar se as proteínas recombinantes que foram usadas no estudo mantinham a estrutura secundária adequada para a manutenção da sua função.

Para realizar esta técnica, as proteínas recombinantes purificadas foram dialisadas com uma solução tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4. Os dados foram coletados em cubetas de quartzo com 1 mm de caminho óptico, em uma

temperatura de 20°C, a 0,5 nm/seg com um “*bandwidth*” de 1 nm. Dez espectros foram coletados para se obter uma média, utilizando-se o espectropolarímetro J-810 (JASCO), conectado ao sistema *Peltier Jasco PFD-425S* para controle da temperatura. A mesma solução tampão fosfato de sódio foi usada como referência padrão.

Os espectros de DC foram expressos em termos de elipcidade molar ($[\theta]$). Para a normalização dos dados foi utilizada a fórmula: $[\theta] = ((\theta/1000) \times 100 \times \text{KDa}) / (C \times l \times aa - 1)$. Onde $[\theta]$ é a elipcidade molar, θ é a elipcidade (mdeg), KDa é o peso molecular da proteína recombinante em quilodáton, C é a concentração da proteína recombinante (mg/mL), l é o caminho óptico (0,1cm) e aa corresponde ao número de aminoácidos da proteína recombinante.

Com a finalidade de se obter um parâmetro de comparação, empregou-se o programa de predição de estrutura secundária teórica Raptor-X, disponível em domínio público (<http://raptorx.uchicago.edu/StructurePrediction/predict/>).

3.4 PRODUÇÃO DO ANTI-MHC CLASSE II

O anti-MHC de classe II é um anticorpo monoclonal comercial produzido por uma cultura de hibridomas de linfócitos B de camundongos (ATCC®HB32™, clone 14.4.4S).

Para a obtenção deste anticorpo, as células foram descongeladas e cultivadas em meio de cultura para hibridomas estéril por filtração (filtro 0,22 μM). O meio utilizado foi RPMI (LGC Biotecnologia), suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB), 1% aminoácidos não essenciais, 2% piruvato de sódio e 0,2 μM gentamicina em garrafas para cultura de células de 25 e 75 cm^2 , em estufa a 37°C, 5% CO_2 . Após a formação de uma camada confluyente de células, o meio de cultura contendo os anticorpos solúveis, foi coletado assepticamente e armazenado -20°C. O sobrenadante proveniente das culturas foi filtrado (filtro 0,45 μM) e purificado por cromatografia de afinidade em colunas *HiTrap Protein G Sepharose High Performance* (GE Healthcare). As etapas de purificação consistiram em lavar a coluna com 20 mL de tampão de eluição (0,1 M Glicina pH 2,7) e equilibrar com 50 mL de tampão de ligação (20 mM Fosfato de sódio pH 7). O volume de 500 mL de sobrenadante, contendo os anticorpos anti-MHC II, foram passados pela coluna

lentamente duas vezes. Em seguida, os anticorpos foram eluídos com 25 mL de tampão de eluição (em frações de 5 mL por tubo) e foi adicionado tampão de neutralização (1 M Tris-HCl, pH 9) até as amostras atingirem a faixa de pH 7. As amostras foram analisadas em gel SDS-PAGE com 12% de acrilamida, dialisadas em tampão PBS pH 7,4 e armazenadas a -20°C. A concentração de anticorpos purificados foi medida através do aparelho *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Invitrogen).

3.5 ENSAIOS DE IMUNOPROTEÇÃO EM MODELO ANIMAL

Os experimentos de imunização e desafio foram realizados no Biotério do Laboratório de Zoonoses Bacterianas, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

Foram realizados quatro ensaios de imunoproteção, nos quais foram avaliados grupos de 10 hamsters da raça sírio (*Mesocricetus auratus*) recém-desmamados e com peso em torno de 80 g. Para cada ensaio foram realizadas duas imunizações com intervalo de 15 dias, conforme calendário de ensaios de imunoproteção (Figura 6). Após as imunizações, os animais foram desafiados intraperitonealmente com ~1000 vezes a DL50 (dose letal média capaz de matar a 50% de indivíduos) das estirpes bacterianas diluídas em PBS, segundo instruções do Código Federal de Regulações (CFR) 113.101, compendio de regras e regulamentos sobre assuntos diversos publicado pelo governo americano (U.S. GOVERNMENT PUBLISHING OFFICE, 2012). No 21º dia após o desafio foi realizada a avaliação visual da apresentação de sinais clínicos da doença, critérios de *endpoint*, como perda de apetite, dificuldade de respirar, prostração e perda de peso (COUTINHO et al., 2011). No mesmo dia, foi realizada a eutanásia dos animais que sobreviveram ao desafio, conforme protocolo vigente 7643121115, aprovado pela CEUA da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

Figura 4 - Calendário dos ensaios de imunoproteção em modelo animal.



Fonte: SANCHEZ, 2019.

Legenda: Foram realizadas duas imunizações com intervalos de quinze dias. No vigésimo nono dia foi feita uma sangria individual para análise da resposta imune humoral. No trigésimo dia os animais foram desafiados com uma cultura de leptospiros virulentas e após 21 dias de análise dos sinais clínicos os animais sobreviventes foram eutanasiados.

No primeiro ensaio de imunoproteção, os hamsters foram imunizados subcutaneamente com as proteínas recombinantes LigAC e LcpA com cauda de histidina (sem domínios fusionados), as proteínas fusionadas aos domínios ZZ e DTR e as proteínas co-administradas na mesma formulação, tanto fusionadas como não fusionadas aos domínios (Quadro 2). Baseado em trabalhos anteriores, onde foram avaliadas diferentes doses da proteína LigAC (MONARIS et al., 2015), resolveu-se utilizar a dose de 20 µg de proteína recombinante, já que esta foi a dose mínima necessária para induzir resposta imune. Os antígenos utilizados foram diluídos em PBS com os adjuvantes hidróxido de alumínio (10 µg de Al(OH₃) para cada 1 µg de proteína), CpG-ODN (40µg/dose) (5' TGA CTG TGA ACG TTC GAG ATG A 3') e o anticorpo anti-MHCII (clone 14.4.4S) como adjuvantes. A dose de CpG-ODN e de anticorpo 14.4.4S utilizada foi baseada em resultados obtidos previamente pelo grupo do Dr. Michel Leonetti da Unidade de Farmacologia e Imunologia, Instituto de Biologia e Tecnologia de Saclay – CEA, França (dados não publicados). O desafio foi do tipo homólogo, ou seja, os hamsters foram desafiados com a estirpe bacteriana *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni estirpe Fiocruz L1-130. Como controle negativo, os animais foram imunizados somente com PBS acrescentado de hidróxido de alumínio.

Quadro 2 – Composição das formulações vacinais utilizadas no primeiro ensaio de imunoproteção.

Grupos	Antígeno	Al (OH ₃)	CpG-ODN	14.4.4S
1- PBS	-	200 µg	40 µg	32 µg
2- LigAC	20 µg	200 µg	40 µg	32 µg
3- ZZ-LigAC-DTR	20 µg	200 µg	40 µg	32 µg
4- ZZ-DTR-LigAC	20 µg	200 µg	40 µg	32 µg
5- LcpA	20 µg	200 µg	40 µg	32 µg
6- ZZ-LcpA-DTR	20 µg	200 µg	40 µg	32 µg
7- LigAC + LcpA	20 µg de cada proteína	400 µg	80 µg	64 µg
8- ZZ-DTR-LigAC+ZZ-LcpA-DTR	20 µg de cada proteína	400 µg	80 µg	64 µg

Fonte: SANCHEZ, 2019.

Legenda: Os adjuvantes utilizados foram o hidróxido de Alumínio [Al(OH₃)], CpG ODNs (CpG) e o anticorpo anti-MHC II (14.4.4S). Cada linha da tabela corresponde a uma dose da formulação vacinal. Cada animal recebeu duas doses com intervalo de quinze dias.

No segundo ensaio de imunoproteção, os hamsters foram imunizados subcutaneamente com 20 µg de proteína recombinante por dose na presença do adjuvante hidróxido de alumínio (Quadro 3). Neste desafio, foi testada a ação protetora da proteína LcpA, comparando-se o potencial protetor da proteína fusionada aos domínios estudados com a proteína recombinante não fusionada. Este desafio foi do tipo heterólogo, ou seja, as nossas formulações vacinais foram testadas contra duas estirpes: *Leptospira interrogans* sorovar Canicola estirpe LO4 (LO4) e *Leptospira interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm (LPF). Como controle negativo, os animais foram imunizados com PBS e hidróxido de alumínio; como controle positivo, foi utilizada a bacterina produzida com as estirpes patogênicas usadas no desafio.

Quadro 3 – Composição das formulações vacinais utilizadas no segundo ensaio de imunoproteção.

Grupos	Antígeno	Al (OH₃)
1- PBS	20 µg	200 µg
2- LcpA	20 µg	200 µg
3- ZZ-LcpA-DTR	20 µg	200 µg
4- Bacterina	10 ⁵ células	200 µg

Fonte: SANCHEZ, 2019.

Legenda: Cada linha da tabela corresponde a uma dose da formulação vacinal. Cada animal recebeu duas doses com intervalo de quinze dias. O adjuvante utilizado foi o hidróxido de alumínio [Al(OH₃)].

Nos terceiro e quarto ensaios de imunoproteção foram testadas a ação protetora de uma dose menor (2 µg) de proteína recombinante LigAC, e a ação das fusões ZZ e DTR na ausência de adjuvante Alum, para analisar a indução de proteção apenas pelas proteínas recombinantes LigAC e LcpA (Quadro 4). O desafio realizado foi do tipo homólogo, testando as nossas formulações vacinais contra a estirpe Fiocruz L1-130 de espécie *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Como controle negativo, os animais foram imunizados somente com PBS adicionado de Alum.

Quadro 4 – Composição das formulações vacinais utilizadas no terceiro e quarto ensaio de imunoproteção.

Grupos	Antígeno	Al (OH₃)
1- PBS	-	200 µg
2- LigAC	2 µg	20 µg
3- LigAC	20 µg	200 µg
4- ZZ-LigAC-DTR	20 µg	-
5- LcpA	20 µg	200 µg
6- ZZ-LcpA-DTR	20 µg	200 µg
7- ZZ-LcpA-DTR	20 µg	-
8- LigAC + LcpA	20 µg de cada proteína	400 µg
9- ZZ-LigAC-DTR + ZZ-LcpA-DTR	20 µg de cada proteína	400 µg

Fonte: SANCHEZ, 2019.

Legenda: Cada linha da tabela corresponde a uma dose da formulação vacinal. Cada animal recebeu duas doses com intervalo de quinze dias. O adjuvante utilizado foi o hidróxido de alumínio [Al(OH₃)].

A proteção contra a morte por leptospirose foi calculada em todos os desafios pela porcentagem de animais sobreviventes ao desafio letal. Após a eutanásia, foram coletados os rins dos hamsters para a avaliação do estado de portador renal.

3.5.1 Cultura em meio semissólido de Fletcher

Os rins dos hamsters eutanasiados foram coletados assepticamente. Um rim de cada animal foi macerado em solução tamponada de Sørensen em um homogeneizador de órgãos (Stomacher 80 – Lab System). Aproximadamente 100 microlitros do macerado foram semeados em meio semissólido de *Fletcher* e o tubo foi incubado a uma temperatura 28°C – 30°C por 28 dias, com observações semanais para a verificação da formação do anel de crescimento subsuperficial. O diagnóstico positivo era resultante da visualização de leptospiros em microscópio de campo escuro, a partir de amostras dos meios de cultura dos rins.

3.5.2 PCR quantitativo dos rins de hamsters vacinados e infectados

O DNA genômico do rim coletado na eutanásia foi extraído com o kit *Wizard® SV Genomic DNA Purification System* (A2361, Promega - USA), segundo normas do fabricante. Em seguida, foi medida a concentração do DNA genômico com o auxílio do aparelho *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Invitrogen).

As reações de qPCR foram realizadas em um volume final de 20 µl. Para cada reação foram utilizados: 5 µl (50 ng/µg) de DNA genômico; 0,5 µl de cada oligonucleotídeo (10 µM) e sonda; 10 µl de tampão fornecido pelo fabricante (iTaQ supermix); e 3,5 µl de água ultrapura. Os oligonucleotídeos utilizados (Quadro 5) amplificam uma região de 242 pb do gene *lipL32* (STODDARD et al., 2009).

Quadro 5 – Oligonucleotídeos e sonda utilizados para quantificar DNA genômico de leptospiros presente nos rins dos animais que sobreviveram ao desafio com estirpes virulentas de *Leptospiras*.

Oligonucleotídeo / sonda	Sequência (5'- 3')
LipL32-45F (forward)	AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG
LipL32-286R (reverse)	GAA CTC CCA TTT CAG CGA TT
LipL32-189P (sonda)	AA AGC CAG GAC AAG CGC CG

Fonte: STODDARD, 2009.

A PCR foi realizada no termociclador *Veriti Thermal Cycler* (Applied Biosystems), sob as seguintes condições: 1 ciclo de desnaturação inicial de 95°C durante 3 minutos; seguido por 40 ciclos de amplificação a 95°C durante 15 segundos e 60°C durante 1 minuto; e 1 ciclo de resfriamento a 40°C durante 10 segundos. Os produtos da amplificação foram analisados em gel de agarose 1%.

O termociclador e o *software* utilizados neste ensaio foi o *LightCycler 480* (Roche), oferecidos pelo Laboratório Viroses de Bovídeos do Instituto Biológico. Todos os padrões e amostras foram executados em um único experimento. Para estabelecer o limite de detecção do ensaio foram utilizados rins de hamsters não imunizados e não infectados, denominados “controle normal” ou “controle negativo”. Uma curva padrão foi gerada a partir do DNA genômico de uma cultura de leptospiros *in vitro* e o número de equivalentes genômicos (EqG) foi extrapolado a partir dos valores do ciclo limiar (C_t). O resultado negativo foi atribuído onde não ocorreu amplificação ou quando o valor C_t foi maior do que 35. Os dados foram

apresentados como número de equivalentes genômicos por grama de tecido (EqG / g de tecido renal).

3.5.3 Avaliação da resposta imune dos hamsters por ELISA

A análise da resposta imune humoral foi realizada pelo acompanhamento do título de anticorpos anti-IgG total e dos isotipos IgG1, IgG2/3 e IgG3 contra as proteínas recombinantes, por ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). Para estes ensaios, os animais foram sangrados via plexo retro orbital um dia antes do desafio. Os antígenos (5 µg/mL de proteína recombinante purificada – LigAC ou LcpA) foram adsorvidos em placas de micro-diluição de 96 poços de poliestireno (Costar 3590, Corning), em tampão Carbonato 0,1 M pH 9,6 por 16 horas a 4°C. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução 5% leite em PBS-T (tampão PBS, acrescido de 0,05% de Tween 20).

Para a análise da resposta imune das imunoglobulinas IgG totais foram realizadas diluições de 1:1000 dos anticorpos primários (soros dos hamsters vacinados) para análise de LigAC, e diluições 1:100 para análise de LcpA. As placas foram incubadas por 16 horas a 4°C. Após três lavagens com tampão wash buffer, as placas foram incubadas com o anticorpo secundário (anti-hamster IgG conjugado com peroxidase) na diluição 1:5000, e incubadas por 1 hora a 37°C. Após três lavagens com tampão wash buffer, foi realizada a revelação com o substrato ABTS (2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt 1 mM, tampão citrato-fosfato 70 mM, pH 4,2 e 0,03% H₂O₂), durante 30 minutos a temperatura ambiente; a parada da reação foi realizada com a adição de uma solução SDS 5%; e a intensidade da reação colorimétrica resultante foi determinada pela leitura da densidade óptica em 405 nm.

Para a análise da resposta imune dos isotipos IgG1, IgG2/3 e IgG3 as placas foram igualmente sensibilizadas com os antígenos e bloqueadas com 5% leite. Foram realizadas diluições de 1:100 e 1:25 dos anticorpos primários para análise de LigAC e LcpA, respectivamente; com posterior incubação durante 1 hora a 37°C. Após três lavagens, as placas foram incubadas com os anticorpos secundários anti-hamster IgG1, IgG2/3 ou IgG3 conjugados com peroxidase, produzido em camundongo (*SouthernBiotech*), na diluição 1:4000 por 1 hora a 37

°C. Após três lavagens com tampão wash buffer, a revelação foi realizada com o substrato ABTS por 30 min, a parada da reação foi realizada com a adição de uma solução SDS 5%, e finalmente a leitura da densidade óptica medida em 405 nm.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a avaliação da proteção contra a morte por leptospirose utilizou-se o teste exato de Fisher. Para a avaliação do Log de equivalentes genômicos (EqG) por grama de tecido renal foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Dunn. Para a avaliação das diferenças entre as respostas imunes dos grupos avaliados, utilizou-se o teste paramétrico de análise de variância de uma via (ANOVA), seguido de comparações múltiplas de Tukey. A diferença estatisticamente significativa entre os grupos foi considerada com o valor de $p < 0,05$. As análises foram realizadas usando *GraphPad Prism 6*.

4. RESULTADOS

As proteínas recombinantes LigAC, ZZ-LigAC-DTR, ZZ-DTR-LigAC, LcpA e ZZ-LcpA-DTR foram expressas majoritariamente na fração de corpúsculos de inclusão (dados não mostrados), após a transformação na linhagem de *E. coli* BL21(DE3) competente. Posteriormente, as proteínas recombinantes foram purificadas a partir de 1 L de cultura e induzida com 1 mM IPTG em meio LB-ampicilina. Para tanto, os sedimentos de corpúsculos de inclusão foram ressuspensos em tampão de solubilização contendo 8 M uréia, como agente desnaturante e posteriormente, os solubilizados foram diluídos (100X) lentamente com o objetivo de diminuir a quantidade de uréia (de 8 M até próximo de zero) e recuperar a conformação estrutural da proteína. O processo de purificação foi feito por cromatografia de afinidade a metal para as proteínas com cauda de histidina LigAC e LcpA; e por afinidade à resina IgG Sepharose para as proteínas de fusão. Após a purificação, as proteínas foram dialisadas contra tampão PBS e mantidas a -20°C, até o momento do uso.

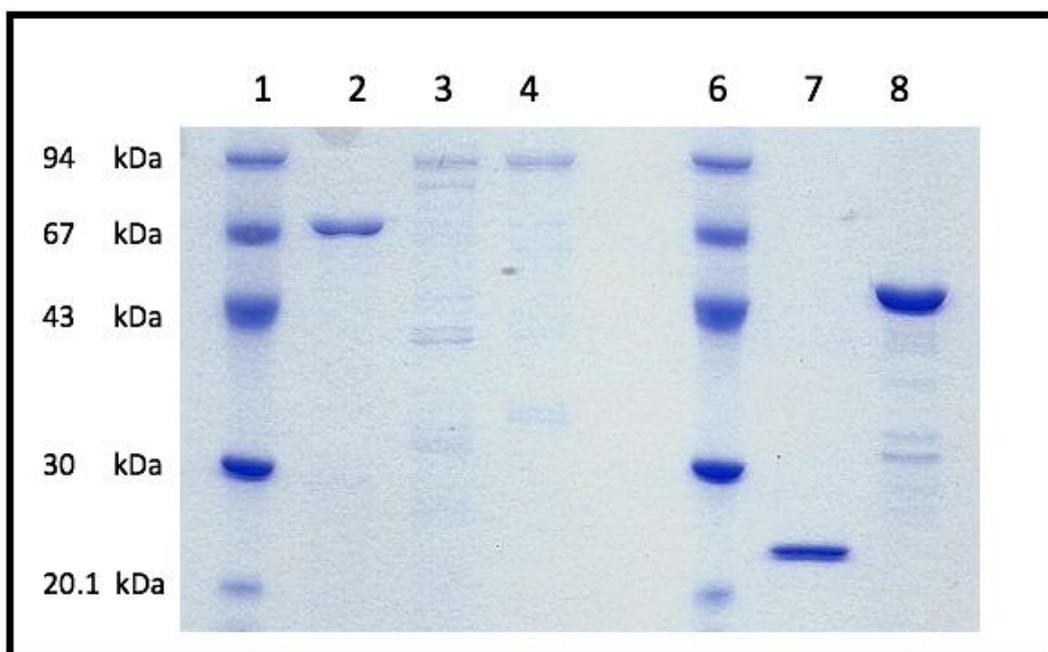
A análise da purificação das proteínas recombinantes dialisadas apresenta-se na Figura 7, onde as proteínas aparecem como bandas de tamanho de acordo com as respectivas massas moleculares. As massas moleculares e os pontos isoelétricos (pI) foram calculados a partir da composição de aminoácidos das proteínas recombinantes (Tabela 1). O servidor utilizado para obter estes dados foi ProtParam, disponível em <http://web.expasy.org/protparam>.

Tabela 1 - Dados das proteínas recombinantes do estudo.

Proteínas recombinantes	Número de aminoácidos	Massa molecular (kDa)	Ponto isoelétrico (pI) teórico	Rendimento (mg/L)
LigAC	607	63,81	7.28	69
ZZ-LigAC-DTR	888	94,77	7.08	39
ZZ-DTR-LigAC	887	94,71	7.08	37
LcpA	175	20,77	6.60	67
ZZ-LcpA-DTR	458	51,88	6.64	91

Fonte: SANCHEZ, 2019.

Figura 5 - Análise da purificação das proteínas recombinantes após a diálise contra tampão PBS.

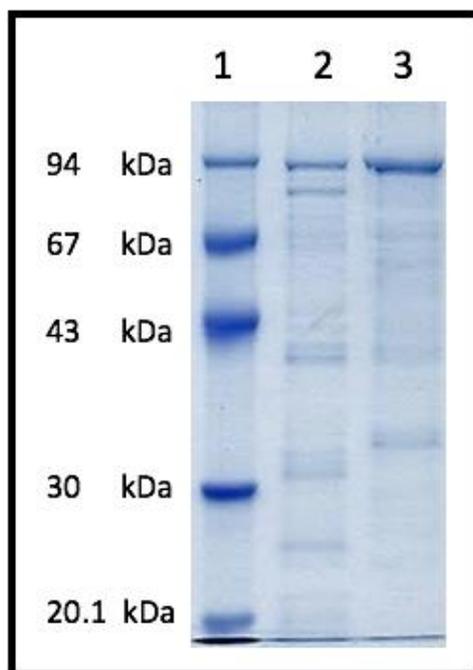


Fonte: SANCHEZ, 2019.

Legenda: Gel SDS-PAGE (12%) corado com Comassie Blue. 1 e 6) Marcador de massa molecular LMW; 2) LigAC; 3) ZZ-LigAC-DTR; 4) ZZ-DTR-LigAC; 7) LcpA; 8) ZZ-LcpA-DTR.

A obtenção da proteína recombinante ZZ-DTR-LigAC não estava prevista no projeto inicial. Os procedimentos de clonagem e purificação desta proteína foram realizados em razão da instabilidade e degradação da proteína ZZ-LigAC-DTR nas condições de armazenamento e congelamento. Foi observado pelo nosso grupo colaborador da Unidade de Farmacologia e Imunologia do Instituto de Biologia e Tecnologia de Saclay – CEA, França, que a mudança do domínio DTR para uma posição interna da fusão poderia favorecer a estabilidade de proteínas de tamanho maiores (dados não publicados). Dessa forma, uma nova clonagem para a expressão do domínio DTR entre o domínio ZZ e a proteína LigAC foi realizada em vetor pCP, resultando na construção ZZ-DTR-LigAC. Esta nova proteína recombinante foi expressa e purificada utilizando-se os mesmos procedimentos descritos anteriormente para as proteínas de fusão. A comparação entre as duas proteínas purificadas e dialisadas apresenta-se na figura 8. É possível observar a proteína ZZ-DTR-LigAC como uma banda predominante e a diminuição de degradação proteica, além disso, a proteína ZZ-DTR-LigAC apresentou-se mais estável durante o armazenamento (Figura 8, poço 3).

Figura 6 - Análise da purificação da proteína recombinante ZZ-DTR-LigAC.



Fonte: SANCHEZ, 2019.

Legenda: Gel SDS-PAGE (12%) corado com Comassie Blue. 1) Marcador de massa molecular LMW; 2) ZZ-LigAC-DTR após armazenamento; 3) ZZ-DTR-LigAC após purificação e diálise em PBS.

4.1 ANÁLISE DA PRESENÇA DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES PURIFICADAS

Coutinho et al. (2011) demonstraram que a manutenção da integridade estrutural da proteína LigA é essencial para a indução da proteção contra a leptospirose em modelo animal. Por isso, resolveu-se avaliar a integridade estrutural das proteínas recombinantes purificadas em duas análises: uma análise *in silico*, para predição teórica da estrutura secundária das proteínas recombinantes do estudo, realizada no programa Raptor-X (disponível em domínio público <http://raptorx.uchicago.edu/StructurePrediction/predict/>); e uma análise *in vitro*, para determinação da presença de estrutura secundária ordenada nas proteínas recombinantes do estudo, realizada pela técnica de dicroísmo circular (DC).

Os resultados da análise *in silico* estão apresentados na Tabela 2 e nas Figuras 9 e 10. Observa-se que existe uma predominância de folhas-beta e estruturas randômicas na proteína LigAC; e presença de folhas-beta e sequências

randômicas seguidas por uma menor quantidade de alfa-hélice, nas fusões de LigAC. Nas proteínas LcpA e ZZ-LcpA-DTR há maior presença de estruturas randômicas, seguidas por sequências folhas-beta e alfa-hélices.

Dados da literatura relatam que a estrutura do domínio ZZ da proteína A de *S.aureus*, resolvida por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), possui estruturas alfa-hélices arranjadas de maneira antiparalela (TASHIRO et al., 1997). A respeito do domínio R da toxina diftérica (DTR), um estudo relatou a presença de estruturas folhas-beta antiparalelas formando um barril com topologia *jelly roll*, determinado por estrutura cristalográfica (CHOE et al., 1992). Estes dados sugerem que a presença de folhas-beta e alfa-hélices nas proteínas de fusão está de acordo com o esperado. Dados completos da estrutura tridimensional das proteínas LigA e LcpA ainda não estão disponíveis. Apenas o domínio 12 da proteína LigB foi determinado por RMN, demonstrando um arranjo similar ao encontrado na família de proteínas bacterianas com domínios *Ig-like*, caracterizado pela presença, principalmente, de folhas-beta formando uma estrutura do tipo *greek-key* (PTAK et al., 2014). O que pode sugerir a presença majoritária de folhas-beta na proteína LigAC e suas fusões, como previsto pelo programa Raptor-X (Tabela 2).

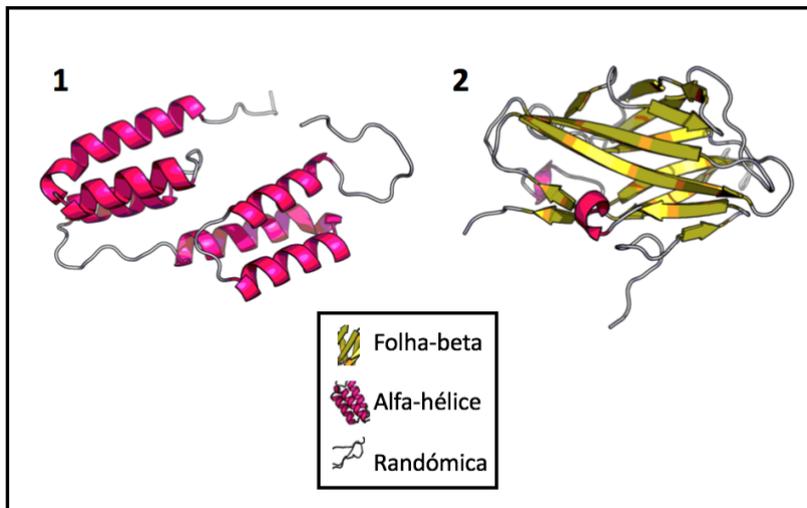
Tabela 2 – Predição teórica de estruturas secundárias das proteínas recombinantes do estudo.

Proteínas recombinantes	Alfa-hélice	Folha-beta	Randômicas
LigAC	-	59%	40%
ZZ-LigAC-DTR	2%	55%	42%
ZZ-DTR-LigAC	7%	48%	43%
LcpA	13%	36%	50%
ZZ-LcpA-DTR	21%	29%	48%

Fonte: SANCHEZ, 2019.

Legenda: Predição realizada com o programa Raptor-X.

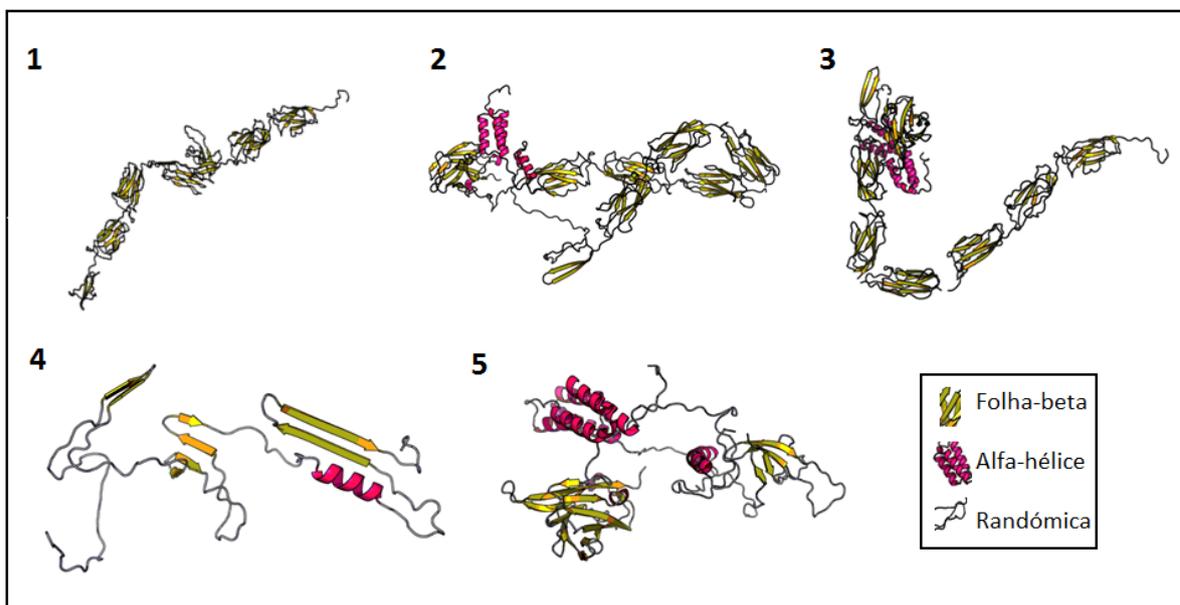
Figura 7 - Representação esquemática da predição teórica da estrutura do domínio ZZ da proteína A de *S. aureus* e do domínio R da toxina diftérica (DTR).



Fonte: SANCHEZ, 2019.

Legenda: 1) Domínio ZZ (58% alfa-hélice, 0% folha-beta e 41% randômica); 2) Domínio R (DTR) (0% alfa-hélice, 49% folha-beta e 50% randômica). Predição realizada com o programa Raptor-X.

Figura 8 - Representação esquemática da predição teórica da estrutura das cinco proteínas recombinantes utilizadas no estudo.



Fonte: SANCHEZ, 2019.

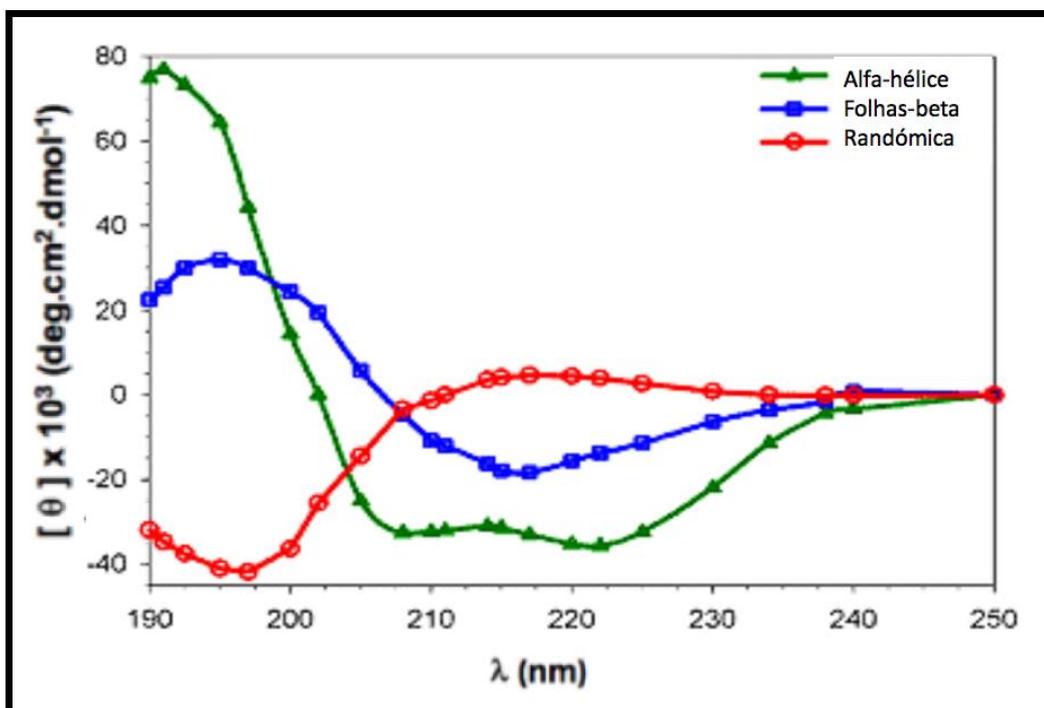
Legenda: 1) LigAC, 2) ZZ-LigAC-DTR, 3) ZZ-DTR-LigAC, 4) LcpA e 5) ZZ-LcpA-DTR. Predição realizada com o programa Raptor-X.

Já que no protocolo de purificação utilizado, a renaturação das proteínas recombinantes foi obtida através da diluição lenta da ureia (agente desnaturante) em tampão Tris, considerou-se importante avaliar a presença de estrutura secundária ordenada das proteínas recombinantes purificadas. Dessa forma, foram

colhidos dez espectros para cada proteína recombinante e as médias resultantes foram apresentadas e interpretadas em curvas de elipcidade molar ($[\theta]$).

Na figura 11 estão apresentadas as curvas de espectros típicos de cada estrutura secundária proteica: alfa-hélice, folha-beta e randômica. Na figura 12, apresentam-se os resultados da análise *in vitro*, realizada pela técnica de DC.

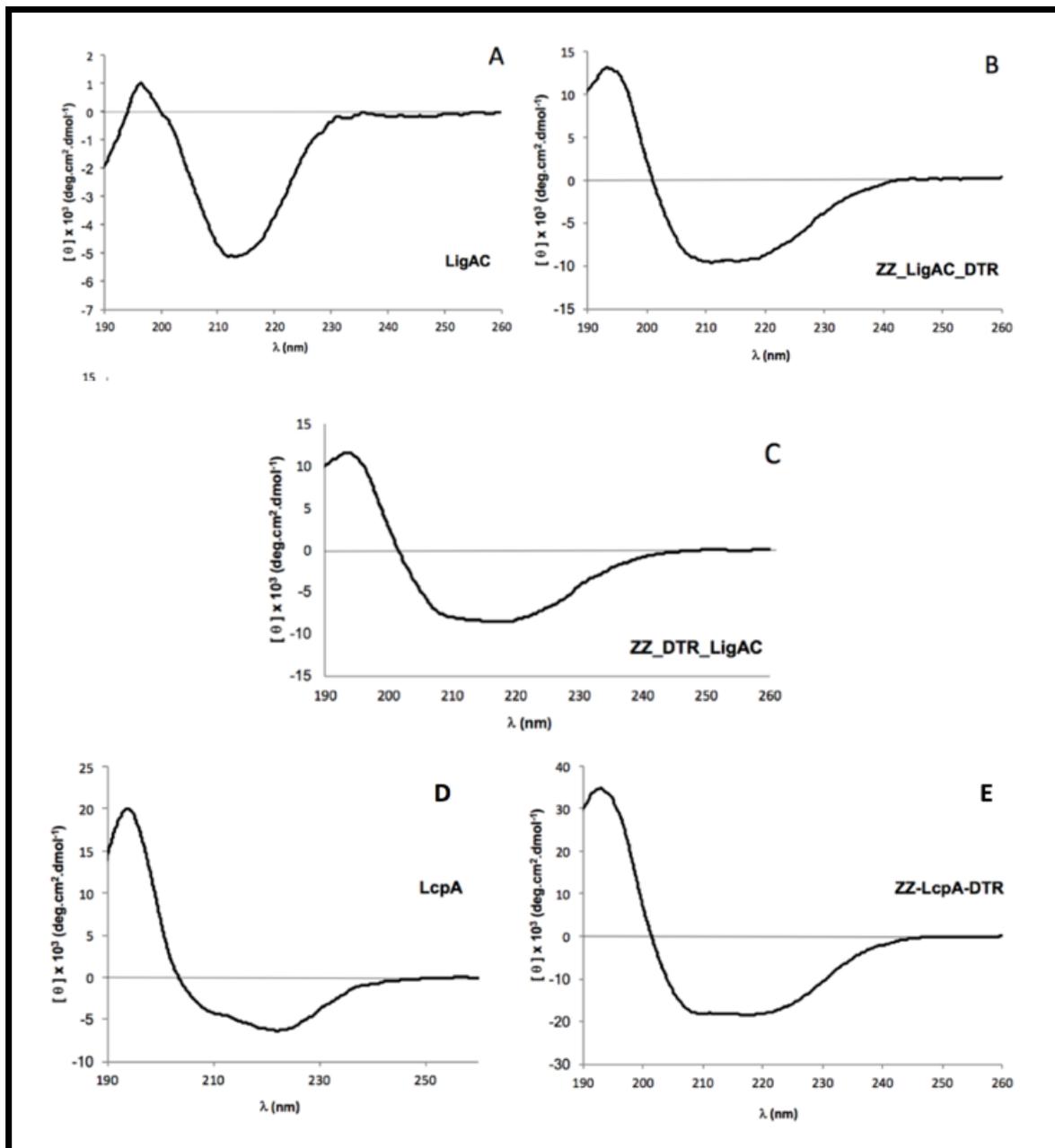
Figura 9 – Espectros de dicroísmo circular das estruturas secundárias proteicas.



Fonte: SANCHEZ, 2019.

Legenda: Representação gráfica teórica de espectros típicos de estrutura secundária.

Figura 10 – Espectros de dicroísmo circular obtidos para as proteínas recombinantes LigAC (A), ZZ-LigAC-DTR (B), ZZ-DTR-LigAC (C), LcpA (D) e ZZ-LcpA-DTR (E).



Fonte: SANCHEZ, 2019.

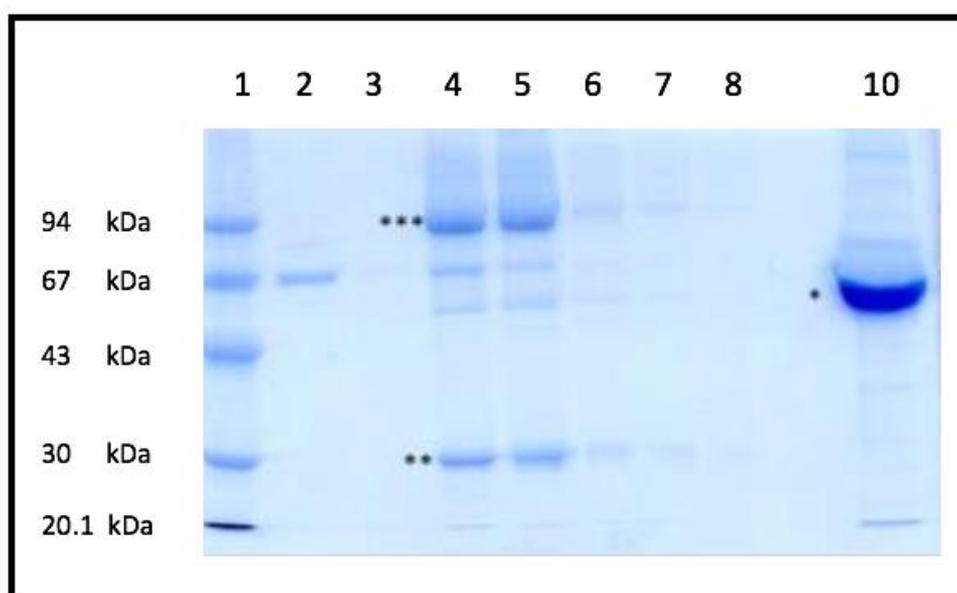
Legenda: Foram utilizadas amostras das proteínas purificadas e dialisadas contra tampão fosfato pH 7,4.

Pela comparação entre os espectros típicos das estruturas secundárias proteicas e os espectros obtidos com as proteínas deste estudo, concluiu-se que as proteínas recombinantes apresentaram espectros típicos de estrutura secundária ordenada e indicam, portanto, que possuem integridade estrutural e que o processo de purificação e renaturação foram eficientes.

4.2 PRODUÇÃO DE ANTI-MHC II

O anticorpo anti- MHC II foi purificado a partir do sobrenadante de uma cultura de hibridoma (clone 14.4.4S), utilizando cromatografia de afinidade a *IgG Sepharose*. Na Figura 13 podemos observar o resultado da purificação do anticorpo anti-MHC II 14.4.4S. Os poços 2 e 3 correspondem às lavagens da coluna (após a passagem do sobrenadante). Os poços 4 a 8 são as amostras eluídas, com a presença das bandas das cadeias leve e pesada do anticorpo. O poço 10 corresponde ao *flow-through* obtido após a passagem do sobrenadante e que contém principalmente a albumina do meio de cultura, demonstrando que o processo de purificação do anticorpo foi eficiente.

Figura 11 – Análise do processo de purificação do anticorpo anti-MHC de classe II (14.4.4S) a partir do sobrenadante do cultivo do hibridoma HB-32 em coluna IgG-Sepharose.



Fonte: SANCHEZ, 2019.

Legenda: Gel SDS-PAGE 12% corado com Comassie Blue. 1) Marcador de massa molecular LMW; 2 e 3) Lavagem da coluna com 20mM de fosfato de sódio pH 7.; 4 a 8) Frações eluídas com 0,1M de glicina-HCl, pH 2,7, presença da cadeia pesada (***) e da cadeia leve (**) do anticorpo; 10) *Flow-through* contendo albumina (66kDa) proveniente do meio de cultura (*).

4.3 ENSAIOS DE IMUNOPROTEÇÃO EM MODELO ANIMAL

Foram realizados quatro ensaios de imunoproteção animal contra leptospirose, utilizando grupos de 10 hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos,

recém-desmamados e com peso em torno de 80 g. Os critérios designados para avaliar a eficiência das nossas vacinas foram: a) total de animais sobreviventes (após 21 dias do desafio com leptospiras virulentas); b) total de animais que atenderam ao *endpoint* (perda de peso, perda de apetite, dificuldade em respirar, prostração, pelo arrepiado e/ou irregular) na avaliação visual; c) total de animais positivos à cultura (rins coletados na eutanásia dos animais sobreviventes); e d) total de animais positivos na qPCR (utilizando o DNA obtido de amostras de rins dos animais sobreviventes ao desafio).

4.3.1. Primeiro ensaio de imunoproteção

4.3.1.1 Análise geral da avaliação contra a morte e colonização renal.

Na Tabela 3 são apresentados, em resumo, os resultados obtidos do primeiro experimento de imunoproteção, denominado desafio 1. No grupo controle negativo (PBS + adjuvantes), oito animais morreram após o desafio letal com leptospiras patogênicas, e todos apresentaram sinais clínicos de leptospirose. Os dois animais sobreviventes deste grupo foram positivos na qPCR e no cultivo de leptospiras a partir dos rins, indicando a ocorrência de infecção (Tabela 3 e Figura 14). Os animais imunizados com a proteína LigAC e suas respectivas fusões (controles positivos) foram protegidos contra a morte e não apresentaram sinais clínicos de leptospirose, mas foram positivos na cultura e na qPCR. Estes resultados confirmam aqueles obtidos anteriormente por nosso grupo (MONARIS et al., 2015), demonstrando que as formulações vacinais testadas com a proteína LigAC (grupos 2 a 4, 7 e 8), como antígeno, não são eficazes para inibir a colonização renal, embora sejam eficientes na proteção contra a morte por leptospirose. Além disso, não observamos diferenças na proteção contra a leptospirose nas duas construções contendo a proteína LigAC fusionada com o domínio DTR na posição intermediária (grupo 4) ou C-terminal (grupo 3).

No grupo imunizado com a proteína LcpA (grupo 5), 60% dos animais foram protegidos da morte causada pela infecção com leptospiras e todos os animais apresentaram colonização renal (Tabela 3 e Figura 14). Estes resultados também estão de acordo com os dados obtidos por nosso grupo em experimentos

anteriores (dados não publicados). Na presença dos domínios ZZ e DTR (grupo 6), o antígeno LcpA foi capaz de induzir proteção em 100% dos animais contra a morte. Da mesma maneira, as proteínas LcpA e ZZ-LcpA-DTR co-administradas com a proteína LigAC sem domínios ou fusionada com os domínios ZZ e DTR (grupos 7 e 8) foram capazes de induzir proteção em 100% dos animais. Por outro lado, em nenhum destes grupos foi observado inibição da colonização renal.

4.3.1.2 Análise da carga bacteriana nos rins de hamsters por qPCR.

A Figura 14 mostra os resultados da técnica de PCR quantitativo (qPCR), realizada com o intuito de avaliar as formulações vacinais na prevenção da colonização renal. Observa-se uma diminuição do Log de equivalentes genômicos (EqG) por grama de tecido renal nos grupos vacinais, em comparação com grupo controle PBS. Porém, não foi observada diferença estatística significativa ($p < 0,05$) na comparação entre os grupos vacinados e o grupo controle, e nem na comparação entre os grupos vacinados. Importante observar que no grupo vacinado com LcpA, 4 dos 6 animais que sobreviveram tiveram uma diminuição da colonização renal menor do que o $\log 10^3$ leptospiros por grama de tecido.

Tabela 3 – Ensaio 1: Desafio homólogo de imunoproteção em hamsters.

N.º	Grupos	Animais que sobreviveram ao desafio / total (%)	Animais que atingiram o <i>endpoint</i> / total (%) ^a	Animais positivos na cultura renal / sobreviventes(%)	Animais positivos na qPCR / sobreviventes (%)
1	PBS *	2/10 (20%)	10/10 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)
2	LigAC *	10/10 (100%) ^s	0/10 (0%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)
3	ZZ-LigAC-DTR *	10/10 (100%) ^s	0/10 (0%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)
4	ZZ-DTR-LigAC *	10/10 (100%) ^s	0/10 (0%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)
5	LcpA *	6/10 (60%) ^{ns}	4/10 (40%)	6/6 (100%)	6/6 (100%)
6	ZZ-LcpA-DTR *	10/10 (100%) ^s	0/10 (0%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)
7	LigAC + LcpA *	10/10 (100%) ^s	0/10 (0%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)
8	ZZ-DTR-LigAC + ZZ-LcpA-DTR *	10/10 (100%) ^s	0/10 (0%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)

Fonte: SANCHEZ, 2019.

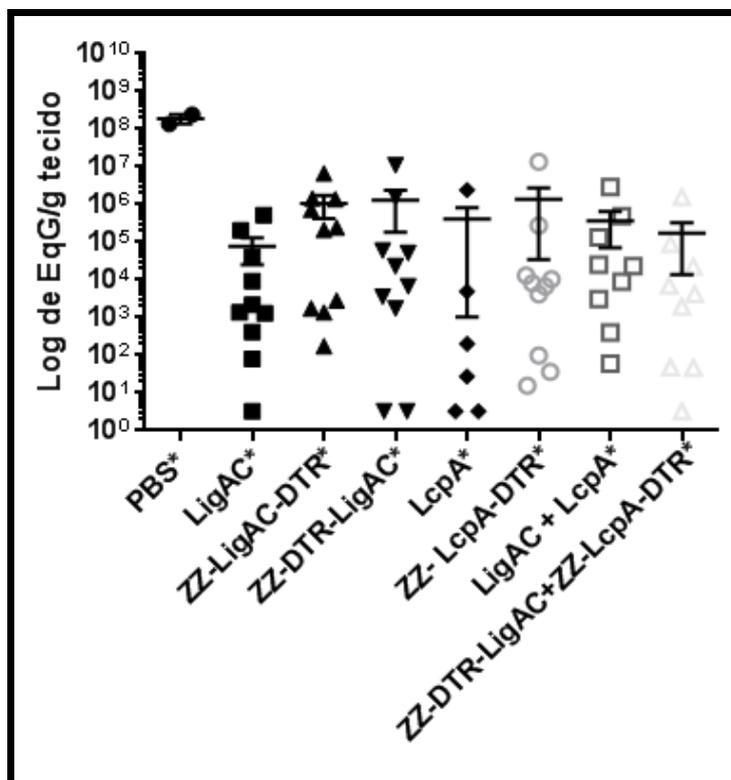
Legenda: Resultados de sobrevivência e colonização renal após desafio com *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni estirpe Fiocruz L1-130.

^a Critérios de *endpoint*: perda de apetite, dificuldade de respirar, prostração e perda de peso.

* Formulações compostas pelos adjuvantes: anticorpo anti-MHCII (14.4.4S) + CpG-ODN + hidróxido de alumínio.

^{s, ns} Indica se houve ou não diferença estatisticamente significativa estabelecida pelo valor de $p \leq 0,05$ no teste exato de Fisher, quando comparando o grupo experimental com o grupo controle (PBS*).

Figura 12 – Ensaio 1: Análise da carga bacteriana dos rins dos animais sobreviventes ao desafio, pela técnica de PCR quantitativo (qPCR).



Fonte: SANCHEZ, 2019.

Legenda: Ensaio realizado em duplicata com oligonucleotídeos e sonda baseados na sequência do gene lipL32. A quantidade de leptospiros foi expressa como equivalentes genômicos (EqG) por grama de tecido. As linhas pretas mostram a média da carga bacteriana com as barras de erros-padrões. (*) Adjuvantes (hidróxido de alumínio, CPG-ODN e anti-MHC II).

4.3.1.3 Análise da resposta imune humoral para IgG total e as subclasses IgG1, IgG2/3 e IgG3 por ELISA.

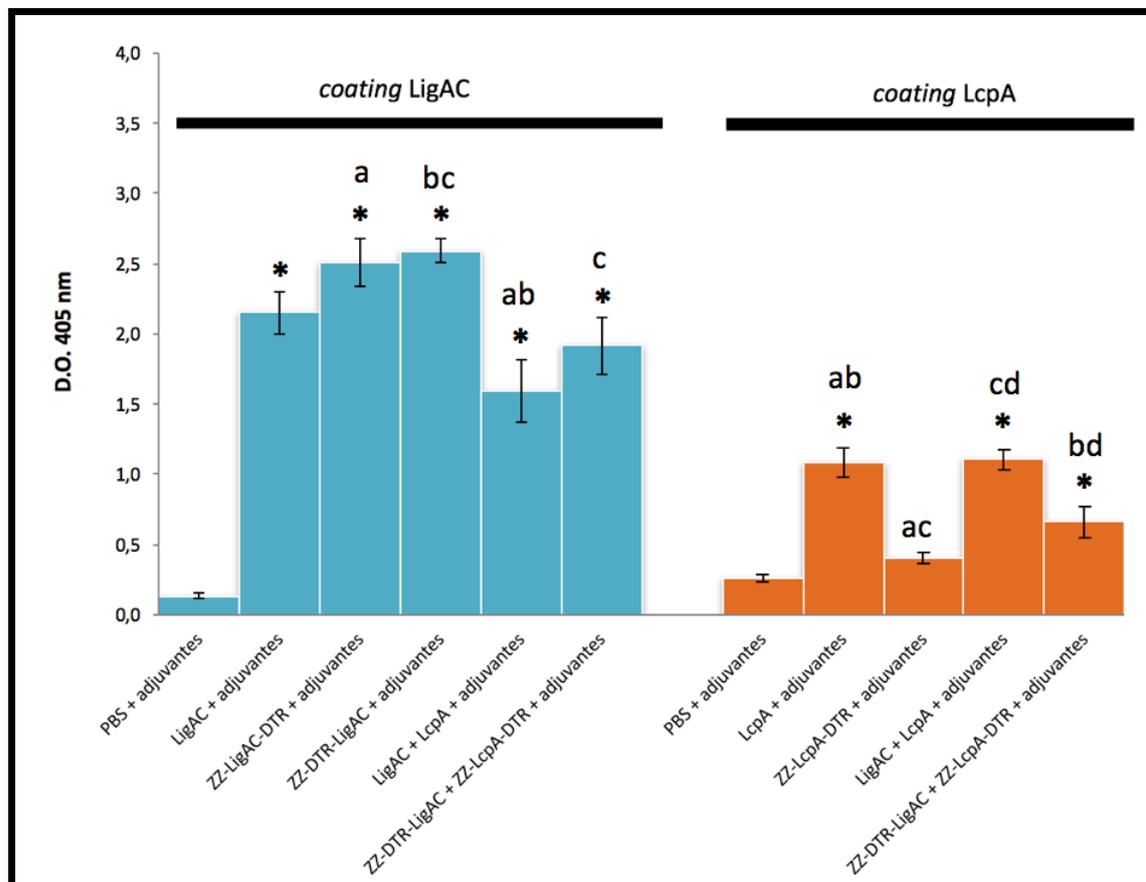
A avaliação da imunogenicidade dos soros dos animais foi realizada por ELISA, utilizando os anticorpos anti-hamster IgG total e os isotipos IgG1, IgG2-3 e IgG3. Os gráficos foram construídos com a média dos valores de absorvância obtidos com os soros individuais (n=10) (leitura a 405 nm). Para a avaliação de IgG total, os soros dos hamsters imunizados foram diluídos 1:100 e 1:1000 para as placas adsorvidas com LcpA e LigAC, respectivamente. Diferentes marcas de subclasses de IgGs anti-hamster comerciais em diferentes diluições foram testadas (dados não mostrados). Somente os anticorpos anti-hamster (IgG1, IgG2/3 e IgG3) produzidos em camundongo da marca *SouthernBiotech* apresentaram reatividade

com os soros dos animais imunizados nas diluições 1:25 e 1:100 para LcpA e LigAC, respectivamente.

Na Figura 15, são apresentados os gráficos dos experimentos realizados com a adsorção das placas com LigAC ou LcpA. Observa-se que os soros dos animais imunizados com PBS + adjuvantes (hidróxido de alumínio, CpG e anti-MHC II) apresentaram pouca reatividade inespecífica. A proteína LigAC mostrou-se mais imunogênica que a proteína LcpA, uma vez que todos os soros dos animais imunizados com as preparações vacinais contendo a proteína LigAC fusionada ou não apresentaram níveis de anticorpos IgG total maiores do que aqueles obtidos com os soros dos animais imunizados com a proteína LcpA fusionada ou não. Considerando o antígeno LigAC, todas as formulações vacinais testadas apresentaram altos níveis de anticorpos, sugerindo que a posição do domínio DTR não interfere na imunogenicidade e que a presença dos domínios ZZ e DTR nas composições vacinais não conseguiu induzir um aumento dos níveis de anticorpos IgG total, conforme desejado. Na análise estatística realizada, todas as formulações vacinais apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), quando comparados com o grupo controle PBS. Os grupos LigAC, ZZ-LigAC-DTR e ZZ-DTR-LigAC não apresentaram diferença estatística entre si ($p > 0,05$). Por outro lado, na presença da proteína LcpA com ou sem domínios (ZZ e DTR), foi observada uma diminuição da antigenicidade da proteína LigAC. Nestes casos, os valores apresentaram diferença significativamente estatística quando comparados com os valores dos outros grupos experimentais ($p < 0,05$).

As formulações vacinais aparentemente mais antigênicas, considerando só o antígeno LcpA, foram a combinação desta proteína com LigAC e LcpA sem fusões e o grupo imunizado com somente LcpA. Porém, segundo o teste estatístico realizado, todas as formulações vacinais exceto o grupo ZZ-LcpA-DTR apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), quando comparados com o grupo controle PBS.

Figura 13 – Ensaio 1: Avaliação de IgG total em hamsters imunizados com as diferentes formulações vacinais, com placas adsorvidas com LigAC e LcpA.



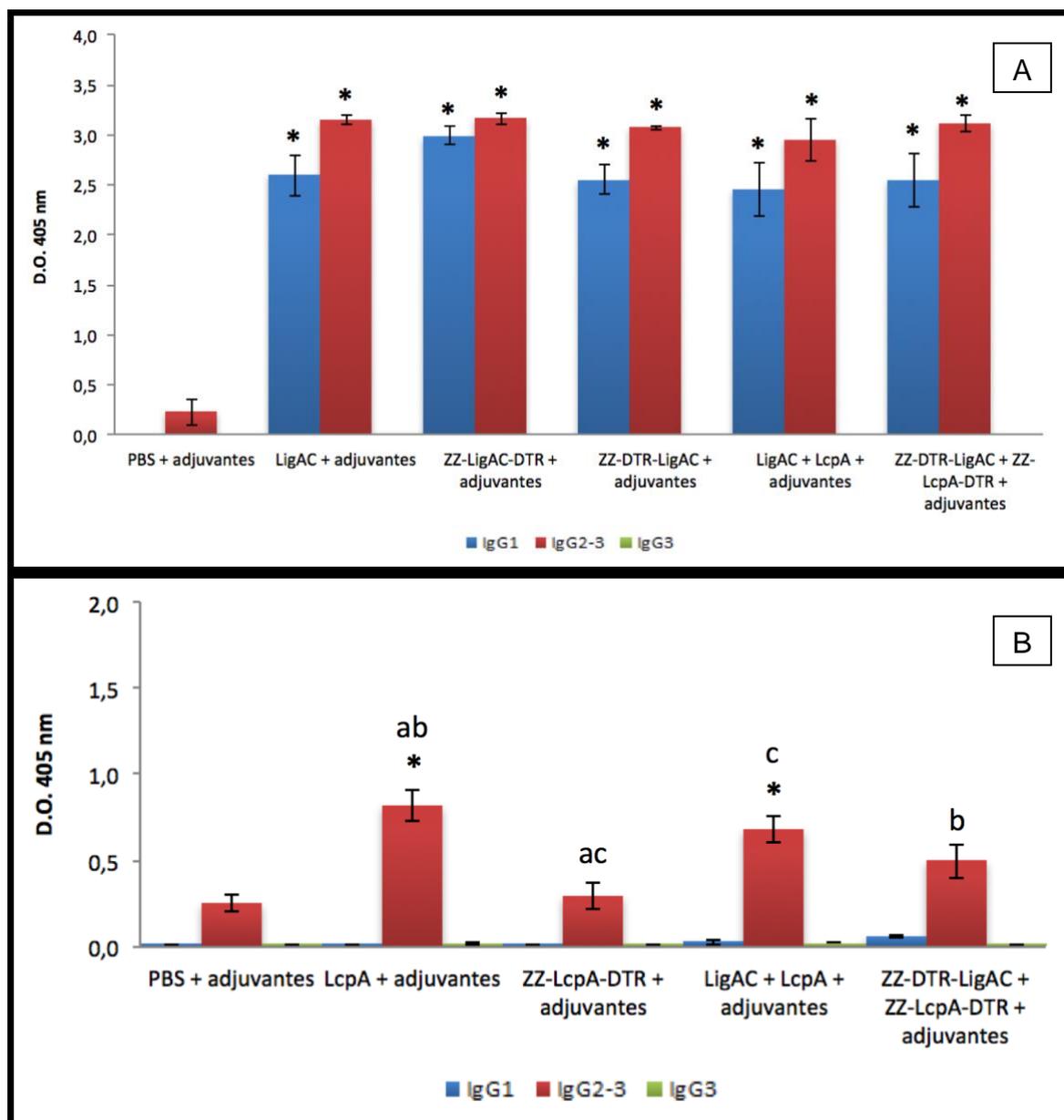
Fonte: SANCHEZ, 2019.

Legenda: Os soros foram diluídos em 1:1.000 e 1:100 nas placas adsorvidas com LigAC e LcpA, respectivamente. A avaliação foi feita por ELISA. No diagrama de barras, as mesmas representam a média dos valores de absorvância obtidos os soros dos 10 animais do grupo e as linhas acima das barras correspondem aos erros padrão das amostras. (*) representa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparando os grupos experimentais ao respectivo grupo controle. As letras minúsculas iguais representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais indicados.

Na Figura 16 apresentam-se os resultados dos isotipos IgG1, IgG2/3 e IgG3. Apesar da baixa diluição do soro utilizado não foi observada reatividade inespecífica das subclasses com os soros dos animais imunizados com PBS + adjuvantes (hidróxido de alumínio, CpG e anti-MHC II). Os resultados para a proteína LigAC indicam que os hamsters apresentaram altos níveis de anticorpos IgG1 e IgG2/3 e não induziram IgG3. Na análise estatística realizada, todas as formulações vacinais com LigAC apresentaram diferença significativa nos valores de OD obtidos para os isotipos IgG1 e IgG2/3 ($p < 0,05$), quando comparados com o grupo controle PBS. Já os resultados para a proteína LcpA mostram indução de

produção de anticorpos quase exclusivamente para o tipo IgG2/3; com diferença estatística para os grupos LcpA e LigAC + LcpA, quando comparados com o grupo controle PBS. As subclasses IgG1 e IgG3 não foram induzidas por estas formulações vacinais.

Figura 14 – Ensaio 1: Avaliação das subclasses de IgG (IgG1, IgG2/3 e IgG3) em hamsters imunizados com diferentes formulações vacinais.



Fonte: SANCHEZ, 2019.

Legenda: (A) placas adsorvidas com LigAC (B) placas adsorvidas com LcpA. Os soros do experimento foram diluídos em 1:100 e 1:25 nas placas adsorvidas com LigAC e LcpA, respectivamente. A avaliação foi feita por ELISA. As colunas dos gráficos representam a média dos valores de absorvância obtidos com os soros dos 10 animais do grupo. As linhas acima das barras correspondem aos erros padrão das amostras. (*) representa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparando os grupos experimentais ao respectivo grupo controle. As letras

minúsculas iguais representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais indicados.

4.3.2. Segundo ensaio de imunoproteção

O propósito deste ensaio foi testar a eficácia das formulações vacinais com LcpA no desafio heterólogo, utilizando as estirpes patogênicas *Leptospira interrogans* sorovar Canicola (LO4) e *Leptospira interrogans* sorovar Kennewicki (LPF).

4.3.2.1 Análise geral da avaliação contra a morte e colonização renal.

A Tabela 4 mostra os resultados de sobrevivência de animais e colonização renal. Nove animais de cada grupo controle negativo PBS morreram após o desafio com as estirpes patogênicas LPF e LO4. Os animais vacinados com as bacterinas, compostas pelas suspensões de leptospiros das estirpes patogênicas, sobreviveram, validando o experimento de desafio heterólogo.

Tabela 4 – Ensaio 2: Desafio heterólogo de imunoproteção em hamsters.

N.º	Grupos	Animais que sobreviveram ao desafio / total (%)	Animais que atingiram os critérios <i>endpoint</i> / total (%) ^a	Animais positivos na cultura renal / sobreviventes (%)	Animais positivos na qPCR / sobreviventes (%)
Desafiados com estirpe LPF					
1	PBS*	1/10 (10%)	10/10 (100%)	0/1 (0%)	1/1 (100%)
2	LcpA*	1/10 (10%) ^{ns}	9/10 (90%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)
3	ZZ-LcpA-DTR*	6/10 (60%) ^{ns}	4/10 (40%)	5/6 (83%)	6/6 (100%)
4	Bacterina*	4/4 (100%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)	4/4 (100%)
Desafiados com estirpe LO4					
1	PBS*	1/10 (10%)	10/10 (100%)	0/1 (0%)	1/1 (100%)
2	LcpA*	0/10 (0%) ^{ns}	10/10 (100%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)
3	ZZ-LcpA-DTR*	2/10 (20%) ^{ns}	8/10 (80%)	1/2 (50%)	2/2 (100%)
4	Bacterina*	4/4 (100%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)	4/4 (100%)

Fonte: SANCHEZ, 2019.

Legenda: Resultados de sobrevivência e colonização renal após desafio com *Leptospira interrogans* sorovar Canicola estirpe LO4 e *Leptospira interrogans* sorovar Kennewicki estirpe LPF.

^a Critérios de *endpoint*: perda de apetite, dificuldade de respirar, prostração e perda de peso.

* Formulações compostas pelo adjuvante hidróxido de alumínio

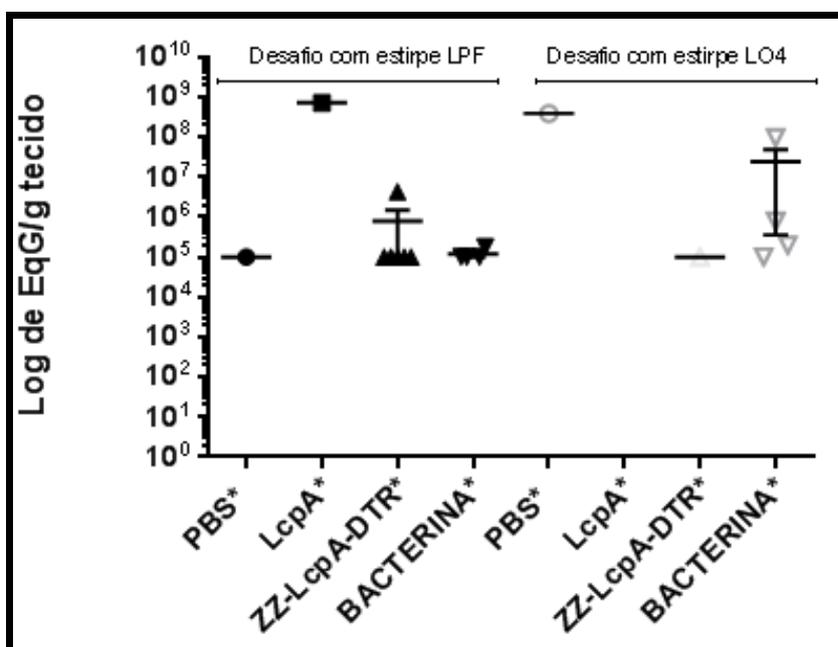
^{ns} Indica que não houve diferença estatisticamente significativa estabelecida pelo valor de $p \leq 0,05$ no teste exato de Fisher, quando comparando o grupo experimental com o grupo controle (PBS*)

A maioria dos animais imunizados com a proteína recombinante LcpA morreu apresentando sinais clínicos de leptospirose. Os grupos vacinados com a proteína recombinante ZZ-LcpA-DTR foram parcialmente protegidos contra a morte, entretanto sem diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Todos os sobreviventes foram positivos para a cultura renal e para a qPCR de tecido renal. Estes resultados mostraram que as vacinas formuladas com a proteína LcpA não foram capazes de prover imunidade esterilizante.

4.3.2.2 Análise da carga bacteriana nos rins de hamsters por qPCR.

Na Figura 17 apresentam-se os resultados da técnica qPCR. Não se observou diminuição do Log de equivalentes genômicos (EqG) por grama de tecido renal nos grupos vacinados, em comparação com grupo controle PBS.

Figura 15 – Ensaio 2: Análise da carga bacteriana dos rins dos animais sobreviventes ao desafio, pela técnica de PCR quantitativo (qPCR).



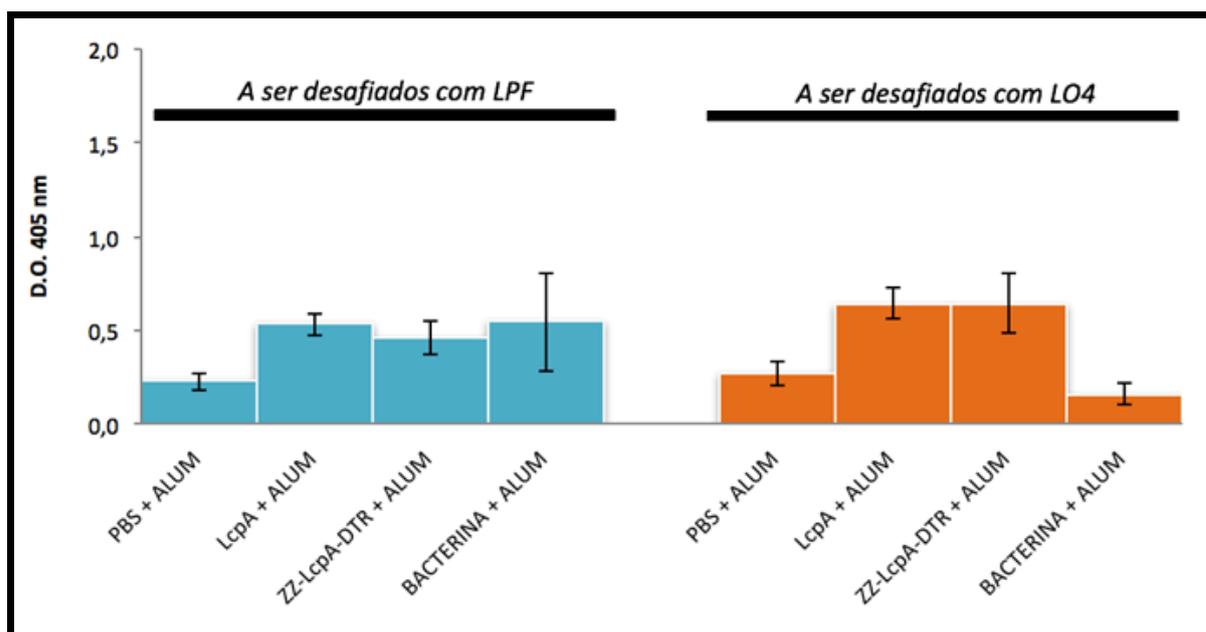
Fonte: SANCHEZ, 2019.

Legenda: Ensaio realizado em duplicata com oligonucleotídeos e sonda baseados na sequência do gene lipL32. A quantidade de leptospiros foi expressa como equivalentes genômicos (EqG) por grama de tecido. As linhas pretas mostram a média da carga bacteriana com as barras de erro-padrões. (*) Adjuvante hidróxido de Alumínio.

4.3.2.3 Análise da resposta imune humoral para IgG total e as subclasses IgG1, IgG2/3 e IgG3 por ELISA.

A Figura 18 apresenta os resultados da resposta humoral de IgG total avaliada por ELISA, utilizando placas adsorvidas com a proteína recombinante LcpA, para os grupos desafiados com as estirpes LPF e LO4. Os soros dos animais imunizados com PBS e hidróxido de alumínio apresentaram baixa reatividade inespecífica. As composições vacinais com as proteínas LcpA e ZZ-LcpA-DTR induziram níveis semelhantes de anticorpos IgG. Na análise estatística não foi observada diferença significativa em nenhuma comparação entre os grupos experimentais nem quando comparando os mesmos ao grupo controle.

Figura 16 – Ensaio 2: Avaliação de IgG total em hamsters imunizados com as diferentes formulações vacinais.

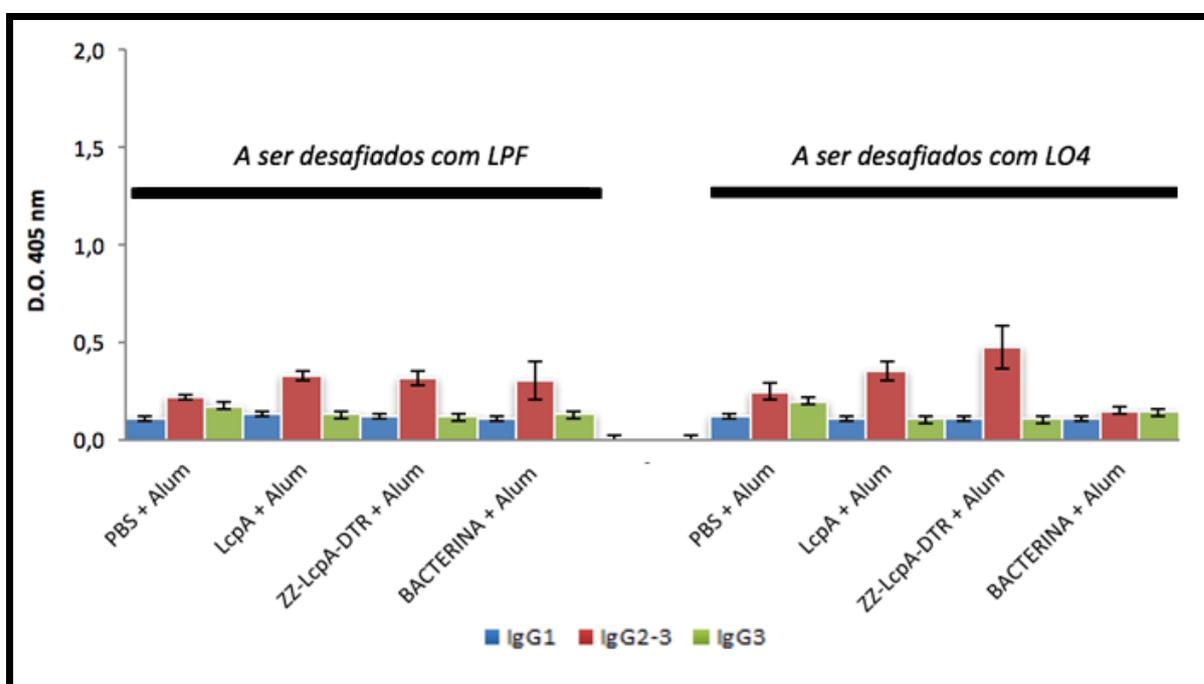


Fonte: SANCHEZ, 2019.

Legenda: Os soros foram diluídos 1:100 e avaliados por ELISA. O antígeno LcpA foi adsorvido em placas de microdiluição para realização deste experimento. No diagrama de barras, as mesmas representam a média dos valores de absorvância obtidos com os soros dos 10 animais do grupo e as linhas acima das barras correspondem aos erros padrão das amostras.

Na Figura 19 são mostrados os resultados do ELISA para as subclasses IgG1, IgG2/3 e IgG3. Observa-se que foram induzidas as três subclasses, sendo que a predominância de resposta humoral foi direcionada à subclasse IgG2/3. O grupo que pareceu-se ser mais imunogênico foi o ZZ-LcpA-DTR, quando desafiado pela estirpe LO4, grupo que apresentou 80% de mortalidade. Entretanto, pela análise estatística não há diferença significativa dos valores obtidos entre os grupos experimentais e o grupo controle PBS.

Figura 17 – Ensaio 2: Avaliação das subclasses de IgG (IgG1, IgG2/3 e IgG3) em hamsters imunizados com as diferentes formulações vacinais.



Fonte: SANCHEZ, 2019.

Legenda: Os soros foram diluídos 1:25 e avaliados por ELISA. O antígeno LcpA foi adsorvido em placas de microdiluição para realização deste experimento. As colunas representam a média dos valores de absorvância obtidos com os soros dos 10 animais do grupo. As linhas acima das barras correspondem aos erros padrão das amostras.

4.3.3. Terceiro ensaio de imunoproteção

Os objetivos deste desafio foram testar a ação do adjuvante hidróxido de alumínio na composição vacinal, e comprovar a eficiência da formulação vacinal composta pelos antígenos ZZ-LigAC-DTR e ZZ-LcpA-DTR, na indução da proteção contra a morte no desafio homólogo com *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni estirpe Fiocruz L1-130.

Para tal fim, a quantidade de antígeno, no grupo 2, foi diminuída para 2 µg. A intenção foi comprovar a importância da quantidade de antígeno por dose na formulação vacinal; e no grupo 4, testamos a ação das fusões ZZ e DTR na indução da proteção pela proteína LcpA na ausência de adjuvante.

4.3.3.1 Análise geral da avaliação contra a morte

Na Tabela 5 estão resumidos os resultados obtidos no terceiro experimento de imunoproteção. No grupo controle negativo (PBS), apenas dois animais morreram após o desafio (80% de sobrevivência).

No título 9 sobre animais e produtos animais do Código Federal de Regulações (CFR) 113.101, compendio de regras e regulamentos sobre assuntos diversos publicado pelo governo americano (U.S. GOVERNMENT PUBLISHING OFFICE, 2012), estipula-se que para provar a eficácia de uma vacina, o grupo controle deve apresentar mortalidade de no mínimo 80% após o desafio com estirpes virulentas. Dessa forma, já que a mortalidade no grupo controle foi de apenas 20%, este ensaio de imunoproteção ficou invalidado. Portanto, os resultados de sobrevivência deste ensaio não foram considerados para avaliar a proteção conferida pelas preparações vacinais testadas e um novo experimento foi realizado (ensaio de imunoproteção 4). Mesmo assim, os soros obtidos pela sangria realizada antes do desafio foram utilizados para avaliação da resposta humoral por ELISA, como mostrado a seguir.

Tabela 5 – Ensaio 3: Desafio homólogo de imunoproteção em hamsters.

N.º	Grupos	Animais que sobreviveram ao desafio / total (%)	Animais que atingiram o <i>endpoint</i> / total (%) ^a
1	PBS*	8/10 (80%)	10/10 (100%)
2	LigAC (2 ug)*	10/10 (100%) ^{ns}	0/10 (0%)
3	LigAC (20 ug)*	10/10 (100%) ^{ns}	0/10 (0%)
4	ZZ-LigAC-DTR	10/10 (100%) ^{ns}	0/10 (0%)
5	LcpA*	10/10 (100%) ^{ns}	4/10 (40%)
6	ZZ-LcpA-DTR*	10/10 (100%) ^{ns}	0/10 (0%)
7	ZZ-LcpA-DTR	10/10 (100%) ^{ns}	0/10 (0%)
8	LigAC + LcpA*	10/10 (100%) ^{ns}	0/10 (0%)
9	ZZ-DTR-LigAC + ZZ-LcpA-DTR*	9/10 (90%) ^{ns}	1/10 (10%)

Fonte: SANCHEZ, 2019.

Legenda: Resultados de sobrevivência e colonização renal após desafio com *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni estirpe Fiocruz L1-130.

^a Critérios de *endpoint*: perda de apetite, dificuldade de respirar, prostração e perda de peso.

* Formulações compostas pelo adjuvante hidróxido de alumínio.

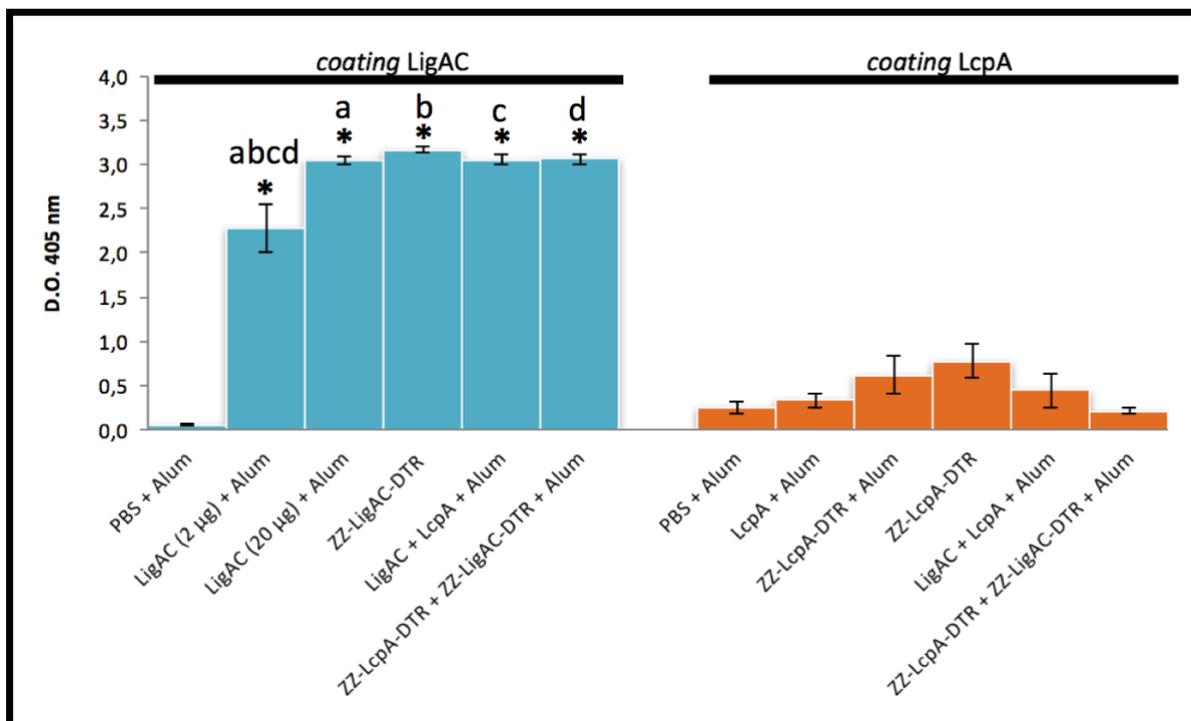
^{ns} Indica que não houve diferença estatisticamente significativa estabelecida pelo valor de $p \leq 0,05$ no teste exato de Fisher, quando comparando o grupo experimental com o grupo controle (PBS*).

4.3.3.2 Análise da resposta imune humoral para IgG total e as subclasses IgG1, IgG2/3 e IgG3 por ELISA:

A Figura 20 apresenta os resultados das análises dos ELISA para IgG total com placas sensibilizadas com proteína LigAC e LcpA. Na avaliação da proteína LigAC, observa-se um aumento significativo dos níveis de anticorpo IgG em todas as formulações vacinais, em comparação com o grupo controle PBS, confirmado pelo teste estatístico utilizado ($p < 0,05$). Pôde-se observar que os níveis de anticorpos IgG totais foram maiores nos grupos imunizados com maior quantidade da proteína LigAC (20 µg) fusionada ou não fusionada e em combinação com LcpA, em comparação ao grupo imunizado com menor quantidade de antígeno (2 µg), na presença do hidróxido de alumínio como adjuvante; diferença confirmada pelo teste estatístico ($p < 0,05$). Já na avaliação da proteína LcpA, não houve diferença estatisticamente significativa quando comparando os grupos vacinados ao grupo controle PBS, e nem quando comparado os grupos experimentais entre

eles. Como verificado nos experimentos anteriores, não houve reconhecimento inespecífico dos soros dos animais do grupo controle negativo e as proteínas.

Figura 18 – Ensaio 3: Avaliação de IgG total em hamsters imunizados com as diferentes formulações vacinais.



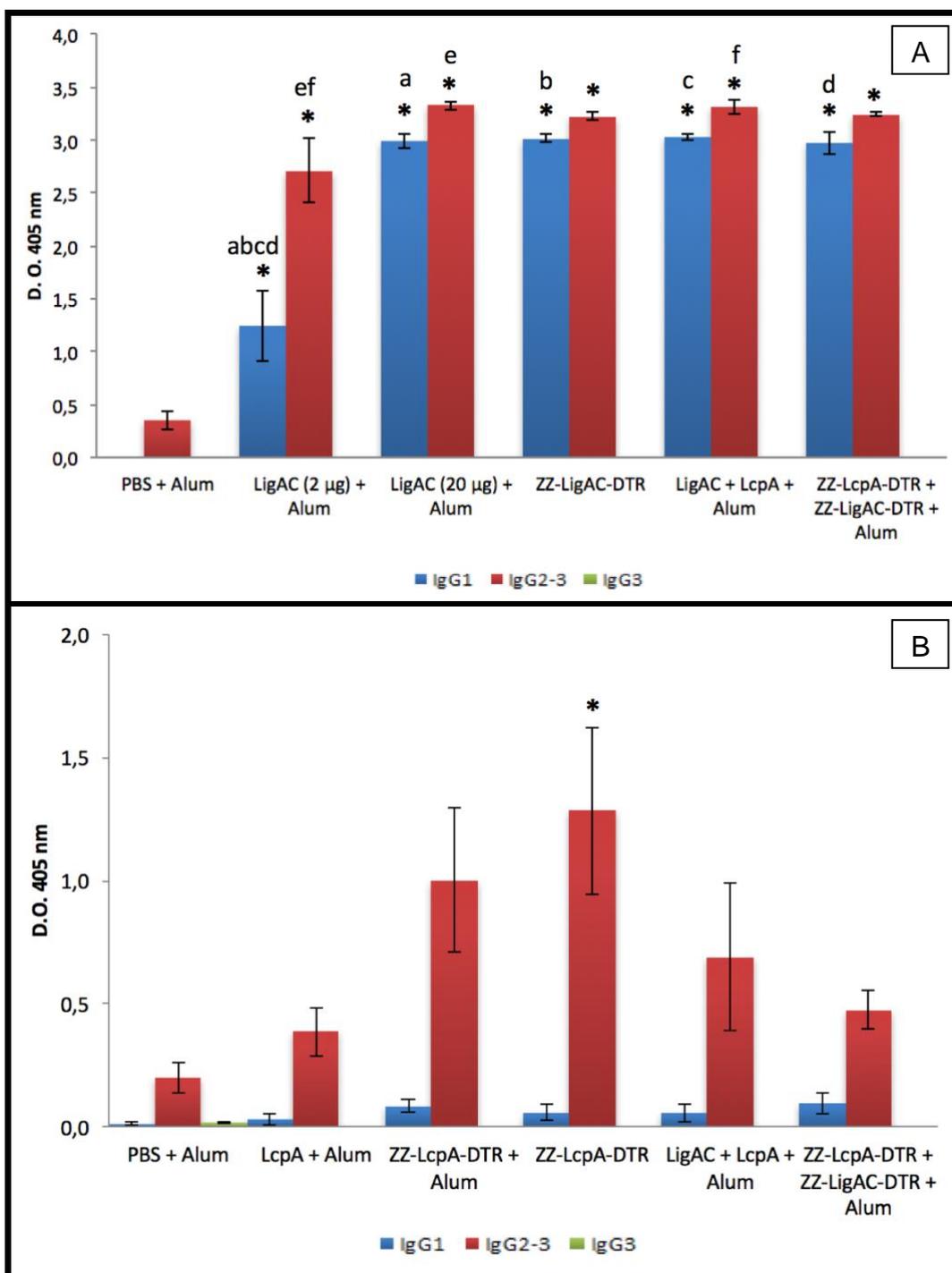
Fonte: SANCHEZ, 2019.

Legenda: Os soros foram diluídos 1:1000 e 1:100 nas placas adsorvidas com LigAC e LcpA, respectivamente. A avaliação foi feita por ELISA. No diagrama de barras, as mesmas representam a média dos valores de absorvância obtidos com os soros dos 10 animais do grupo e as linhas acima das barras correspondem aos erros padrão das amostras. (*) representa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparando os grupos experimentais ao respectivo grupo controle. As letras minúsculas iguais representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais indicados.

A Figura 21 apresenta os resultados das análises dos ELISA para os isotipos IgG1, IgG2/3 e IgG3, com placas sensibilizadas com proteína LigAC e LcpA. Na avaliação da proteína LigAC, observa-se um aumento dos níveis de anticorpo IgG1 e IgG2/3 em todas as formulações vacinais, em comparação com o grupo controle PBS, aumento estatisticamente significativo confirmado pelo teste estatístico utilizado ($p < 0,05$). No grupo vacinado com a proteína LigAC em menor concentração (2 µg), a resposta IgG1 e IgG2/3 teve uma diminuição estatisticamente significativa, em comparação com os outros grupos vacinais. Aparentemente, a indução de IgG1 depende da quantidade de antígeno utilizada

porque a imunização de 2 μ g de LigAC induziu menores níveis de anticorpos. Não houve resposta humoral anti-IgG3.

Figura 19 – Ensaio 3: Avaliação das subclasses de IgG (IgG1, IgG2/3 e IgG3) em hamsters imunizados com diferentes formulações vacinais.



Fonte: SANCHEZ, 2019.

Legenda: (A) placas adsorvidas com LigAC (B) placas adsorvidas com LcpA. Os soros do experimento foram diluídos em 1:100 e 1:25 nas placas adsorvidas com LigAC e LcpA, respectivamente. A avaliação foi feita por ELISA. As colunas dos gráficos representam a média dos valores de absorbância obtidos com os soros dos 10 animais do grupo. As linhas acima das barras

correspondem aos erros padrão das amostras. (*) representa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparando os grupos experimentais ao respectivo grupo controle. As letras minúsculas iguais representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais indicados.

Os resultados foram diferentes na avaliação da proteína LcpA, a qual mostrou-se imunogênica com o isotipo IgG2/3. O único grupo vacinado que apresentou um aumento estatisticamente significativo na resposta imune humoral ao isotipo IgG2/3 foi o grupo vacinado com a proteína ZZ-LcpA-DTR, sem Alum. As subclasses IgG1 e IgG3 não foram induzidas pelas formulações vacinais.

Os soros dos animais imunizados com PBS + hidróxido de alumínio (grupo controle negativo) apresentaram baixa reatividade inespecífica.

4.3.4. Quarto ensaio de imunoproteção

O desafio 4 foi a repetição do desafio 3. Foi repetido o desenho experimental utilizado no terceiro desafio, mantendo assim o mesmo objetivo.

4.3.4.1 Análise geral da avaliação contra a morte e colonização renal:

Os resultados do quarto ensaio de imunoproteção apresentam-se na Tabela 6. Como pode ser observado, todos os animais do grupo controle apresentaram sinais clínicos de leptospirose, determinado pelos critérios de *endpoint*, porém, somente quatro animais (40%) deste grupo morreram após o desafio, portanto o mesmo também não conseguiu ser validado, segundo o regulamento do título 9 da CFR 113.101 (U.S. GOVERNMENT PUBLISHING OFFICE, 2012). A totalidade dos animais sobreviventes (6/6) foi positiva na cultura renal e no qPCR, indicando colonização bacteriana renal.

Tabela 6 - Ensaio 4: Desafio homólogo de imunoproteção em hamsters.

N.º	Grupos	Animais que sobreviveram ao desafio / total (%)	Animais que atingiram o <i>endpoint</i> / total (%)	Animais positivos na cultura renal / sobreviventes (%)	Animais positivos na qPCR / sobreviventes (%)
1	PBS*	6/10 (60%)	10/10 (100%)	6/6 (100%)	6/6 (100%)
2	LigAC (2 ug)*	10/10 (100%) ^{ns}	0/10 (0%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)
3	LigAC (20 ug)*	10/10 (100%) ^{ns}	0/10 (0%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)
4	ZZ-LigAC-DTR	10/10 (100%) ^{ns}	0/10 (0%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)
5	LcpA*	10/10 (100%) ^{ns}	0/10 (0%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)
6	ZZ-LcpA-DTR*	10/10 (100%) ^{ns}	0/10 (0%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)
7	ZZ-LcpA-DTR	10/10 (100%) ^{ns}	0/10 (0%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)
8	LigAC + LcpA*	10/10 (100%) ^{ns}	0/10 (0%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)
9	ZZ-DTR-LigAC + ZZ-LcpA-DTR*	10/10 (100%) ^{ns}	0/10 (0%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)

Fonte: SANCHEZ, 2019.

Legenda: Resultados de sobrevivência e colonização renal após desafio com *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni estirpe Fiocruz L1-130.

^a Critérios de *endpoint*: perda de apetite, dificuldade de respirar, prostração e perda de peso.

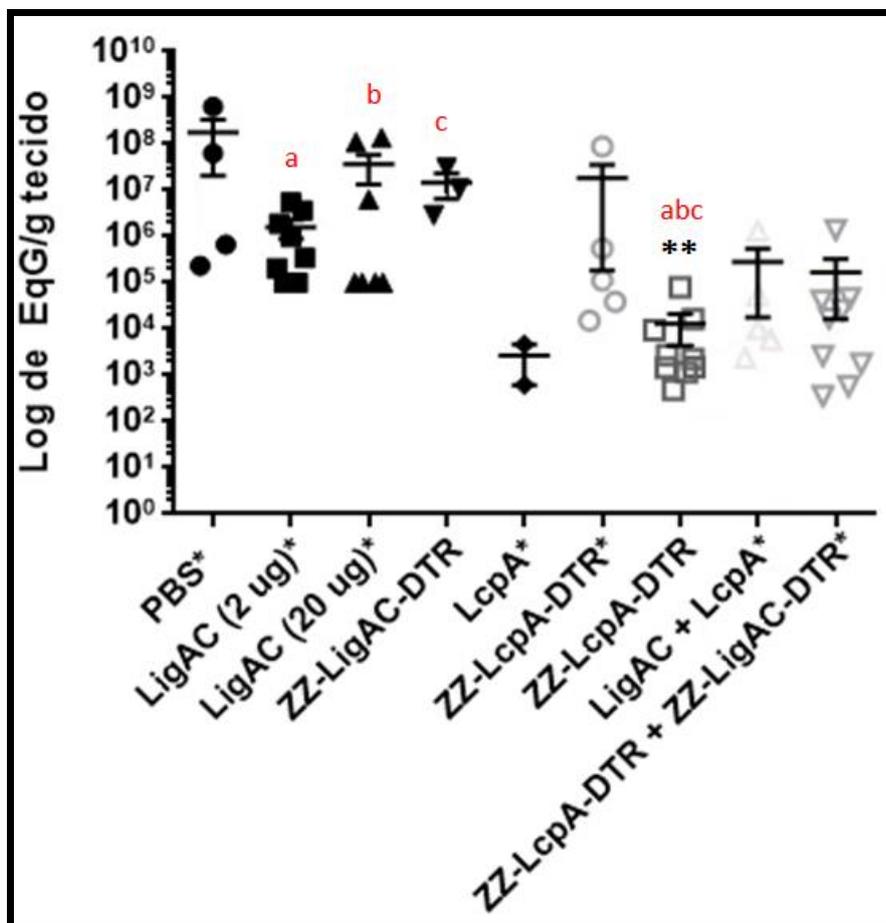
* Formulações compostas pelo adjuvante hidróxido de alumínio

^{ns} Indica que não houve diferença estatisticamente significativa estabelecida pelo valor de $p \leq 0,05$ no teste exato de Fisher, quando comparando esse grupo experimental com o grupo controle (PBS*)

4.3.4.2 Análise da carga bacteriana nos rins de hamsters por qPCR:

Na Figura 22, apresentam-se os resultados da qPCR. Apesar do resultado positivo para a colonização renal por esta técnica, observa-se uma diminuição da quantidade de leptospiros por grama de tecido renal em alguns animais dos grupos vacinados com LcpA, ZZ-LcpA-DTR sem alumínio e ZZ-LigAC-DTR + ZZ-LcpA-DTR. Na análise estatística, só o grupo vacinado com ZZ-LcpA-DTR mostrou diminuição significativa, comparado ao grupo controle PBS. Além disso, as comparações mostraram diferença estatisticamente significativa na carga bacteriana nos rins entre os grupos vacinados só com LigAC e o grupo vacinado com ZZ-LcpA-DTR sem Alum. Esta última informação sugere que a proteína LcpA pode ser mais eficiente na prevenção da colonização renal do que a proteína LigAC, independente da quantidade aplicada desta última.

Figura 20 – Ensaio 4: Análise da carga bacteriana dos rins dos animais sobreviventes ao desafio, pela técnica de PCR quantitativo (qPCR).



Fonte: SANCHEZ, 2019.

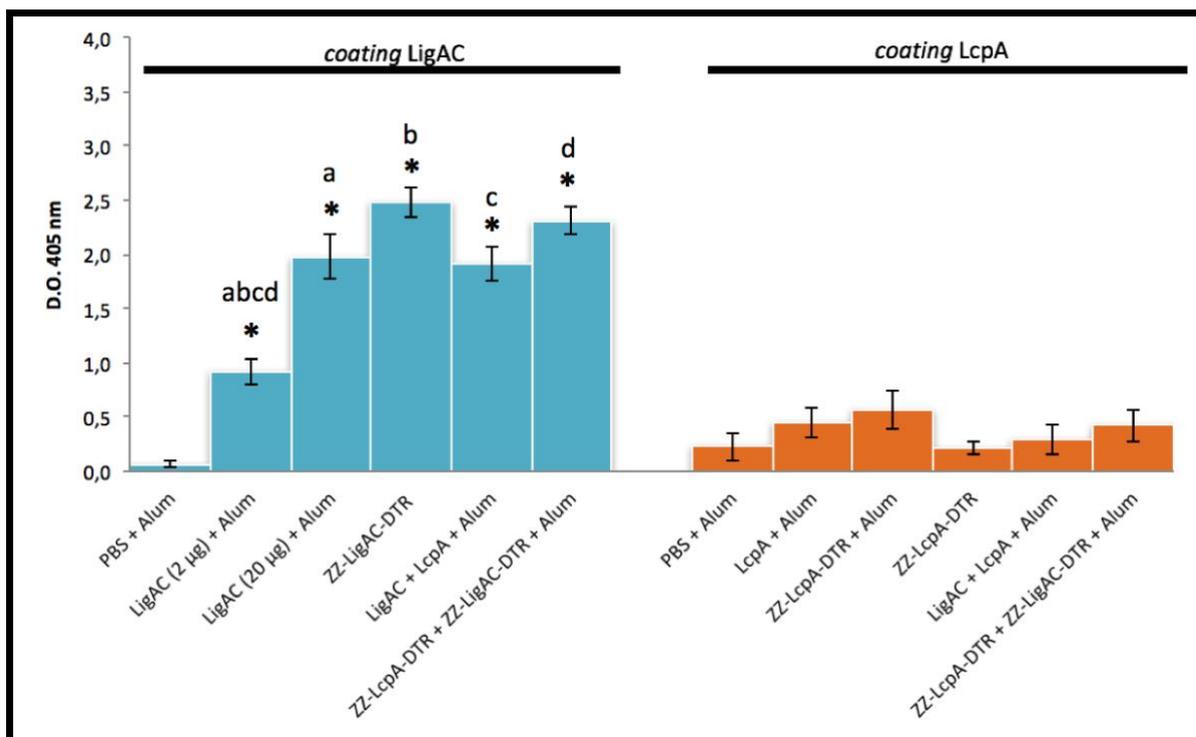
Legenda: Ensaio realizado em duplicata com oligonucleotídeos e sonda baseados na sequência do gene *lipL32*. A quantidade de leptospiros foi expressa como equivalentes genômicos (EqG) por grama de tecido. As linhas pretas mostram a média da carga bacteriana com as barras de erros-padrões. (*) Adjuvante hidróxido de Alumínio. (**) Representa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparando os grupos experimentais ao respectivo grupo controle. As letras minúsculas iguais representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais indicados.

4.3.4.3 Análise da resposta imune humoral para IgG total e as subclasses IgG1, IgG2/3 e IgG3 por ELISA:

Na Figura 23, mostram-se os gráficos dos resultados da resposta humoral anti-IgG total determinada por *ELISA*. Na avaliação da proteína LigAC, observou-se aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) dos níveis de anticorpos em todos os grupos experimentais, quando comparado ao grupo controle PBS. Da mesma maneira que no terceiro ensaio, valores menores de absorvância foram obtidos no grupo imunizado com a menor dose de LigAC (2 μ g) quando comparados com os

grupos imunizados com 20 µg. Já na avaliação da proteína LcpA, observou-se que nenhum dos grupos vacinados com esta proteína teve um aumento estatisticamente significativo na resposta imune humoral anti-IgG.

Figura 21 – Ensaio 4: Avaliação de IgG total em hamsters imunizados com as diferentes formulações vacinais.



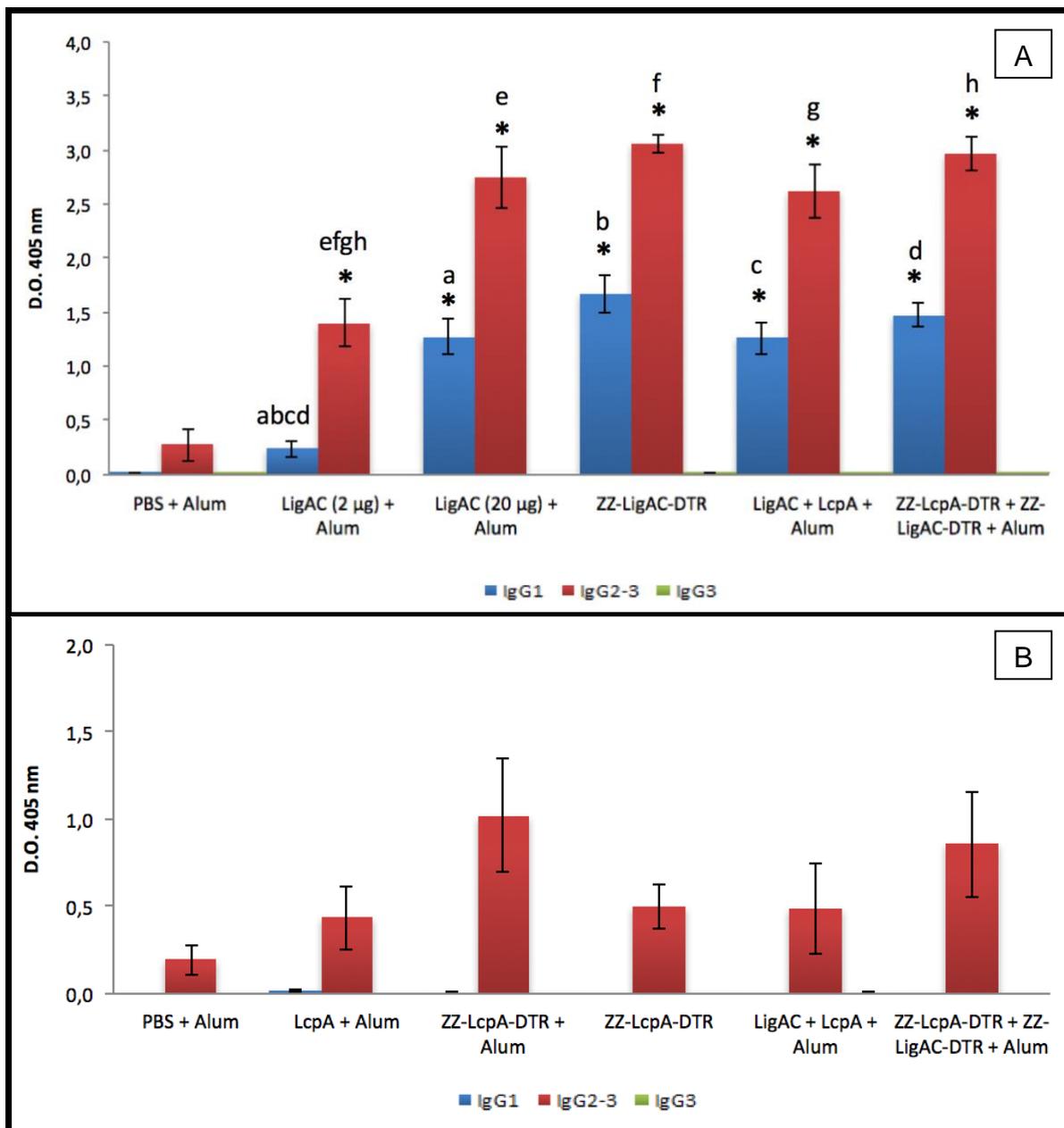
Fonte: SANCHEZ, 2019.

Legenda: Os soros foram diluídos 1:1000 e 1:100 nas placas adsorvidas com LigAC e LcpA, respectivamente. A avaliação foi feita por ELISA. No diagrama de barras, as mesmas representam a média dos valores de absorvância obtidos com os soros dos 10 animais do grupo e as linhas acima das barras correspondem aos erros padrão das amostras. (*) Representa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparando os grupos experimentais ao respectivo grupo controle. As letras minúsculas iguais representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais indicados.

Na Figura 24, apresentam-se os resultados da avaliação dos isotipos IgG1, IgG2/3 e IgG3. Na análise realizada com a proteína LigAC, observou-se aumento dos níveis de anticorpos IgG1 e IgG2/3 em todos os grupos vacinados, com predominância da subclasse IgG2/3. O aumento foi estatisticamente significativo em todos os grupos ($p < 0,05$), com exceção do grupo vacinado com 2 µg de LigAC para IgG 1. A resposta humoral ao isotipo IgG3 não foi estimulada com esta proteína.

Na avaliação da proteína recombinante LcpA pode ser observado aumento dos níveis de anticorpo unicamente contra a subclasse IgG2/3, sendo que os grupos que apresentaram maiores níveis de anticorpo foram os grupos vacinados com ZZ-LcpA-DTR mais Alum e o grupo ZZ-LcpA-DTR + ZZ-LigAC-DTR. A análise estatística não determinou diferença significativa ($p < 0.05$), quando comparando os grupos experimentais ao controle PBS, nem na comparação entre os grupos experimentais.

Figura 22 – Ensaio 4: Avaliação das subclasses de IgG (IgG1, IgG2/3 e IgG3) em hamsters imunizados com diferentes formulações vacinais.



Fonte: SANCHEZ, 2019.

Legenda: (A) placas adsorvidas com LigAC (B) placas adsorvidas com LcpA. Os soros do experimento foram diluídos em 1:100 e 1:25 nas placas adsorvidas com LigAC e LcpA, respectivamente. A avaliação foi feita por ELISA. As colunas dos gráficos representam a média dos valores de absorbância obtidos com os soros dos 10 animais do grupo. As linhas acima das barras correspondem aos erros padrão das amostras. (*) Representa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparando os grupos experimentais ao respectivo grupo controle. As letras minúsculas iguais representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais indicados.

5. DISCUSSÃO

A leptospirose como zoonose cosmopolita apresenta uma grande importância na saúde tanto dos animais quanto dos humanos. Sendo assim, medidas de profilaxia são necessárias para ajudar a combater esta grave zoonose.

As vacinas comerciais atuais contra esta doença são bacterinas geralmente sorovar específicas sem a capacidade de indução de memória imunológica, apresentando muita variabilidade na resposta imune induzida, e conseqüentemente certas limitações para o uso. Diversos estudos têm avaliado a ação das bacterinas na prevenção cruzada contra a leptospirose, assim como contra a colonização renal produzida por esta doença. Recentemente, Fávero et al. (2018) avaliou a ação de uma vacina comercial em bovinos que contém seis sorovares patogênicos, concluindo que a mesma não foi capaz de induzir anticorpos específicos contra nenhum dos sorovares presentes nela. Outros estudos que avaliaram bacterinas produzidas com sorovares não presentes em vacinas comerciais, como os sorovares Manilae e Kennewicki, encontraram que as mesmas conseguiam prevenir contra a morte por leptospirose, provendo certo grau de proteção cruzada entre sorovares do mesmo sorogrupo, mas sem inibição da colonização renal (DIB et al., 2014; MURRAY et al., 2018).

Outro problema relacionado às bacterinas é a pouca durabilidade da resposta imune humoral que estas geram, tornando necessária a revacinação anual. Um estudo mostrou que duas vacinais comerciais compostas por seis e oito sorovares patogênicos, respectivamente, promoveram um aumento da imunogenicidade 60 dias após a vacinação, sendo que a resposta no dia 120 pós vacinação alcançou níveis de anticorpos baixos, semelhantes aos da pré-vacinação (MARTINS; OLIVEIRA; LILENBAUM, 2018).

Em vista das incertezas da vacinação com bacterinas, novas vacinas e estratégias vacinais são requeridas para a prevenção da leptospirose. Foi nessa tentativa que surgiu o trabalho de Felix et al. (2009), que utilizou a vacinologia reversa para identificar sete novos candidatos vacinais de *Leptospira interrogans*, porém quando estes candidatos foram testados em ensaios de imunoproteção em hamsters, não foram capazes de conferir imunidade protetora nem de prevenir colonização renal.

Outras proteínas têm sido avaliadas na busca de novos candidatos vacinais eficazes contra esta doença, como por exemplo, a proteína LipL32 (proteína mais abundante das leptospiros patogênicas e intermediárias) e outras proteínas de membrana externa (HUMPHRYES et al., 2014; ADLER, 2015). Os candidatos vacinais mais destacados e promissores até o momento têm sido as lipoproteínas Ligs: LigA e LigB.

No Quadro 6, encontram-se resumidos os desenhos experimentais e resultados dos trabalhos mais relevantes testando estas proteínas. Podem ser observadas a variedade de formulações, as estratégias e os tipos de vacinas que têm sido testadas tendo as proteínas Ligs como antígeno principal, assim como a variedade de resultados obtidos. Como pontos em comum dentre estes trabalhos podem ser ressaltadas as técnicas de avaliação utilizadas muito similares. A grande maioria dos trabalhos fez uso do ELISA para avaliar resposta imunológica; cultura e/ou qPCR para avaliar a colonização renal. Cabe destacar que os trabalhos de Conrad et al. (2017) e Oliveira et al. (2019) foram os únicos que até o momento conseguiram mostrar ausência de leptospiros nos rins, por qPCR, de animais vacinados com as proteínas LigB e LigA, respectivamente.

Quadro 6 – Estudos mais relevantes utilizando as proteínas Ligs de leptospiros patogênicos como candidatos vacinais, ordenados cronologicamente.

Antígeno utilizado	Dose do antígeno	Adjuvante	Técnicas para avaliação	Conclusões	Referência
LigANI, LigBrep e LigBNI.	10 – 80 ug	Adjuvante completo de Freund	1) ELISA 2) Cultura 3) Análise histopatológica	LigANI conferiu 67-100% proteção contra a morte; LigBNI e LigBrep não conferiram proteção contra a morte.	(SILVA et al., 2007)
LigA (diferentes domínios)	100 ug	Adjuvante de Freund	1) ELISA 2) MAT 3) Análise histopatológica 4) Perfil renal bioquímico. 5) qPCR	Domínios 11 e 12 de LigA são necessários para conferir 100% proteção contra a morte. Não houve imunidade esterilizante.	(COUTINHO et al., 2011)
Proteínas de membrana externa (OMP) mais LigAC (nucleotídeos 1891-3675)	20 ug de cada proteína; 50 ug de LigAC	Hidróxido de Alumínio e Flagelina	1) ELISA 2) Cultura	Formulações com LigAC conferiram 100% de proteção; Adjuvante flagelina reduziu colonização renal em 72%.	(MONARIS et al., 2015)
LigBrep (DNA prime – protein boost)	100 ug	Hidróxido de alumínio	1) ELISA 2) Cultura 3) Análise histopatológica	Proteção de 83% contra a morte; culturas de rins negativas.	(FORSTER et al., 2015)
LigANI	50 ug	Nanopartículas, CpG-ODN ou Hidróxido de alumínio	1) ELISA (isotipos IgG).	Aumento de resposta humoral nas formulações com as moléculas transportadoras.	(OLIVEIRA et al., 2016)
LigBN (domínio 1- 7) e LigAC (domínios 7-13)	100 ug	Adjuvante completo de Freund	1) ELISA 2) MAT 3) Cultura 4) qPCR 5) Immunoblot	LigAC conferiu proteção contra a morte.	(EVANGELISTA et al., 2017)
LigBrep ou rLigB	20-100 ug	Hidróxido de alumínio	1) ELISA (isotipos IgG). 2) Análise histopatológica 3) Cultura 4) qPCR	Houve imunidade esterilizante (ausência de leptospiros nos rins dos animais)	(CONRAD et al., 2017)
Quimera de proteínas recombinantes LigA e LigB	50 ug	Hidróxido de alumínio; Montanide ISA 50 adjuvante oleoso	1) ELISA (isotipos IgG). 2) Análise histopatológica 3) qPCR	Proteção contra a morte.	(DA CUNHA et al., 2019)
Cepas de rBCG expressando quimeras de LipL32, LemA, LigA e LigB	10 ⁶ CFU	-	1) ELISA 2) Cultura 3) qPCR	Quimera LipL32, LemA e LigA conferiu proteção contra a morte e imunidade esterilizante.	(OLIVEIRA et al., 2019)

Ensaio prévios mostraram que a proteína LigAC foi eficaz na prevenção da morte por leptospirose (MONARIS et al., 2015), por isso resolveu-se usar esta proteína nas formulações vacinais testadas neste trabalho. A segunda proteína incluída neste estudo foi a proteína LcpA, caracterizada por BARBOSA et al. (2010), proteína presente e conservada nas espécies patogênicas de leptospiros; diferente de LigAC que só se encontra em duas espécies patogênicas. Além de testar estas proteínas e com a finalidade de torná-las mais imunogênicas, as mesmas foram fusionadas ao domínio ZZ da proteína A de *S. aureus* e ao domínio R da toxina diftérica (DTR), domínios que aumentariam a capacidade de captura e apresentação antigênica, melhorando assim a resposta imune às vacinas por parte do hospedeiro. Além disso, as proteínas fusionadas foram testadas nos desafios na presença de três adjuvantes, também para aumentar a imunogenicidade.

Foram realizados quatro ensaios de imunoproteção. O primeiro ensaio visou a avaliar a ação das proteínas LigAC e LcpA, fusionadas e não fusionadas aos domínios, tanto separadas (uma proteína por vacina) ou juntas (as duas proteínas na mesma vacina). O segundo ensaio focou na ação da proteína LcpA fusionada e seu possível potencial na proteção heteróloga contra a leptospirose. O terceiro ensaio focou em três pontos, o primeiro foi a dose do antígeno da proteína LigAC, o segundo foi na ação da proteína LcpA fusionada sem adjuvantes, e o terceiro foi na ação da combinação das proteínas fusionadas – ZZ-LigAC-DTR + ZZ-LcpA-DTR. O quarto ensaio foi a repetição do terceiro, já que este último não conseguiu ser validado por ter apresentado baixa mortalidade no grupo controle.

Os resultados de sobrevivência mostraram-se incongruentes entre os desafios realizados. Segundo a CFR 113.101 (U.S. GOVERNMENT PUBLISHING OFFICE, 2012), uma vacina é considerada aprovada se a taxa de mortalidade no grupo controle, após o desafio com estirpes virulentas contendo 10 a 10.000 X DL50, for igual ou maior que 80%. No primeiro e segundo ensaio essa norma cumpriu-se, uma vez que de 80-90% dos animais pertencentes aos grupos controles morreram após o desafio com ~1000 X DL50 das estirpes bacterianas virulentas. No terceiro e quarto ensaio o efeito foi outro, visto que de 60-80% dos animais do grupo controle sobreviveram após o desafio com a estirpe virulenta L1-130, estirpe previamente testada no primeiro ensaio. Inicialmente, atribuiu-se o fracasso da mortalidade do grupo controle PBS do terceiro desafio ao fato de ter desafiado os animais com uma cultura de leptospiros diluídas 1:2. Esta diluição

ocorreu em função do cálculo da DL50 e da concentração de leptospiras das culturas (dados não mostrados). Já que os valores de DL50 das culturas utilizadas nos ensaios foram muito próximos, foi utilizado o mesmo número de leptospiras dos experimentos anteriores (2×10^5 leptospiras/dose). Assim, houve a necessidade de diluir a cultura utilizada que estava mais concentrada, o que pode ter resultado em menor virulência. No quarto ensaio, o desafio foi feito com a cultura não diluída, porém o grupo controle PBS tampouco conseguiu atingir a taxa de mortalidade de 80%. Por consequência, podemos concluir que outros fatores, além da virulência das estirpes de leptospira, estão influenciando a apresentação da doença no modelo animal hamster.

As hipóteses levantadas incluem as condições ambientais particulares deste trabalho, já que além de não contar com um biotério climatizado para garantir uma temperatura padrão em todos os desafios, a partir do terceiro desafio utilizou-se um biotério diferente do utilizado nos desafios anteriores. Outra hipótese levantada é a perda da susceptibilidade da linhagem de hamsters trabalhada como modelo animal de leptospirose; sugerindo que mesmo que os animais adoeçam após o desafio (critérios *endpoint* apresentados), eles não morrem devido ao desenvolvimento de algum tipo de resistência à mortalidade. Estudos futuros com outras linhagens de hamsters ou outro modelo animal, como gerbils ou cobaias, ajudarão a esclarecer melhor esta questão.

A respeito dos resultados obtidos nos dois primeiros ensaios, concluiu-se que as formulações vacinais que continham a proteína LigAC fusionada ou não fusionada conferiram proteção contra a morte por leptospirose em 100% dos animais. Este resultado está de acordo com outros trabalhos que avaliaram a porção C-terminal da proteína LigA como candidato vacinal (Quadro 6). Por outro lado, na avaliação da colonização renal observou-se que nenhuma das construções vacinais foi capaz de conferir imunidade esterilizante; dado discordante com o de Oliveira et al. (2019), cuja quimera com LigA (domínio 11-13), LipL32 e LemA preveniu a colonização renal. Cabe destacar que a diferença entre as composições dessas vacinas não permite uma comparação objetiva entre os dados gerados por elas.

Na avaliação da proteína LcpA os resultados foram diferentes dos obtidos com a proteína LigAC. No primeiro ensaio, houve uma diferença significativa entre a proteção por LcpA e por LcpA fusionada, sendo que a primeira conferiu proteção

contra a morte em apenas 60% dos animais, e a segunda conferiu 100% de proteção. No desafio heterólogo (segundo desafio), a proteína LcpA fusionada conferiu proteção heteróloga parcial. Esta última informação é bastante importante, dado que até o momento não existe relato de proteção heteróloga contra a leptospirose, conferida por uma vacina recombinante. Na avaliação do estado de portador renal nos grupos imunizados com LcpA, todos os animais vacinados foram positivos para colonização renal. Cabe ressaltar que no primeiro desafio a carga bacteriana nos rins dos animais vacinados com LcpA e fusão foi menor do que 10^3 equivalentes genômicos por grama de tecido, muito menor do que no grupo controle (10^8 EqG/ grama de tecido).

No primeiro ensaio foi determinada a ação conjunta de três adjuvantes: o anti-MHC II, CpG-ODN e hidróxido de alumínio. O objetivo do uso dos adjuvantes foi avaliar o aprimoramento da resposta imune por parte do hospedeiro no combate contra a leptospirose, estimulando resposta imune (REED; ORR; FOX, 2013). Os resultados do primeiro ensaio não foram encorajadores para prosseguir com o uso do anti-MHC II ou do CpG-ODN, já que realizando uma comparação com trabalhos anteriores com a proteína LigAC (dados não mostrados), não houve diferença nem na proteção conferida pela vacina nem na colonização renal apresentada. Contudo, trabalhos recentes sugerem uma participação potencial inversamente proporcional da interleucina IL-10 e do IFN- γ na colonização renal. Por isso, novos adjuvantes que direcionem uma resposta Th1 com produção apropriada de IFN- γ poderiam ser testados em trabalhos futuros (VERNEL-PAUILLAC; WERTS, 2018).

Em muitos casos, um critério racional para a modulação da resposta imune contra leptospirose é difícil de ser alcançado, visto que ainda é pouco conhecido o tipo de resposta protetora associada à doença. Até o momento não existe informação publicada que defina correlatos de proteção entre títulos de anticorpos e proteção contra a morte induzida por vacinas de subunidade. É conhecido que o hamster, modelo animal da infecção, produz anticorpos IgM e IgG, com produção dos isotipos IgG1, IgG2 e IgG3, apesar de que nem todas as linhagens produzem IgG3 (COE; SCHELL; ROSS, 1995). Tendo ciência destas informações, resolveu-se avaliar a resposta imune humoral do tipo IgG e seus isotipos, induzida por nossas formulações vacinais.

A resposta imune aos isotipos IgGs está associada com o tipo de antígeno utilizado. Na literatura, relata-se que em humanos e em camundongos IgG1 é

induzido por proteínas solúveis e proteínas de membrana; enquanto que IgG2 é induzido quase exclusivamente por polissacarídeos capsulares; e IgG3 é estimulado por infecções virais, sendo efetivos na indução de funções efetoras, apresentando-se como um potente anticorpo pró-inflamatório. Adicionalmente, títulos altos de anticorpos IgG1 normalmente são acompanhados de níveis baixos de IgG3 (VIDARSSON; DEKKERS; RISPENS, 2014). No presente trabalho, o objetivo de avaliar a resposta dos isotipos de IgG de caracterizar o tipo de resposta Th induzida por nossas formulações vacinais, para tal a avaliação do IgG1 corresponderia a uma resposta tipo Th2, a avaliação do IgG2/3 a uma resposta Th1 e de proteção contra organismos intracelulares, e a avaliação de IgG3 a uma resposta quase exclusiva Th1.

Os resultados dos ensaios de imunoproteção realizados sugeriram que não houve uma correlação clara entre níveis de anticorpos produzidos e proteção contra a morte e colonização renal nos grupos vacinados. Esta falta de correlação é uma constante nos trabalhos que avaliam antígenos vacinais para a leptospirose (Quadro 6). No primeiro ensaio os níveis de anticorpos IgG total tiveram um aumento significativo para as proteínas LigAC e LcpA, com exceção do grupo vacinado com ZZ-LcpA-DTR, grupo teve a carga bacteriana reduzida de 10^8 para 10^3 equivalentes genômicos por grama de tecido renal. Na avaliação dos isotipos, observou-se para LigAC uma resposta predominante de IgG1 e IgG2, sem resposta humoral por parte do isotipo IgG3; enquanto para LcpA só foi estimulado o isotipo IgG2/3, visto que o isotipo IgG3 não foi estimulado concluiu-se que a resposta ao isotipo IgG2/3 dependia exclusivamente de anticorpos do tipo IgG2.

No segundo ensaio, os níveis de IgG total tiveram um aumento significativo e constante em todos os grupos vacinados. Quando avaliando os isotipos, determinou-se que os três foram estimulados, quase na mesma medida, sem mostrar uma diferença significativa entre a proteína LcpA fusionada e sem fusões. Estes resultados são inesperados, pois a presença dos domínios ZZ e DTR não estimulou um aumento no nível de anticorpos nos animais imunizados. Dos resultados apresentados pode ser sugerido que uma resposta humoral do tipo IgG1 para LcpA pode ser necessária para evitar a colonização renal, sendo que nossas formulações não foram capazes de induzir este tipo de resposta. Porém, os resultados imunológicos são difíceis de interpretar no modelo animal hamster, já que os mecanismos de resposta imune nestes animais são pouco conhecidos.

Por outro lado, o terceiro e quarto ensaio não foram validados, mas foi possível a avaliação da resposta imune humoral para as formulações vacinais e o estado de portador renal nos animais sobreviventes após o desafio. Os resultados da resposta humoral para LigAC nos ensaios não foram tão diferentes dos ensaios validados, confirmando a imunogenicidade já relatada desta proteína (Quadro 6). Da mesma forma, a resposta aos isotipos para IgG1 e IgG2 foi semelhante à dos outros ensaios. Os resultados da resposta humoral da LcpA no quarto ensaio mostraram que entre a proteína ZZ-LcpA-DTR com e sem alumínio não houve diferença nos níveis de anticorpos IgG, resultado que é compatível com o trabalho de Léonetti et al. (1998), onde a presença ou ausência do adjuvante na formulação vacinal não interferiu na imunogenicidade da construção vacinal. A resposta aos isotipos foi predominantemente contra IgG2, sugerindo mais uma vez uma resposta imune do tipo Th1, a mesma que mostrou um aumento significativo para a proteína ZZ-LcpA-DTR com alumínio e para o grupo vacinal ZZ-LigAC-DTR + ZZ-LcpA-DTR quando comparado ao grupo controle PBS. Nas análises de colonização renal, os únicos grupos que tiveram uma redução significativa da colonização renal foram os grupos vacinados com ZZ-LcpA-DTR sem alumínio e com ZZ-LigAC-DTR + ZZ-LcpA-DTR.

6. CONCLUSÕES

- As proteínas recombinantes LigAC, ZZ-LigAC-DTR, ZZ-DTR-LigAC, LcpA e ZZ-LcpA-DTR foram expressas e purificadas com eficiência, mantendo a estrutura secundária ordenada após o processo de purificação.
- Não houve diferença entre as formulações vacinais contendo os adjuvantes Alum, CpG-ODN e o anticorpo monoclonal anti-MHC II (clone 14.4.4S) e as formulações vacinais contendo apenas o adjuvante Alum.
- As formulações vacinais contendo a proteína LigAC fusionada ou não fusionada aos domínios conferiram proteção total contra morte por leptospirose, porém não conferiram imunidade esterilizante (prevenção da colonização renal), apesar dos altos títulos de anticorpos IgG1 e IgG2 direcionados a esta proteína.
- As formulações vacinais contendo a proteína LcpA fusionada aos domínios conferiram proteção total dos animais no desafio homólogo e proteção parcial no desafio heterólogo, com estímulo de produção de anticorpos quase exclusiva para o isotipo IgG2. Dado preliminar de proteção heteróloga ressalta um potencial papel da LcpA como antígeno para uma vacina universal.
- As formulações vacinais contendo a proteína LcpA fusionada aos domínios não preveniram a colonização renal pelas leptospiras, mas a formulação vacinal ZZ-LcpA-DTR mais Alum diminuiu significativamente a carga bacteriana de leptospiras nos rins dos animais infectados.
- Sugere-se testar como composição vacinal uma formulação contendo as proteínas LigAC (mais antigénica e presente em apenas duas espécies patogénicas) e LcpA (menos antigénica, porém presente em pelo menos 10 espécies patogénicas), fusionadas aos domínios ZZ e DTR, mais a presença

de um “novo” adjuvante; tendo como objetivo atingir imunidade esterilizante nos animais avaliados.

- Estudos mais aprofundados precisam ser realizados com o propósito de entender o papel da resposta imune humoral IgG e isotipos, na proteção contra a morte por leptospirose e na prevenção da colonização renal.

REFERENCIAS

- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Leptospirosis. In: **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. Washington, USA: Pan American Health Organization, 2003. p. 175–186.
- ADLER, B. Pathogenesis of leptospirosis: cellular and molecular aspects. **Veterinary microbiology**, v. 172, n. 3–4, p. 353–358, 27 ago. 2014.
- ADLER, B. Vaccines against leptospirosis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 387, p. 251–272, 2015.
- ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary microbiology**, v. 140, n. 3–4, p. 287–296, 27 jan. 2010.
- AHMAD, S. N.; SHAH, S.; AHMAD, F. M. Laboratory diagnosis of leptospirosis. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 51, n. 3, p. 195–200, jan. 2005.
- ANDRÉ-FONTAINE, G. Canine leptospirosis--do we have a problem? **Veterinary Microbiology**, v. 117, n. 1, p. 19–24, 5 out. 2006.
- BAJANI, M. D. et al. Evaluation of Four Commercially Available Rapid Serologic Tests for Diagnosis of Leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 803–809, 2003.
- BARBOSA, A. et al. Immune evasion of *Leptospira* spp. by acquisition of human complement regulator C4BP. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 3, p. 1137–1143, 2009.
- BARBOSA, A. S. et al. Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of *Leptospira* spp. that binds the human complement regulator C4BP. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 7, p. 3207–3216, 2010.
- BHARTI, A. R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet infectious diseases**, v. 3, n. 12, p. 757–771, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Saúde. **Casos confirmados e óbitos de leptospirose**. Brasília: Ministério da Saúde, 2019.
- BUTCHER, B. A. et al. Heparin enhances the interaction of infective *Leishmania donovani* promastigotes with mouse peritoneal macrophages. A fluorescence flow cytometric analysis. **The Journal of Immunology**, v. 148, n. 9, p. 2879–2886, 1992.
- CERQUEIRA, G. M.; PICARDEAU, M. A century of *Leptospira* strain typing. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 5, p. 760–768, 2009.
- CHOE, S. et al. The crystal structure of diphtheria toxin. **Nature**, v. 357, n. 6375, p. 216–222, 1992.
- COE, J. E.; SCHELL, R. F.; ROSS, M. J. Immune response in the hamster: definition of a novel IgG not expressed in all hamster strains. **Immunology**, v. 86, p. 141–148, 1995.
- CONRAD, N. L. et al. LigB subunit vaccine confers sterile immunity against challenge in the hamster model of leptospirosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 3, p. 1–20, 2017.
- COSTA, F. et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, p. 1–19, 2015.
- COUTINHO, M. L. et al. A ligA three-domain region protects hamsters from lethal infection by leptospira interrogans. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 12, p. 1–10, 2011.
- DA CUNHA, C. E. P. et al. Evaluation of different strategies to promote a protective immune response against leptospirosis using a recombinant LigA and LigB chimera. **Vaccine**, v. 37, n. 13, p. 1844–1852, 2019.

- DELLAGOSTIN, O. A. et al. Reverse vaccinology: An approach for identifying leptospiral vaccine candidates. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1, p. 1–16, 2017.
- DELLAGOSTIN, O. a et al. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Human vaccines**, v. 7, n. 11, p. 1215–24, nov. 2011.
- DIB, C. C. et al. Cross-protection between experimental anti-leptospirosis bacterins. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 1083–1088, 2014.
- DREYFUS, A. et al. Risk factors for new infection with *Leptospira* in meat workers in New Zealand. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 72, p. 219–225, 2014.
- DUPOUEY, J. et al. Human leptospirosis: an emerging risk in Europe? **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 37, n. 2, p. 77–83, 2014.
- ELLIS, W. Animal Leptospirosis. In: **Leptospira and Leptospirosis**. [s.l.] Springer, 2015. p. 295.
- EVANGELISTA, K. V. et al. Immunoprotective properties of recombinant LigA and LigB in a hamster model of acute leptospirosis. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, p. 1–21, 2017.
- EVANGELISTA, K. V; COBURN, J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future Microbiology**, v. 5, p. 1413–1425, 2010.
- FAINE, S. et al. **Leptospira and Leptospirosis**. Second ed. Melbourne: Medisci, 1999.
- FAISAL, S. M. et al. Evaluation of protective immunity of *Leptospira* immunoglobulin like protein A (LigA) DNA vaccine against challenge in hamsters. **Vaccine**, v. 26, n. 2, p. 277–287, 2008.
- FÁVERO, J. F. et al. Immune response of a commercial vaccine against *Leptospira interrogans*: Antibodies and cytokine levels. **Microbial Pathogenesis**, v. 114, n. September 2017, p. 46–49, 2018.
- FELIX, S. R. et al. Leptospirosis Vaccine: Search for Subunit Candidates. **Procedia in Vaccinology**, v. 1, n. 1, p. 110–114, 2009.
- FORSTER, K. M. et al. DNA prime-protein boost based vaccination with a conserved region of leptospiral immunoglobulin-like A and B proteins enhances protection against leptospirosis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 8, p. 989–995, 2015.
- GOARANT, C. Leptospirosis: risk factors and management challenges in developing countries. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. Volume 7, p. 49–62, 2016.
- GOLDSTEIN, R. E. Canine leptospirosis. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 40, n. 6, p. 1091–101, nov. 2010.
- GOUVEIA, E. L. et al. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. 505–508, 2008.
- HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. *Leptospira*: A Spirochete with a Hybrid Outer Membrane. **Molecular Microbiology**, v. 77, n. 4, p. 805–814, 2010.
- HAMOND, C. et al. The role of leptospirosis in reproductive disorders in horses. **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, n. 1, p. 1–10, 2014a.
- HAMOND, C. et al. Predominance of *Leptospira interrogans* serovar Bratislava DNA in vaginal fluid of mares suggests sexual transmission of leptospirosis. **Animal Reproduction Science**, v. 151, n. 3–4, p. 275–279, 2014b.
- HEINEMANN, M. B. et al. Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. **Veterinary Microbiology**, v. 73, n. 4, p. 261–267, 2000.

HUMPHRYES, P. C. et al. Vaccination with Leptospiral Outer Membrane Lipoprotein LipL32 Reduces Kidney Invasion of *Leptospira interrogans* Serovar Canicola in Hamsters. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 21, n. 4, p. 546–551, 2014.

IWAMOTO, R. et al. Heparin-binding EGF-like growth factor, which acts as the diphtheria toxin receptor, forms a complex with membrane protein DRAP27/CD9, which up-regulates functional receptors and diphtheria toxin sensitivity. **The EMBO journal**, v. 13, n. 10, p. 2322–30, 1994.

JANWITTHAYANAN, W. et al. In vivo gene expression and immunoreactivity of *Leptospira* collagenase. **Microbiological Research**, v. 168, n. 5, p. 268–272, 2013.

JOBBS, S. E.; ALEXANDER, K. A. Evidence of *Leptospira* sp. infection among a diversity of African wildlife species: Beyond the usual suspects. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 109, n. 5, p. 349–351, 2015.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Proteins and Proteomics**, v. 1751, n. 2, p. 119–139, 2005.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospirosis vaccines: past, present, and future. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 51, n. 3, p. 210, 2005.

LÉONETTI, M. et al. Increasing immunogenicity of antigens fused to Ig-binding proteins by cell surface targeting. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 160, n. 8, p. 3820–7, 1998.

LÉONETTI, M.; GADZINSKI, A.; MOINE, G. Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans Influence MHC Class II-Restricted Antigen Presentation. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 7, p. 3847–3856, 2010.

LEVETT, P. N. Leptospirosis: A forgotten zoonosis? **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 4, n. 6, p. 435–448, 2004.

LEVETT, P. N.; HAAKE, D. A. *Leptospira* Species (Leptospirosis). In: **Principles and practice of infectious diseases**. Seventh ed. Philadelphia, USA: El Sevier, 2010. 2p. 3059–3065.

LILENBAUM, W. et al. Detection of *Leptospira* spp. in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 837–842, 2008.

LOBECK, K. et al. Towards a recombinant vaccine against diphtheria toxin. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 2, p. 418–423, 1998.

LOWENADLER, B. et al. Enhanced immunogenicity of recombinant peptide fusions containing multiple copies of a heterologous T helper epitope. **European Journal of Immunology**, v. 20, n. 7, p. 1541–1545, 1990.

LOWENADLER, B. et al. T and B cell responses to chimeric proteins containing heterologous T helper epitopes inserted at different positions. **Journal of Molecular Immunology**, v. 29, n. 10, p. 1185–1190, 1992.

MARTINS, G.; LILENBAUM, W. Control of bovine leptospirosis: Aspects for consideration in a tropical environment. **Research in Veterinary Science**, v. 112, p. 156–160, 2017.

MARTINS, G.; OLIVEIRA, C. S.; LILENBAUM, W. Dynamics of humoral response in naturally-infected cattle after vaccination against leptospirosis. **Acta Tropica**, v. 187, p. 87–91, 2018.

MATSUNAGA, J. et al. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Molecular Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 929–945, 2003.

MCBRIDE, A. J. A. et al. Genetic diversity of the Leptospiral immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic *Leptospira* spp. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 2, p. 196–205, 2009.

MONARIS, D. et al. Protective Immunity and Reduced Renal Colonization Induced by Vaccines Containing Recombinant *Leptospira interrogans* Outer Membrane Proteins and Flagellin Adjuvant. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 22, n. 8, p. 965–973, 2015.

- MURRAY, G. L. et al. Heterologous protection elicited by a live, attenuated, *Leptospira* vaccine. **Veterinary Microbiology**, v. 223, n. July, p. 47–50, 2018.
- MUSSO, D.; LA SCOLA, B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 46, n. 4, p. 245–252, 2013.
- NAIMAN, B. M. et al. Protective Killed *Leptospira borgpetersenii* Vaccine Induces Potent Th1 Immunity Comprising Responses by CD4 and T Lymphocytes. **Infection and immunity**, v. 69, n. 12, p. 7550–7558, 2001.
- O'HAGAN, D. et al. Towards an evidence based approach for the development of adjuvanted vaccines. **Current Opinion in Immunology**, v. 47, p. 93–102, 2017.
- OIE. Leptospirosis. In: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees)**. Seventh ed. Paris, FR: World Organisation for Animal Health (OIE), 2014. p. 1–15.
- OLIVEIRA, T. L. et al. Evaluation of the leptospira interrogans outer membrane protein OmpL37 as a vaccine candidate. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1–13, 2015.
- OLIVEIRA, T. L. et al. Immune response in hamsters immunised with a recombinant fragment of LigA from *Leptospira interrogans*, associated with carrier molecules. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 11, p. 712–716, 2016.
- OLIVEIRA, T. L. et al. Recombinant BCG strains expressing chimeric proteins derived from *Leptospira* protect hamsters against leptospirosis. **Vaccine**, v. 37, p. 776–782, 2019.
- OZATO, K. et al. Hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies to mouse H-2 and Ia antigens. **The Journal of Immunology**, v. 124, n. 2, p. 533–540, 1980.
- PALANIAPPAN, R. U. M. et al. Cloning and Molecular Characterization of an Immunogenic LigA Protein of *Leptospira interrogans* Cloning and Molecular Characterization of an Immunogenic LigA Protein of *Leptospira interrogans*. **Infection and immunity**, v. 70, n. 11, p. 5924–5930, 2002.
- PAPPAS, G. et al. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. **International journal of infectious diseases**, v. 12, n. 4, p. 351–357, jul. 2008.
- PATEL, M. et al. Cell-surface heparan sulfate proteoglycan mediates HIV-1 infection of T-cell lines. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 9, n. 2, p. 167–174, 1993.
- PICARDEAU, M. Diagnosis and Epidemiology of leptospirosis. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 43, p. 1–9, 2013.
- PICARDEAU, M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 297–307, 2017.
- PTAK, C. P. et al. NMR solution structure of the terminal immunoglobulin-like domain from the leptospira host-interacting outer membrane protein, LigB. **Biochemistry**, v. 53, n. 32, p. 5249–5260, 2014.
- REED, S. G.; ORR, M. T.; FOX, C. B. Key roles of adjuvants in modern vaccines. **Nature Medicine**, v. 19, n. 12, p. 1597–1608, 2013.
- RISTOW, P. et al. The OmpA-Like Protein Loa22 Is Essential for Leptospiral Virulence. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 7, p. e97, 2007.
- SAITO, M. et al. *Leptospira idonii* sp. nov., isolated from environmental water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 2457–2462, 2013.
- SAMBASIVA, R. R. et al. Leptospirosis in India and the rest of the world. **The Brazilian journal of Infectious Diseases**, v. 7, n. 3, p. 178–193, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**. Second ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SHI, S. et al. Vaccine adjuvants: Understanding the structure and mechanism of adjuvanticity. **Vaccine**, v. 37, n. 24, p. 3167–3178, 2019.

SILVA, E. F. et al. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, v. 25, n. 33, p. 6277–6286, 2007.

SILVEIRA, M. M. et al. DNA vaccines against leptospirosis: A literature review. **Vaccine**, v. 35, n. 42, p. 5559–5567, 2017.

STODDARD, R. A. et al. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 64, p. 247–255, 2009.

TASHIRO, M. et al. High-resolution solution NMR structure of the Z domain of staphylococcal protein A. **Journal of Molecular Biology**, v. 272, p. 573–590, 1997.

TORGERSON, P. R. et al. Global Burden of Leptospirosis: Estimated in Terms of Disability Adjusted Life Years. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, p. 1–14, 2015.

U.S. GOVERNMENT PUBLISHING OFFICE. Title 9 - Animals and Animal Products:1-4. In: **Code of Federal Regulations**. Washington, USA: Office of the Federal Register National Archives and Records Administration, 2012. p. 1071.

VERMA, A.; STEVENSON, B.; ADLER, B. Leptospirosis in horses. **Veterinary Microbiology**, v. 167, n. 1–2, p. 61–66, 2013.

VERNEL-PAUILLAC, F.; WERTS, C. Recent findings related to immune responses against leptospirosis and novel strategies to prevent infection. **Microbes and Infection**, p. 1–11, 2018.

VIDARSSON, G.; DEKKERS, G.; RISPENS, T. IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 1–17, 2014.

VINCENT, A. T. et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 5, p. e0007270, 2019.

VINETZ, J. M. Leptospirosis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 14, n. 5, p. 527–538, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control**. [s.l.] World Health Organization, 2003.

YAN, W. et al. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Leptospira* immunoglobulin-like protein B (rLigB) in a hamster challenge model. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 2, p. 230–237, 2009.

ZHAO, Y. et al. Multi-antigen immunization using IgG binding domain ZZ as carrier. **Vaccine**, v. 23, n. 43, p. 5082–5090, 2005.