

REBECA CORDELLINI EMÍDIO

Produção, purificação e modificação das adesinas de superfície recombinantes de *Leptospira interrogans* Lsa63 e Lsa45 e conjugação da Lsa63 com o lipopolissacarídeo de *Leptospira biflexa*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Giovana Cappio Barazzone

Versão original.

São Paulo

2020

RESUMO

EMÍDIO, R. C. **Produção, purificação e modificação das adesinas de superfície recombinantes de *Leptospira interrogans* Lsa63 e Lsa45 e conjugação da Lsa63 com o lipopolissacarídeo de *Leptospira biflexa*.** 2020. 130f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A leptospirose é uma zoonose mundialmente disseminada causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* spp, cuja diversidade antigênica está associada ao lipopolissacarídeo de sua superfície. Adesinas de superfície de leptospiros patogênicas como as proteínas Lsa63 e Lsa45 são capazes de induzir resposta humoral em camundongos e ligarem-se a componentes de matriz extracelular facilitando a infecção pela bactéria. Atualmente, vacinas para leptospirose são compostas de bacterinas e se baseiam na proteção via indução de anticorpos contra lipopolissacarídeo. Elas não são capazes de gerar memória imunológica e são específicas contra sorovares presentes na formulação. No Brasil, não existe nenhuma vacina licenciada para uso humano contra a doença. Estudos demonstram aumento da imunogenicidade contra LPS de *Leptospira* patogênicas quando conjugado aos toxóides diftérico e tetânico, e também indicam a presença de antígenos comuns ou extremamente conservados entre esses LPS e a molécula proveniente de *L. biflexa*, saprófita. Dessa forma, esse trabalho tem por objetivo a produção, purificação e modificação das adesinas de superfície Lsa45 e Lsa63 identificadas em *L. interrogans*. A Lsa63 foi empregada na conjugação com o lipopolissacarídeo de *L. biflexa*. As melhores condições para síntese proteica foram em *Escherichia coli* utilizando sistema de expressão pET28a em frascos Tunair™ e meio ZYM-5052 a 20°C para Lsa45 e em pET101 em frascos Erlenmeyer e meio 2YTON a 30°C para Lsa63. Ambas as proteínas foram purificadas através de cromatografia de afinidade ao metal seguido de troca catiônica, com pureza final e rendimento de 92% e 29% para Lsa45 e 94% e 14% para Lsa63. Uma etapa anterior à conjugação foi a modificação das proteínas com diidrazida do ácido adípico utilizando cloreto de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolínio como ativador, resultando em um aumento de 3 vezes no conteúdo de grupos amina para a proteína Lsa45 e de 1,4 a 2 vezes para Lsa63. Apesar das dificuldades encontradas na obtenção de massa de células,

o lipopolissacarídeo de *L. biflexa* foi extraído através do método fenol-água a quente com rendimento de 0,9% após purificação. O lipopolissacarídeo de *L. biflexa* foi ativado com o tetrafluorborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridínio seguido pela conjugação com a proteína Lsa63 modificada, gerando um produto com massa molecular acima de 140 kDa. Em conjunto, nossos dados mostram o potencial de obtenção de conjugado para posterior uso em estudos imunológicos como possível candidato vacinal contra leptospirose.

Palavras-chave: *Leptospira*. Leptospirose. Proteína recombinante. Conjugação.

ABSTRACT

EMÍDIO, R. C. **Production, purification and modification of the recombinant surface adhesins from *Leptospira interrogans* Lsa63 e Lsa45 and conjugation between Lsa63 and the lipopolysaccharide from *Leptospira biflexa*.** 2020, 130f. Dissertation (Masters thesis in Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Leptospirosis is a zoonosis spread worldwide by pathogenic bacteria of the genus *Leptospira* spp, whose antigenic diversity is associated with the lipopolysaccharide (LPS) on its surface. Surface adhesins of pathogenic leptospires such as Lsa63 and Lsa45 are able to induce humoral response in mice and bind to extracellular matrix components, facilitating the infection by the bacteria. Currently, leptospirosis vaccines are composed of bacterins and are based on blockage-inducing protection against LPS. However, they are not capable of generating immune memory and are specific against serovars present in its formulation. In Brazil, there is no vaccine licensed for human use against this disease. Studies showed increased immunogenicity against pathogenic *Leptospira* LPS when conjugated to diphtheria and tetanus toxoids, and also indicate the presence of common or extremely conserved antigens among these LPS and the same saprophyte *L. biflexa* molecule. Thus, this work aims to produce, purify and modify the surface adhesins Lsa45 and Lsa63 identified in *L. interrogans*. Lsa63 was used in the conjugation with *L. biflexa*'s LPS. Best conditions for protein synthesis were achieved in *Escherichia coli* using pET28a expression system in Tunair™ flasks and ZYM-5052 medium at 20 ° C for Lsa45 and in pET101 in Erlenmeyer flasks and 2YTON medium at 30 ° C for Lsa63. Both proteins were purified by metal affinity chromatography followed by cation exchange, with final purity and yield of 92% and 29% for Lsa45 and 94% and 14% for Lsa63. A step prior to conjugation was the modification of the proteins with adipic acid dihydrazide, using 4- (4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl) -4-methylmorpholine as an activator, resulting in an increase of 3 times in the content of amine groups for Lsa45 and 1.4 to 2 times for Lsa63. Despite the difficulties detected in cell mass obtaintion, LPS of *L. biflexa* was extracted using phenol-hot water method with 0.9% yield after purification. The LPS was activated with 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium

tetrafluoroborate followed by conjugation with modified Lsa63, generating a product with molecular mass above 140 kDa. Together, our data show the conjugate obtaintion potential for further use in immunological studies as a possible vaccine candidate against leptospirosis.

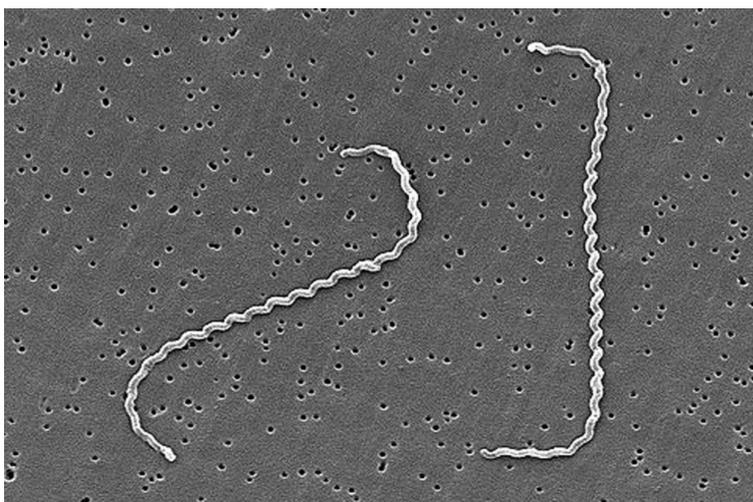
Palavras-chave: *Leptospira*. Leptospirosis. Recombinant protein. Conjugation.

1. Introdução

1.1 *Leptospira* spp.

Leptospiras são bactérias espiroquetas do gênero *Leptospira*, pertencentes à família *Leptospiraceae*, da ordem *Spirochaetales*. São bactérias finas, enroladas de forma helicoidal, com 6 a 20 μm de comprimento e cerca de 0,1 μm de diâmetro (FAINE; ADLER; BOLIN; PEROLAT, 1999a; KO; GORANT; PICARDEAU, 2009). Podem ser diferenciadas de outras espiroquetas pelo formato único de suas extremidades que se assemelham a gancho e a presença de dois flagelos periplasmáticos (Figura 1) (FAINE; ADLER; BOLIN; PEROLAT, 1999a; LEVETT, 2001; LI; MOTALEB; SAL; GOLDSTEIN *et al.*, 2000).

Figura 1: Microscopia eletrônica de varredura de *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae.

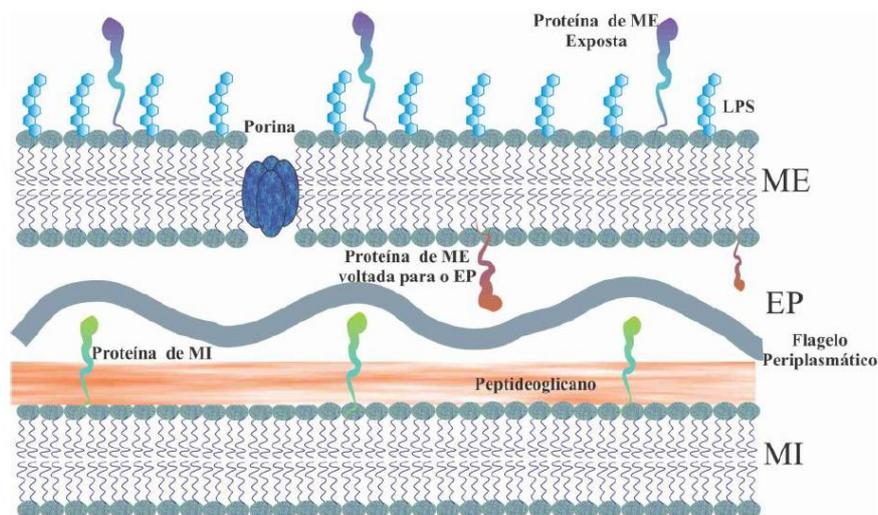


Fonte: (LEVETT, 2001)

Essas bactérias possuem uma dupla membrana, envelope celular que as classifica como Gram-negativas, sendo sua visualização comumente feita através de microscopia de campo escuro ou contraste de fase e também por coloração com sais de prata (FAINE; ADLER; BOLIN; PEROLAT, 1999a; LEVETT, 2001). Sua membrana plasmática interna é fortemente associada a uma parede celular de peptidoglicano e há presença de lipoproteínas expostas à superfície e grande quantidade de lipopolissacarídeo (LPS) em sua

membrana externa (Figura 2)(HAAKE; CHAO; ZUENER; BARNETT *et al.*, 2000; KO; GORANT; PICARDEAU, 2009; LEVETT, 2001).

Figura 2: Estrutura e composição da membrana de *Leptospira* spp.



MI: membrana interna ou citoplasmática; **EP:** espaço periplasmático; **ME:** membrana externa.
Fonte: (Fernandes, 2012).

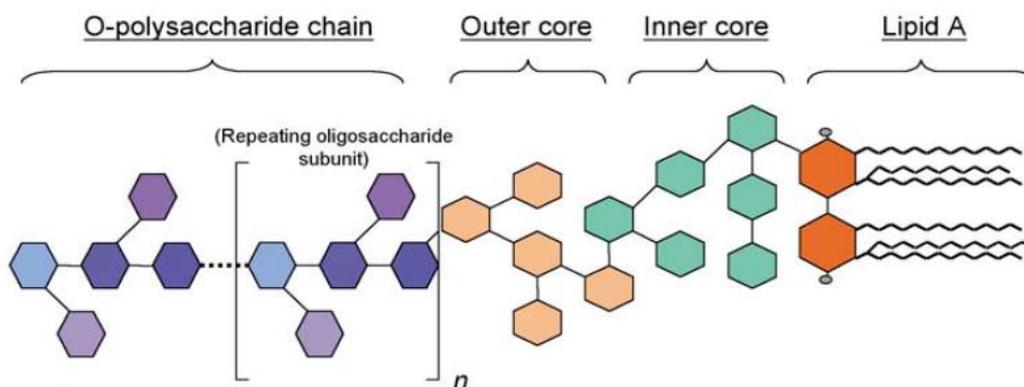
Até o momento 22 espécies de *Leptospira* foram identificadas, classificadas por taxonomia filogenética, sendo 10 espécies patogênicas, capazes de infectar e causar sintomas da leptospirose, 6 patogênicas intermediárias, causadoras de sintomas brandos, e 5 saprofíticas (BOURHY; COLLET; BRISSE; PICARDEAU, 2014; BRENNER; KAUFMANN; SUZLER; STEIGERWALT. *et al.*, 1999; KO; GORANT; PICARDEAU, 2009; SMYTHE; ADLER; HARTSKEERL; GALLOWAY *et al.*, 2013). Recentemente, Vincent e colaboradores, a partir do sequenciamento do genoma de amostras coletadas em diferentes locais no mundo, identificaram 30 novas espécies de *Leptospira*. Dessa forma, foi proposta uma reclassificação filogenética para agrupar as diferentes espécies da bactéria em quatro clados diferentes, nomeados P1, P2, S1 e S2, com P1 englobando as bactérias patogênicas, P2 as intermediárias e S1 e S2 as bactérias saprofíticas (VINCENT; SCHIETTEKATTE; GOARANT; NEELA *et al.*, 2019).

A sorologia também é utilizada como critério para classificação de diferentes leptospirosas, com mais de 300 sorovares distintos, distribuídos em 24 sorogrupos diferentes (BHARTI; NALLY; RICALDI; MATTHIAS *et al.*, 2003;

FAINE; ADLER; BOLIN; PEROLAT, 1999a; FARR, 1995; LEVETT, 2001). Sua diversidade antigênica é atribuída ao LPS, principal antígeno bacteriano e componente majoritário de sua membrana externa (ADLER; DE LA PEÑÁ-MOTECZUMA, 2010; PLANK; DEAN, 2000).

O LPS de *Leptospira*, assim como de outras bactérias Gram-negativas, é composto por três principais estruturas: o lipídeo A, região altamente hidrofóbica e responsável pela atividade endotóxica; um núcleo central (*core*), formado por um núcleo interno (*inner core*) altamente conservado e um externo (*outer core*) que contém açúcares comuns como hexoses e hexosaminas, e uma região polimérica denominada antígeno-O ou polissacarídeo-O (BULACH; KALAMBAHETI; DE LA PEÑA-MOTECZUMA; ADLER, 2000; PATRA; CHOUDHURY; MATTHIAS; BAGA *et al.*, 2015) (Figura 3). Embora a similaridade, o LPS de *Leptospira* apresenta menor toxicidade em células de camundongo quando comparado ao de *E. coli*, apresentando letalidade 12 vezes menor (FAINE; ADLER; BOLIN; PEROLAT, 1999a). É possível que isso ocorra por conta das características singulares da porção do lipídeo A do LPS de *Leptospira*, que também faz com que essa molécula, diferentemente do LPS de *E. coli* por exemplo, não seja reconhecida por receptores *Toll-like* tipo 4 (TLR4) em humanos, o que pode ser uma razão pela qual estes são hospedeiros acidentais destas bactérias (HAAKE; ZUCKERT, 2015; QUEGEWIRTH; RIBEIRO; KALB; COTTER *et al.*, 2004; WERTS; TAPPING; MATHISON; CHUANG *et al.*, 2001).

Figura 3: Estrutura genérica do LPS de bactérias Gram-negativas.



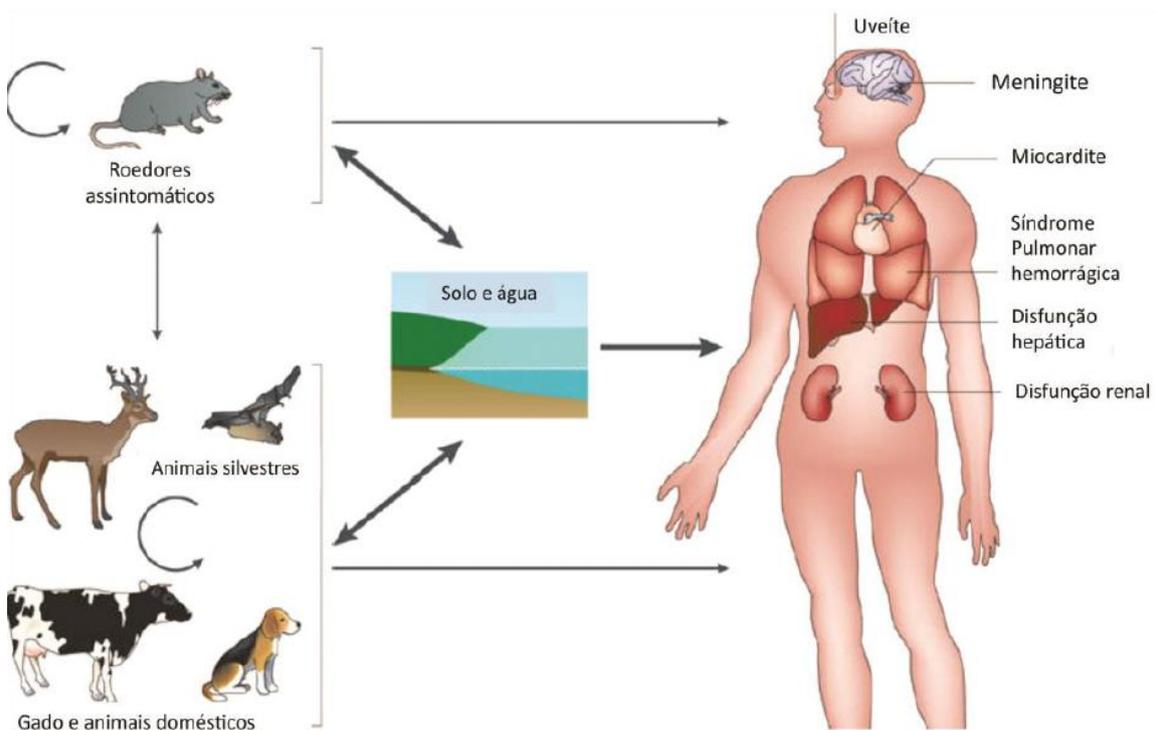
Adaptado de (ERRIDGE; BENNET-GUERRERO; POXTON, 2002).

1.2 Leptospirose

A leptospirose, primeiramente descrita como Doença de Weil em 1886 pelo pesquisador Adolf Weil (LEVETT, 2001), é uma doença infecciosa aguda emergente e negligenciada causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*. É atualmente a zoonose com maior disseminação a nível mundial, acometendo tanto humanos quanto animais, com destaque para cães, gado e porcos (ADLER; DE LA PENÃ-MOTECZUMA, 2010).

Quase todos os mamíferos podem ser carreadores de *Leptospira* e o ser humano é tido como seu hospedeiro acidental e terminal. *Leptospiras* penetram no corpo via pele com cortes e/ou abrasões ou então via mucosa, podendo a infecção de humanos ocorrer de forma direta, onde há contato com a urina de animais infectados, ou indireta, por contato com solo e/ou água contaminados (ADLER; DE LA PENÃ-MOTECZUMA, 2010; BHARTI; NALLY; RICARDI; MATTHIAS *et al.*, 2003; KO; GORANT; PICARDEAU, 2009).

Figura 4: Ciclo de transmissão da leptospirose



Roedores são os principais reservatórios de *Leptospira* e não manifestam sintomas da doença. Mamíferos excretam as bactérias via urina, contaminando água e solo. O ser humano, hospedeiro acidental, é infectado via pele ou mucosa, desenvolvendo diversos sintomas característicos da doença. Adaptado de Ko et al., 2009 por Kochi, 2018.

A incidência da leptospirose é bem maior em regiões tropicais do que em regiões temperadas, mas ocorre tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, onde pode aparecer tanto em centros urbanos como em áreas rurais (BHARTI; NALLY; RICALDI; MATTHIAS *et al.*, 2003). Enquanto a ocorrência em países desenvolvidos tem correlação com exposição ocupacional (BENSCHOP; HEUER; JAROS; COLLINS-EMERSON *et al.*, 2009), turismo ou prática de esportes aquáticos (MORGAN; BORNSTEIN; KARPATI; BRUCE *et al.*, 2002; STERN; GALLOWAY; SHADOMY; WANNEMUEHLER *et al.*, 2012), em países em desenvolvimento a relação está intimamente ligada a inundações após chuvas e falta de saneamento básico, principalmente em centros urbanos.

A prevalência tropical em centros urbanos está associada às condições climáticas, visto que um ambiente quente e úmido favorece a sobrevivência de bactérias livres durante o ciclo de transmissão, e às redes de saneamento básico deficientes, que propiciam a proliferação de roedores, principais vetores da doença, que podem excretar altas concentrações de *Leptospira* meses após a infecção (em torno de 10^7 células/mL), uma vez que são resistentes à doença e assintomáticos (BHARTI; NALLY; RICALDI; MATTHIAS *et al.*, 2003; FAINE; ADLER; BOLIN; PEROLAT, 1999a; KO; GORANT; PICARDEAU, 2009; REIS; RIBEIRO; FELZEMBURGH; SANTANA *et al.*, 2008).

As manifestações clínicas da leptospirose são bem variáveis, podendo depender do sorovar causador da infecção, idade, saúde e condições imunológicas do indivíduo acometido (ADLER; DE LA PENÃ-MOTECZUMA, 2010). A fase inicial da doença apresenta uma série de sintomas brandos e inespecíficos como calafrios, febre, dor de cabeça, mialgia, enjojo, vômitos e diarreia, dificultando um diagnóstico clínico inicial preciso (COSTA; HAGAN; CALCAGNO; KANE *et al.*, 2015). Cerca de 15% dos casos da doença evoluem para Síndrome de Weil, um estado severo de infecção multissistêmica que consiste em falência renal e hepática, meningite, miocardite e hemorragia, levando a morte de 4 a 50% dos indivíduos acometidos (BHARTI; NALLY;

RICALDI; MATTHIAS *et al.*, 2003; FORBES; ZOCHOWSKI; DUBREY; SIVAPRAKASAM, 2012; LEVETT, 2001). Outra manifestação na etapa seguinte da doença, ainda mais severa, é a Síndrome Pulmonar Hemorrágica, caracterizada por insuficiência respiratória aguda e hemorragia intensa nos pulmões, com taxa de mortalidade superior a 50% e morte em até 72 horas após o aparecimento dos sintomas (GASTEIGER; HOOGLAND; GATTIKER; DUVAUD *et al.*, 2005; SCHEIN, 1989).

No Brasil, a leptospirose é uma doença de notificação compulsória desde 1985. Segundo o Ministério da Saúde, a leptospirose é uma doença endêmica, tornando-se epidêmica nos períodos de chuva, principalmente em áreas urbanas. Entre 1960 e 1966 o Brasil sofreu uma intensa transformação demográfica com um grande êxodo rural em todos os estados brasileiros, levando a um aumento de 350% da população urbana, contribuindo na aparição de comunidades e conglomerados urbanos, que sofrem com a falta de estrutura de saneamento básico, contribuindo com o aumento de casos da doença (VASCONCELOS, 2012). A Tabela 1 apresenta casos e óbitos confirmados no Brasil por região nos últimos 20 anos (SAÚDE, 2018a; b; 2020a; b).

Tabela 1: Casos e óbitos confirmados de leptospirose no Brasil por região (2000-2019)

	NORTE		NORDESTE		CENTRO-OESTE		SUL		SUDESTE		BRASIL	
	Casos	Óbitos	Casos	Óbitos	Casos	Óbitos	Casos	Óbitos	Casos	Óbitos	Casos	Óbitos
2000	743	31	1.265	143	56	3	1.042	62	1.102	145	4.208	384
2001	142	14	651	83	44	9	1.649	134	1.222	196	3.708	436
2002	227	12	638	74	40	6	907	70	957	170	2.769	332
2003	248	25	514	86	52	4	1.192	80	999	158	3.005	353
2004	224	28	807	120	74	13	673	61	1.319	167	3.097	389
2005	272	50	746	102	65	5	1.088	86	1.363	165	3.534	408
2006	752	28	679	99	71	6	1.185	81	1.699	202	4.386	416
2007	245	24	569	88	34	3	1.261	73	1.223	161	3.332	349
2008	338	29	643	75	52	3	1.562	73	1.084	167	3.679	347
2009	360	32	925	85	45	3	1.096	59	1.520	166	3.946	345
2010	264	38	717	76	48	2	1.241	109	1.548	175	3.818	400
2011	497	32	920	118	28	7	1.704	104	1.818	181	4.967	442
2012	536	24	411	66	50	5	929	51	1.342	135	3.268	281
2013	944	30	531	64	69	9	1.100	82	1.506	175	4.150	360
2014	1.707	36	564	69	62	13	1.077	61	1.266	154	4.676	333
2015	1.295	37	422	69	77	10	1.586	98	960	125	4.340	339
2016	485	22	327	51	74	9	1.199	62	980	126	3.065	270
2017	510	32	471	67	55	6	1.055	45	914	121	3.005	271
2018	485	33	465	64	66	10	1.027	42	1.013	131	3.056	280
2019	457	28	568	62	66	6	1.305	56	972	128	3.368	280
TOTAL	10.731	585	12.833	1.661	1.128	132	23.878	1.489	24.807	3.148	73.377	7.015
TAXA DE MORTALIDADE (%)	5,5	12,9	11,7	6,2	12,7	9,6						

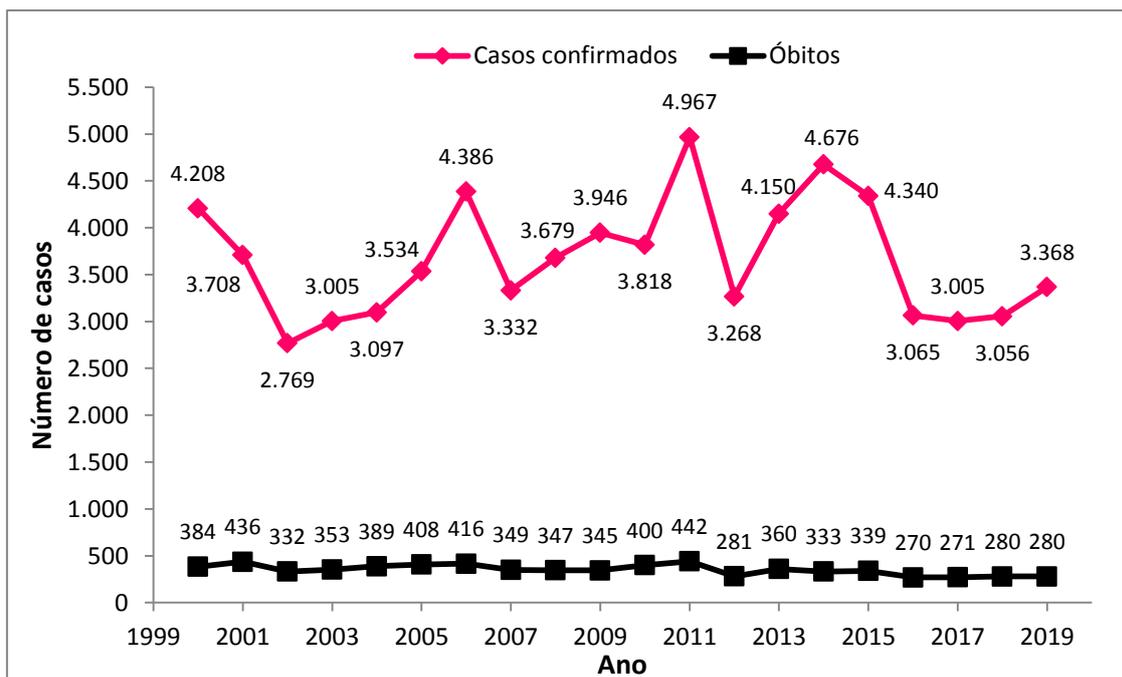
Fonte: Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), Sistema de Vigilância Sanitária (SVS), Ministério da Saúde, 2019.

No período compreendido entre os anos de 2000 e 2019, foi registrado no país um total de 73.377 casos de leptospirose em humanos no Brasil, com uma média anual de 3.669 casos e taxa de mortalidade de 9,6%. Em geral, as regiões com maior número de casos da doença são as regiões Sul e Sudeste, compreendendo pouco mais de 66% dos casos confirmados. Esse fato se dá possivelmente por conta de grande urbanização dessas regiões, uma vez que zonas urbanas são o principal ambiente de disseminação da doença por conta da alta infestação de roedores, com destaque para locais mais pobres das grandes cidades como São Paulo e Porto Alegre.

Curiosamente, a região mais rica do país é a que possui maior taxa de mortalidade relacionada à leptospirose; em contrapartida, a região Norte possui o segundo menor número de casos e a menor taxa de mortalidade do país. Isso pode ser explicado pelo fato de haver maior procura hospitalar quando surgem sintomas na região Sudeste, com um acompanhamento mais rígido do quadro da doença e um sistema de notificação mais eficiente. Já na região Norte, provavelmente ocorre uma subnotificação dos casos e, sobretudo, da morte de pacientes devido à leptospirose.

Na Figura é possível visualizar a variação anual do número de casos e óbitos no Brasil entre o período de 2000 e 2019. Apesar de observadas algumas flutuações, no geral o número de casos de leptospirose no Brasil, bem como o número de óbitos registrados, teve uma variação pequena nos últimos 20 anos, evidenciando o descaso com a doença no país e deixando a clara a necessidade de melhor estruturação dos serviços de saúde, principalmente em épocas que antecedam as chuvas, período em que há maior disseminação da enfermidade.

Figura 5: Casos e óbitos confirmados de leptospirose Brasil de 2000 a 2019



Nos casos que não culminam em óbito, a doença pode deixar graves sequelas como fadiga crônica e outros sintomas neuropsíquicos, como depressão, paralisia e mudanças repentinas de humor. Além disso, a doença pode apresentar sintomas tardios oculares devido à presença da bactéria na região (IZURIETA; GALWANKAR; CLEM, 2008). Ela também tem grande impacto econômico na pecuária, já que essas bactérias são capazes de infectar mamíferos de valor comercial agregado, como suínos, bovinos e equinos. Em bovinos, leptospirosas causam perdas econômicas elevadíssimas em decorrência de abortos, natimortalidade, decréscimo da produção leiteira, infertilidade e perda da carne (FAINE; ADLER; BOLIN; PEROLAT, 1999a; SHELDON; DOBSON, 2003).

Anualmente mais de meio milhão de casos da doença são reportados no mundo, com taxas de mortalidade excedendo 10%, representando um grande problema econômico e de saúde pública (OMS, 2013). Acredita-se que o número de casos real seja muito maior do que o estimado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), sendo possível que mais de 1 milhão de novos casos todos os anos possam ocorrer. Atribui-se essa subestimativa principalmente ao diagnóstico falho ou errôneo da doença, e também à falta de dados epidemiológicos que são falhos, quando não ausentes, em especial no continente africano. A falta de diagnóstico clínico adequado junto com ocorrência de infecções assintomáticas em áreas endêmicas acarreta na sua subnotificação, o que contribui para seu *status* de doença negligenciada (COSTA; HAGAN; CALCAGNO; KANE *et al.*, 2015).

O diagnóstico clínico da leptospirose é um tanto quanto desafiador. Devido à semelhança de seus sintomas na fase inicial às outras doenças ele se torna difícil e muitas vezes impreciso, podendo ser confundido com dengue (BRUCE; SANDERS; LEAKE; ZAIDEL *et al.*, 2005; FLANNERY; PEREIRA; VELLOSO; CARVALHO *et al.*, 2001) ou malária (CRUMP; MORRISSEY; NICHOLSON; MASSUNG *et al.*, 2013), por exemplo. Por isso, ensaios clínicos de diagnóstico geralmente são necessários para a confirmação da doença.

Atualmente o ensaio mais utilizado para diagnóstico laboratorial recomendado pela OMS é o Teste de Microaglutinação ou Aglutinação

Microscópica (MAT). Nesse teste, o soro de pacientes é incubado em diversas diluições com vários sorovares de leptospiras e analisado através de microscopia de campo escuro. Considera-se o resultado positivo para a doença quando há aglutinação de bactérias igual ou superior a 50% (CHIRATHAWORN; INWATTANA; POOVORAWAN; SUWANCHAROEN, 2014; SØRENSEN; MORTENSEN, 2005).

Apesar de altamente específico o MAT possui algumas limitações. Por basear-se na detecção de anticorpos anti-leptospira, principalmente do tipo IgG, não é possível o diagnóstico na fase inicial da doença uma vez que estes são gerados entre 5 e 7 dias após a infecção bacteriana (FARKAS; CIZOVA; BEKESOVA; BYSTRICKY, 2013). Além disso, é um teste demorado que demanda pessoal especializado e necessita da manutenção de culturas de *Leptospira* vivas de diferentes espécies e sorovares (BHARTI; NALLY; RICALDI; MATTHIAS *et al.*, 2003; PELET; PUTNAM, 2011). O isolamento de bactérias através do sangue e urina também pode ser usado no diagnóstico da leptospirose. Entretanto, leptospiras tendem a crescer vagarosamente em isolamento primário, também dificultando o diagnóstico na fase inicial (BHARTI; NALLY; RICALDI; MATTHIAS *et al.*, 2003; LEVETT, 2001). Diagnosticar essa doença em sua fase inicial é de extrema importância, pois é nessa etapa que o tratamento se mostra mais eficaz (DAVANLOO; ROSENBERG; DUNN; STUDIER, 1984; DUBENDORFF; STUDIER, 1991).

O tratamento da leptospirose é baseado na administração de antibióticos β -lactâmicos da família das penicilinas. Embora efetivo, o tratamento com antibióticos gera preocupações relacionadas ao aparecimento de resistência bacteriana, reforçando a necessidade do desenvolvimento de novos métodos de tratamento mais eficazes e também de profilaxia como, por exemplo, as vacinas.

No Brasil ainda não há vacinas licenciadas para uso humano e as preparações vacinais existentes para essa doença não são capazes de conferir uma resposta duradoura e proteção completa no indivíduo (IZURIETA; GALWANKAR; CLEM, 2008; VIJAYACHARI; SUGUNAN; SHRIRAM, 2008; YANG, 2007).

1.3 Mecanismos de patogenicidade e fatores de virulência

A patogenicidade de um microrganismo está relacionada aos mecanismos que o permitem contornar as barreiras do hospedeiro. Adesão à pele ou mucosa, invasão das células e disseminação pelos órgãos do hospedeiro, além de capacidade de evasão do sistema imune, estão entre os principais mecanismos que fazem um patógeno ser bem-sucedido (ALBERTS; WATSON; LEWIS; JOHNSON *et al.*, 2002; EHRLICH; HILLER; HU, 2008). Os mecanismos de patogenicidade de *Leptospira* ainda são pouco compreendidos e vem sendo bastante estudados. À elas, faltam fatores de virulência clássicos devido à grande distância filogenética dessas bactérias de patógenos bem caracterizados (MURRAY, 2015). Através de estudos de mutagênese em combinação com o aumento de sequências gênicas disponíveis (BOURHY; LOUVEL; SAINT GIRONS; PICARDEAU, 2005; CRODA; FIGUEIRA; WUNDER; SANTOS *et al.*, 2008), tem havido progresso na identificação e caracterização desses fatores.

1.3.1 Fatores de virulência

De forma geral, as leptospiros possuem como principal fator de virulência o LPS (MARCSISIN; BARTPHO; BULACH; SRIKRAM *et al.*, 2013; MURRAY; SRIKRAM; HENRY; HARTSKEERL *et al.*, 2010), amplamente conhecido em bactérias Gram-negativas, proteínas de membrana externa (*outer membrane proteins* – OMPs), hemolisinas e moléculas de adesão.

Em ratos e camundongos o reconhecimento do LPS de *Leptospira* ocorre normalmente, tanto via TLR2, principal receptor de moléculas polissacarídicas, quanto TLR4, conhecido como receptor de LPS, promovendo uma resposta imune efetiva, o que pode explicar a ausência de sintomas e manifestação da doença nesses animais, que são tidos somente como reservatórios. Em contrapartida, em seres humanos o reconhecimento de LPS de *Leptospira* é diferente do de outras bactérias, ocorrendo somente via TLR2 (ABBAS; LICHTMAN; PILLAL, 2016; WERTS; TAPPING; MATHISON; CHUANG *et al.*, 2001). Sugere-se que isso ocorra devido às diferenças apresentadas pelo lipídeo A do LPS dessas bactérias (QUE-GEWIRTH;

RIBEIRO; KALB; COTTER *et al.*, 2004), que fazem com que o TLR4 humano falhe em seu reconhecimento. Estudos mostram que para que haja uma resposta imune inata efetiva contra bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* é necessário o reconhecimento tanto por TLR2 quanto TLR4 (CHASSIN; PICARDEAU; GOUJON; BOURHY *et al.*, 2009; NAHORI; FOURNIE-AMAZOUZ; QUE-GEWIRTH; BALLOY *et al.*, 2005; VIRIYAKOSOL; MATTHIAS; SWANCUTT; KIRKLAND *et al.*, 2006). Por isso, é provável que esse reconhecimento falho impeça a ativação de uma resposta imune adequada para a eliminação do patógeno em humanos, fazendo com que o indivíduo torne-se suscetível ao desenvolvimento da doença causada por essas bactérias.

1.3.2 Mecanismos de patogenicidade

Para que leptospiros infectem o hospedeiro, é necessário que haja a entrada do microrganismo através de sua pele. Para que isso seja possível, é necessário que a bactéria consiga contornar a barreira física do indivíduo, mesmo que sua entrada seja facilitada por abrasões ou umidade (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Nos estágios iniciais da leptospirose, a alta motilidade de *Leptospira*, promovida pela presença de dois flagelos periplásmicos, é essencial no sucesso na disseminação da bactéria através de membranas de mucosas e também da pele (BALLARD; WILLIAMSON; ADLER; VINH *et al.*, 1986; FAINE; VANDERHOEDEN, 1964; VINH; FAINE; ADLER, 1984). Essas bactérias demonstram maior motilidade em substratos de alta viscosidade (BERG; TURNER, 1979; KAISER; DOETSCH, 1975) o que pode explicar sua eficiência na penetração de substratos presentes em tecidos (MURRAY, 2015).

Outro mecanismo proposto relacionado à patogenicidade de *Leptospira* é a quimiotaxia por componentes presentes no sangue do hospedeiro. Há descrita a presença de pelo menos 12 genes codificantes para proteínas quimiotáticas no genoma de *Leptospira* patogênicas (NASCIMENTO; KO; MARTINS; MONTEIRO-VITORELLO *et al.*, 2004; REN; FU; JIANG; ZENG *et al.*, 2003), indicativo de que essas bactérias respondem a uma gama de

estímulos químicos. Estudos demonstram que leptospiros parecem ter atração por componentes do sangue (YURI; TAKAMOTO; OKADA; HIRAMUNE *et al.*, 1993) e também açúcares, piruvato e ácidos graxos do hospedeiro (LAMBERT; TAKAHASHI; CHARON; PICARDEAU, 2012), sugerindo que o patógeno seja atraído para locais onde barreiras teciduais já tenham sofrido alguma degradação.

A evasão do sistema imune do hospedeiro também é um mecanismo de patogenicidade importante e bastante estudado para *Leptospira*. As bactérias patogênicas são capazes de evadir o sistema imunológico do hospedeiro através da ligação em componentes do sistema complemento, de forma a inibir a cascata de sinalização (BARBOSA; ABREU; VASCONCELLOS; MORAIS *et al.*, 2009; CINCO; BANFI, 1983; MERI; MURGIA; STEFANEL; MERI *et al.*, 2005). Dessa forma, há uma redução de lise bacteriana, diminuição da taxa de recrutamento e ativação de fagócitos e redução de opsonofagocitose (BLOM; HALLSTROM; RIESBECK, 2009). Elas também são capazes de invadir e persistir em macrófagos (LI; OJCIUS; LIAO; LI *et al.*, 2010; TOMA; OKURA; TAKAYAMA; SUZUKI, 2011) através de mecanismos não-fagocíticos (MERIEN; BARANTON; PEROLAT, 1997), fator que parece ser importante na manutenção de sua patogenicidade (TOMA; MURRAY; NOHARA; MIZUYAMA *et al.*, 2014; ZHANG; ZHANG; OJCIUS; SUN *et al.*, 2012). Além disso, leptospiros patogênicos são capazes de sintetizar proteínas importantes na proteção contra espécies reativas de oxigênio (EROs). A resistência ao estresse oxidativo foi demonstrada ser essencial na manutenção da virulência bacteriana (ESHGHI; LOURDAULT; MURRAY; BARTPHO *et al.*, 2012), pois auxilia na subversão da fagocitose pelo hospedeiro.

Leptospira patogênicas possuem uma extensa redundância genética e funcional, resultado possivelmente de um processo de expansão genômica através de duplicações gênicas (BULACH; ZUERNER; WILSON; SEEMANN *et al.*, 2006; MURRAY, 2015). Proteínas redundantemente funcionais operam em diferentes estágios da doença, em órgãos e tecidos distintos ou então atuam sinergicamente. Supõe-se que essa redundância é o que permite às leptospiros infectarem um repertório tão grande de hospedeiros (MURRAY, 2015). Dentre as moléculas cuja sobreposição de função é existente nessas bactérias, destacam-se as adesinas.

A adesão de patógenos aos tecidos do hospedeiro é sabida como o evento inicial crítico para a maioria das infecções por microrganismos (Kline et al, 2009 – ver em Murray 2015). Isso é verdade também para bactérias do gênero *Leptospira* cuja ligação a células do hospedeiro e a componentes da matriz extra-celular (ECM) é necessária para que a bactéria penetre, dissemine e permaneça nos tecidos (LJUNGH; MORAN; WADSTRÖM, 1996). A composição da ECM é muito variável entre diferentes tecidos, mas no geral, é constituída por duas principais classes de macromoléculas: proteoglicanos (PGs) e proteínas fibrosas (PFs), dentre as quais fibronectina, laminina, colágeno e elastina. Ela está presente em todos os tecidos e órgãos, e sua principal função é a manutenção da integridade tecidual e transdução de sinais bioquímicos intra e extracelulares (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010).

Componentes de Superfície Microbiana Reconhedores de Moléculas Adesivas de Matriz (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules* – MSCRAMMs), também conhecidos como moléculas de adesão ou adesinas, são responsáveis pela adesão do patógeno às células do hospedeiro, interagindo com os componentes da ECM e, algumas vezes, com componentes sanguíneos (LJUNGH; MORAN; WADSTRÖM, 1996).

O primeiro indício de existência de uma proteína de *Leptospira* que se ligasse à ECM foi dado por Merien e colaboradores em 2000 após a descoberta de uma proteína de membrana de 36 kDa capaz de se ligar à fibronectina (MERIEN; TRUCCOLO; BARANTON; PEROLAT, 2000). Após essa descoberta, diversas proteínas foram descritas como ligantes de componentes de matriz extracelular.

Atualmente há descrito na literatura diversas proteínas de *Leptospira* capazes de se ligarem a diferentes componentes da ECM e componentes sanguíneos sugerindo a importância dessa etapa na patogenicidade dessas bactérias (Tabela 2). Dentre essas proteínas, estão a Lsa45, codificada pelo gene LIC10731 (FERNANDES; VIEIRA; ALVES; DE MORAIS *et al.*, 2014) e Lsa63 (VIEIRA; DE MORAIS; GONCALES; ROMERO *et al.*, 2010), codificada pelo gene LIC10314, anotadas no genoma de *L. interrogans* e altamente conservadas entre espécies patogênicas da bactéria, indicando a possibilidade de papel importante na infecção por *Leptospira*.

Tabela 2: Proteínas de membrana externa de *Leptospira* que interagem com componentes sanguíneos e de matriz extracelular.

Nome	Colágeno I	Colágeno III	Colágeno IV	Colágeno V	Elastina	Tropoelastina	Lamina	Fibronectina	Fibrinogênio	Plasminogênio	Fator H	Proteína I relacionada a Fator H	Proteína I Fator H-like	Proteína ligante de C4b	Referência
EF-Tu	X		X		X		X	X	X	X	X				Wolff et al., 2013
Enolase										X					Nogueira et al., 2013
LcpA														X	Barbosa et al., 2010
LenD							X	X							Stevenson et al., 2007
Lig B	X	X	X		X	X	X	X	X		X	X	X	X	Ching et al., 2012; Choy et al., 2007; Choy et al., 2011; Figueira et al., 2011; Lin et al., 2009; Toma et al., 2014
LigA	X		X				X	X	X		X	X	X	X	Choy et al., 2007; Figueira et al., 2011; Castiblanco-Valencia et al., 2012
LipL32	X		X	X			X	X		X					Vieira et al., 2010b; Hauk et al., 2008; Hoke et al., 2008
Lp29										X					Vieira et al., 2010b; Hauk et al., 2008; Hoke et al., 2008
Lsa20			X				X	X		X					Mendes et al., 2011
Lsa21			X				X	X							Atzigen et al., 2008
Lsa24/LenA/LfhA							X	X		X	X				Barbosa et al., 2006; Stevenson et al., 2007; Verma et al., 2006; Verma et al., 2010

Adaptado de Murray, 2015.

Tabela 2 (continuação)

Nome	Colágeno I	Colágeno III	Colágeno IV	Colágeno V	Elastina	Tropoelastina	Lamina	Fibronectina	Fibrinogênio	Plasminogênio	Fator H	Proteína I relacionada a Fator H	Proteína I Fator H-like	Proteína ligante de C4b	Referência
Lsa25							X								Domingos et al., 2012; Oliveira et al., 2013
Lsa30							X	X	X	X				X	Oliveira et al., 2013; Souza et al., 2012
Lsa45							X			X					Fernandes et al., 2014
Lsa63			X				X								Veira et al., 2010
MFn1								X							Pinne et al., 2012
MFn7								X							Pinne et al., 2012
MFn9								X							Pinne et al., 2012
OmpL1							X	X	X	X					Fernandes et al., 2012
OmpL37					X		X	X	X						Pinne et al., 2010
OmpL47		X			X		X	X	X						Pinne et al., 2010
Tlyc			X				X	X							Carvalho et al., 2009

A marcação (X) indica a qual(is) componente(s) existe interação por parte de cada uma das proteínas descritas. Adaptado de Murray, 2015.

A proteína Lsa45, descrita em 2014 por Fernandes e colaboradores, é uma adesina de superfície que tem capacidade de aderir à laminina da ECM. Essa proteína pode se ligar ao plasminogênio (PLG), gerando plasmina ativa (PLA) (FERNANDES; VIEIRA; ALVES; DE MORAIS *et al.*, 2014), uma serino-protease insensível a inativadores de plasmina teciduais, capaz de degradar fibronectina e laminina da ECM, ajudando na propagação bacteriana (LJUNGH; MORAN; WADSTRÖM, 1996). Já foi demonstrado que a geração de PLA em *Leptospira* promove a atividade de migração da bactéria aumentando seu poder proteolítico (VIEIRA; ATZINGEN; OLIVEIRA; MENDES *et al.*, 2012). Ensaio em camundongos mostraram que a Lsa45 tem capacidade de indução tanto de imunidade humoral, demonstrando alta produção de anticorpos no soro, quanto imunidade celular, promovendo indução de linfoproliferação celular e produção de citocinas em níveis elevados (FERNANDES; VIEIRA; ALVES; DE MORAIS *et al.*, 2014).

A proteína Lsa63 possui um domínio conservado p83/100, presente em antígenos proteicos de outras espiroquetas como *Borrelia* e *Treponema* ssp. Ela é capaz de ligar-se a dois componentes importantes da ECM, laminina e colágeno IV. É considerada imunogênica uma vez que amostras de soro de pacientes da fase convalescente de leptospirose apresentaram anticorpos do tipo IgG anti-Lsa63. Interessantemente, enquanto essa proteína é altamente conservada em espécies patogênicas como *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri*, *L. noguchi* e *L. santarosai*, ela é ausente na linhagem não patogênica *L. biflexa*. Além disso, sugeriu-se através de imunoenaios que essa proteína é expressa durante a infecção natural por *Leptospira*, podendo dessa forma, ter papel importante na patogenicidade da bactéria (VIEIRA; DE MORAIS; GONCALES; ROMERO *et al.*, 2010).

Fatores como a conservação em espécies patogênicas, demonstração de imunogenicidade e sugestão de expressão durante a infecção natural por *Leptospira* fazem dessas proteínas interessantes candidatos para estudos de vacinologia.

1.4 Vacinas contra leptospirose

De acordo com a OMS, a administração de vacinas é a ferramenta mais eficiente e custo-efetiva na prevenção de diversas doenças, evitando a morte de 2 a 3 milhões de pessoas anualmente, sendo um pilar central da cobertura sanitária mundial (OMS, 2018).

A vacinação é o método mais viável para controlar a disseminação e surtos de leptospirose em regiões endêmicas da doença (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010; ELLIS, 2015; GRASSMANN; SOUZA; MCBRIDE, 2017). Vacinas contra leptospirose são amplamente utilizadas no campo veterinário, principalmente em animais domésticos e gado (ELLIS, 2015). Existem também algumas composições vacinais para uso humano, estas não disponíveis e não licenciadas mundialmente. Em ambos os casos, as vacinas apresentam diversas limitações devido à sua composição, reforçando a necessidade do desenvolvimento de novas formulações (ADLER; DE LA PENÃ-MOTECZUMA, 2010; FAINE; ADLER; BOLIN; PEROLAT, 1999a; FARKAS; CIZOVA; BEKESOVA; BYSTRICKY, 2013; XU; YE, 2018).

Para uso veterinário, vacinas contra leptospirose compostas de bacterinas, que nada mais são do que preparações a partir de células inteiras de leptospiras patogênicas inativadas, vêm sendo aplicadas nos últimos 50 anos (ADLER, 2015; BASHIRU; BAHAMAN, 2018). Elas são utilizadas principal e quase exclusivamente na imunização de cães, gados e suínos (ELLIS, 2015). Ao todo, existem diversas formulações disponíveis, contendo mais comumente em sua composição, de um a quatro sorovares distintos. Em alguns países, no entanto, vacinas produzidas localmente podem conter até oito sorovares, apesar de não haver estudos demonstrando proteção contra todos os componentes disponíveis na formulação (ADLER, 2015; ELLIS, 2015).

Para uso humano são ínfimas as formulações vacinais contra leptospirose, licenciadas para emprego somente em seus países de origem (HAAKE; LEVETT, 2015). Atualmente, Cuba (MARTINEZ; PEREZ; QUINONES MDEL; CRUZ *et al.*, 2004), França (LAURICHESSE; GOURDON; SMITS; ABDOE *et al.*, 2007), China (CHENG; QIN; XIE, 2001) e Japão (MASUZAWA; SUZUKI; YANAGIHARA, 1991) possuem vacinas com formulações distintas (Tabela 3) que são utilizadas exclusivamente em populações de risco como fazendeiros, mineradores e trabalhadores da área sanitária (ADLER, 2015; GRASSMANN; SOUZA; MCBRIDE, 2017; HAAKE; LEVETT, 2015). Assim

como vacinas de uso veterinário, a maioria das vacinas para uso humano é composta por bactérias inativadas, com exceção de uma cuja composição se dá por antígenos de membrana externa de *Leptospira*. No Brasil, não existe nenhuma formulação disponível para utilização em humanos contra *Leptospira*.

Tabela 3: Vacinas contra leptospirose para humanos

País	Fabricante	Tipo de vacina	Sorogrupo/Sorovar	Referência
China	Instituto Wuhan de Produtos Biológicos Co., Ltda.	Polivalente inativada	sorovares Australis, Autumnalis, Canicola, Hebdomadis, Lai, Linhai e Pomona	Xu et al., 2005
China	Instituto Shangai de Produtos Biológicos Co., Ltda.	Bivalente de membrana externa	sorogrupos Icterohaemorrhagiae e Hebdomadis	Cheng et al., 2001
Cuba	Instituto Finlay	Trivalente inativada	sorogrupos Canicola sorovar Canicola; sorogrupo Icterohaemorrhagiae sorovar Copenhageni; sorogrupo Pomona sorovar Mozdok	Martínez et al., 2004; Martínez, 2014
França	Sanofi-Pasteur	Monovalente inativada	sorogrupo Icterohaemorrhagiae	Laurichesse et al., 2007
Japão	-	Polivalente inativada	sorovares Australis, Autumnalis, Copenhageni e Hebdomadis	Masuzawa et al., 1991; Koizumi e Watanabe, 2005

Adaptado de (XU; YE, 2018).

Apesar de utilizadas, vacinas preparadas a partir de bactérias inativadas ou de componentes de membrana externa (ME) possuem uma série de desvantagens que fazem com que seu uso seja bastante limitado. Devido à sua

composição, a resposta imunológica promovida por elas baseia-se na geração de anticorpos contra LPS, um antígeno T-independente, de forma que não envolve a geração de memória imunológica. Dessa forma, a duração da proteção é curta, havendo, portanto, a necessidade de revacinação constante; além disso, essas vacinas são sorovar-específicas limitando sua proteção apenas contra sorovares presentes em sua formulação (ADLER, 2015; BHARTI; NALLY; RICALDI; MATTHIAS *et al.*, 2003; FAINE; ADLER; BOLIN; PEROLAT, 1999a; XU; YE, 2018). Isso faz com que haja a necessidade de estudos epidemiológicos em diversas regiões para que seja possível a identificação das espécies e sorovares mais comuns a fim de se desenvolver uma formulação específica cujos componentes envolvam bactérias presentes nestes locais (ADLER, 2015; DELLAGOSTIN; GRASSMANN; RIZZI; SCHUCH *et al.*, 2017; ELLIS, 2015; WANG; JIN; WEGRZYN, 2007). Muitos países não possuem instalações para diagnóstico e vigilância da doença, importando produtos multivalentes que podem não ser apropriados para a região em questão (ELLIS, 2015). Outro fator é que vacinas multivalentes contra leptospirose aparentam ser desfavoráveis quando comparadas às monovalentes, apesar dos efeitos de competição antigênica entre grandes número de sorovares numa mesma formulação vacinal seja ainda desconhecida (BOLIN; CASSELLS; ZUERNER; TRUEBA, 1991; BOLIN; THIERMANN; HANDSAKER; FOLEY, 1989; BOLIN; ZUERNER; TRUEBA, 1989; RINEHART; ZIMMERMAN; BUTERBAUGH; JOLIE *et al.*, 2012).

Outras desvantagens de vacinas contra leptospirose estão associadas aos efeitos colaterais enfrentados. Estudos reportam uma série de problemas como febre, náusea e dores no local de aplicação (LAURICHESSE; GOURDON; SMITS; ABDOE *et al.*, 2007; MAILLOUX; DEBARBAT; MOLLARET, 1983; MARTINEZ; PEREZ; QUINONES MDEL; CRUZ *et al.*, 2004; POULIQUEN; CATILINA, 2000). Por problemas relacionados à reatogenicidade, eficácia, qualidade e propriedade de antígenos vacinais, as vacinas atuais não ganharam aceitação mundial para uso humano como ocorreu para uso veterinário, ainda que mesmo para uso animal elas estejam bem distantes do ideal (ADLER, 2015).

Nesse ponto, vacinas de subunidades baseadas em proteínas de membrana externa conservadas entre leptospiras patogênicas poderiam ser

uma interessante alternativa às vacinas celulares inativadas. Moléculas proteicas exibem uma resposta do tipo T-dependente no organismo, com apresentação de antígeno através do Complexo Principal de Histocompatibilidade classe II (MCHII), gerando memória imunológica no indivíduo (ALBERTS, 1998). Proteínas recombinantes têm sido testadas como candidatos vacinais contra leptospirose (ATZINGEN; VIEIRA; OLIVEIRA; DOMINGOS *et al.*, 2012; CULLEN; HAAKE; BULACH; ZUERNER *et al.*, 2003; DONAHUE; BEBEE, 1999; FAISAL; YAN; CHEN; PALANIAPPAN *et al.*, 2008; FERNANDES; TEIXEIRA; FILHO; SOUZA *et al.*, 2017), mas poucas foram capazes de induzir proteção parcial em desafio com *Leptospira* virulentas (VIEIRA; FERNANDES; DOMINGOS; OLIVEIRA *et al.*, 2014). Muitos estudos e esforços vêm sendo realizados com o objetivo de desenvolver uma vacina que seja capaz de promover proteção cruzada entre diferentes sorovares.

1.5 Vacinas conjugadas

Vacinas conjugadas são vacinas em que há uma ligação química covalente entre um antígeno de interesse fracamente imunogênico, geralmente um polissacarídeo, à uma proteína carreadora, altamente imunogênica. Essa ligação – chamada de conjugação – torna a resposta imunológica contra o antígeno de interesse mais eficiente, promovendo uma proteção mais ampla.

Em 1929, Avery e Goebel mostraram que a imunogenicidade de polissacarídeos poderia ser melhorada se estes fossem ligados covalentemente à proteínas carreadoras (AVERY; GOEBEL, 1929). Essa característica só voltou a ser mais explorada a partir de 1980 quando Schneerson e colaboradores descreveram que conjugados entre o polissacarídeo capsular da bactéria *Haemophilus influenzae* e os toxóides diftérico e tetânico acarretavam em um aumento na resposta de anticorpos específicos contra o polissacarídeo em camundongos (SCHNEERSON; BARRERA; SUTTON; ROBBINS, 1980).

Polissacarídeos (PS) são polímeros grandes compostos de várias subunidades repetitivas que funcionam como epítomos, e são os principais fatores de virulência em doenças causadas por bactérias encapsuladas como *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*. Essas moléculas são

capazes de induzir a geração de anticorpos na ausência de células T através de interação direta com receptores de células B, que então se diferenciam em plasmócitos produtores de anticorpos, acarretando dessa forma em uma resposta imunológica T-independente. As características de resposta de anticorpos contra PS são bastante restritivas, sendo dominadas por anticorpos do tipo IgM e IgG2 e de curta duração devido à ausência do auxílio de células T na geração de memória imunológica. Dessa forma, os PS também não são capazes de promover uma resposta imunológica ampliada através de re-exposição, oferecendo também o risco de hiporresponsividade ao antígeno em imunizações subsequentes (RAPPUOLI; DE GREGORIO; COSTANTINO, 2019; TZIANABOS, 2000).

Apesar de imunogênicos em adultos e crianças maiores, PS não são capazes de proteger crianças menores de 2 anos (KAYHTY; KARANKO; PELTOLA; MAKELA, 1984). Por ser incapaz de gerar memória imunológica a imunização com polissacarídeos é bastante limitada, não protegendo a população de risco que inclui além de crianças menores de 2 anos, idosos e pessoas imunodeficientes ou imunocomprometidas (KAISER; DOETSCH, 1975; VINH; FAINE; ADLER, 1984).

Diferentemente do que ocorre para os polissacarídeos, as proteínas, moléculas formadas por sequências de aminoácidos, induzem resposta imune do tipo T-dependente. Após a interação de proteínas com células apresentadoras de antígeno (APCs), elas são internalizadas e processadas em peptídeos, re-expostas e apresentadas a células T, induzindo a diferenciação de células B em plasmócitos e células B de memória. Isso leva à geração de anticorpos de alta afinidade, com prevalência da classe IgG, a partir da ativação de células *T-helper*, induzindo a formação de células T e B de memória conferindo assim memória imunológica ao organismo e proteção aos grupos de risco (ABBAS; LICHTMAN, 2003; COSTANTINO; RAPPUOLI; BERTI, 2011). A partir desse ponto, diversos trabalhos de conjugação polissacarídeo-proteína foram desenvolvidos (BERTI; ADAMO, 2018a), demonstrando a conferência de memória imunológica e proteção, principalmente em grupos de risco que englobam idosos, crianças e indivíduos imunocomprometidos (KADIOGLU; WEISER; PATON; ANDREW, 2008; VLIEGENTHART, 2006).

Atualmente, existe uma gama de vacinas conjugadas disponíveis no mercado (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**), incluindo as vacinas contra *H. influenzae* tipo b e *S. pneumoniae* que fazem parte do calendário nacional de vacinação e são fornecidas gratuitamente em postos de vacinação do Brasil para a população alvo.

Tabela 4: Vacinas conjugadas licenciadas até 2018.

Patógeno	Nome comercial	Fabricante	Proteína carreadora
<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b	ActHIB	Sanofi-Pasteur	TT
	Hiberix	Glaxo-Smith-Klein	TT
	Quinvaxen	Glaxo-Smith-Klein	CRM197
	PedvaxHIB	Merck	OMPC
<i>Neisseria meningitidis</i> sorogrupo C	NeisVac-C	Pfizer	TT
	Meningitec	Nuron Biotech	CRM197
	Menjugate	Glaxo-Smith-Klein	CRM197
	Menitorix	Glaxo-Smith-Klein	TT
<i>Neisseria meningitidis</i> sorogrupo CY	MenHibrix	Glaxo-Smith-Klein	TT
<i>Neisseria meningitidis</i> sorogrupo ACWY	Menactra	Sanofi-Pasteur	DT
	Menveo	Glaxo-Smith-Klein	CRM197
	Nimerix	Pfizer	TT
<i>Streptococcus pneumoniae</i> sorogrupos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F	Prevnar	Pfizer	CRM197
<i>Streptococcus pneumoniae</i> sorogrupos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 23F	Synflorix	Glaxo-Smith-Klein	NTHi-PD, DT, TT
<i>Streptococcus pneumoniae</i> sorogrupos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F,	Prevnar13	Pfizer	CRM197

9V, 14, 18C, 19A, 19F,
23F

TT: toxóide tetânico; TD: toxóide diftérico; CRM₁₉₇: toxóide diftérico mutado no aminoácido 197; OMPC: complexo proteico de membrana externa de meningococo; NTHi-PD: proteína D de *H. influenzae* não tipável (cápsula polissacarídica ausente). Adaptado de (BERTI; ADAMO, 2018).

No Instituto Butantan, nosso grupo tem estudado o emprego da conjugação química de polissacarídeos capsulares de bactérias como *H. influenzae* tipo b e *Streptococcus pneumoniae* sorotipos 1, 6B, 14 e 23F à proteínas carreadoras, avaliando o potencial desses conjugados como candidatos vacinais, e os resultados obtidos tem sido muito interessantes (BARAZZONE; PERCIANI; RAW; TANIZAKI, 2009; DA SILVA; CONVERSO; GONCALVES; LEITE *et al.*, 2017; PERCIANI; BARAZZONE; GOULART; CARVALHO *et al.*, 2013; SANTAMARIA; GOULART; PERCIANI; BARAZZONE *et al.*, 2011).

Em 1990, Midwinter e colaboradores estudaram o efeito da conjugação da fração polissacarídica (PS) do LPS de *Leptospira interrogans* sorovares Pomona e Hardjo com toxóide diftérico (TD). O PS foi separado da fração lipídica, por hidrólise ácida, e a conjugação entre PS e TD foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa foi empregado brometo de cianogênio para ativação do PS para a ligação do mesmo à molécula espaçadora diidrazida do ácido adípico (ADH) com a consequente adição de resíduos de amina ao PS. Na etapa de ligação com TD, foi empregada a 1-etil-3-dimetilaminopropil carbodiimida (EDAC), uma molécula ativadora de grupos carboxílicos, o que proporcionou a ligação do PS modificado à proteína carreadora. Os animais foram imunizados com doses entre 0,25 e 25 µg de LPS dos sorovares Pomona e Hardjo, com maior título de aglutinação quando empregado 25 µg do sorovar Pomona. Animais imunizados com os conjugados PS-TD foram capazes de induzir formação de anticorpos anti-LPS pelo menos 10 vezes maior do que o LPS sozinho. O conjugado com PS derivado do LPS do sorovar Pomona foi mais imunogênico, estimulando a formação de anticorpos 40 vezes maior do que quando empregado somente LPS. A fração polissacarídica não conjugada derivada de LPS foi incapaz de produzir resposta imunológica

significativa (MIDWINTER; FAINE; ADLER, 1990), diferentemente do que se observou para a fração de PS derivada de LPS do sorovar Copenhageni em um trabalho feito por Josh e colaboradores, que inclusive mostra que o PS foi capaz de proteger em um ensaio de desafio contra uma cepa virulenta do mesmo sorovar (JOST; ADLER; FAINE, 1989).

Mais tarde, Midwinter e colaboradores separaram e caracterizaram o oligossacarídeo derivado do LPS de *L. interrogans* sorovar Pomona. Eles mostraram que esse oligossacarídeo era capaz de inibir a ligação a anticorpos monoclonais anti-LPS. A conjugação dessa fração foi feita via ligação tioéter com TD. Camundongos foram imunizados com esse conjugado e verificou-se a indução da formação de anticorpos opsonizantes (MIDWINTER; VINH; FAINE; ADLER, 1994).

Há descrito na literatura um trabalho que estudou se havia efeito protetor do LPS derivado de *L. biflexa* sorovar Patoc, uma linhagem saprofítica, diferentemente das utilizadas em estudos anteriores, em hamsters que foram desafiados com a linhagem patogênica *L. interrogans* sorovar Manilae cepa UP-MMG. Foram realizados alguns ensaios para verificar a similaridade entre os epítomos antigênicos de *L. biflexa* e *L. interrogans*. No teste de microaglutinação (MAT) o antissoro de hamsters imunizados com LPS de *L. biflexa* foi capaz de aglutinar células de *L. interrogans*. No ensaio de ELISA, a preparação de LPS de *L. biflexa* apresentou reação cruzada com o antissoro derivado da imunização de hamsters com células inteiras de *L. interrogans* (MATSUO; ISOGAI; ARAKI, 2000). Os resultados desse estudo sugerem fortemente a presença de antígenos comuns ou bastante similares na superfície de *L. biflexa* e *L. interrogans*. Apesar de não ter se observado proteção completa contra a linhagem patogênica, verificou-se que quanto maior a quantidade de LPS de *L. biflexa* administrada na imunização, melhor era o efeito protetor obtido.

No mesmo estudo, testou-se também a administração a hamsters de células de *L. biflexa* inativadas com formalina. Observou-se que nesses casos, o efeito da atividade protetora era inferior ao verificado quando administrado o LPS. Esse resultado sugere que de fato o LPS sozinho possa ser um melhor antígeno quanto comparado à bacterina, o que pode ser explicado pelo baixo conteúdo de LPS na preparação de células inteiras.

Nesse contexto, o presente projeto visa a síntese e purificação de adesinas de superfície de *Leptospira interrogans* e sua modificação química a fim de possibilitar a conjugação com o LPS de *Leptospira biflexa* para estudos futuros de seu potencial imunogênico como candidato vacinal.

2. Conclusão

A proteína Lsa45 pôde ser obtida de forma solúvel quando sintetizada em temperaturas entre 18 e 20°C utilizando uma cepa de *E. coli* que expressa a chaperona GroEL-GroES. Entretanto, sua produção é bastante diminuta, o que pôde ser melhorado através de modificações no meio de cultivo e no frasco, utilizando-se o meio autoindutor de promoção de crescimento ZYM-5052 e o frasco Tunair™, capaz de fornecer melhor aeração no meio, aumentando a concentração de oxigênio dissolvido e promovendo assim o crescimento das bactérias. A purificação dessa proteína é possível de ser feita em duas etapas para obtenção da molécula com pureza superior a 90%, com rendimento final bom, superior a 25%. Apesar de ter sido perdida uma massa grande de proteína na derivatização com o ADH (80 %), essa reação foi bem sucedida pois nas moléculas que não precipitaram, houve adição de três vezes mais amina quando comparado ao conteúdo desse grupo na proteína não modificada. Porém, mesmo com o sucesso da derivatização, a instabilidade da proteína fez com que optássemos por empregar outra molécula, escolhendo-se a proteína Lsa63.

A expressão da Lsa63 é bastante simples, em cepa independente de indução por IPTG, o que torna o processo mais barato, e em quantidades consideráveis. Quando comparado a produção da proteína Lsa45, a proteína Lsa63 se equipara à melhor condição de cultivo observada para a molécula anterior, com média de 8,74 mg/L após a purificação. Sua purificação também é simples, passando por duas etapas cromatográficas e obtendo-se pureza superior a 90%. O processo de derivatização da proteína Lsa63 ocorreu em pH mais ácido, em torno de 6, obtendo-se um aumento no conteúdo de amina entre 1,4 e 2 vezes após a modificação.

O cultivo de *L. biflexa* para extração de LPS é extremamente demorado, mas factível. As células crescem bem no sistema de repique escalonado e após várias sequencias de repique é possível obter massa suficiente para a extração. A extração do LPS utilizando o protocolo fenol/água a quente a partir da solubilização de massa úmida da bactéria e após o processo de purificação gerou LPS com pureza de aproximadamente 85% e rendimento de 0,25% (massa de LPS/massa de células). Liofilizando-se a

mesma quantidade de massa úmida e utilizando o liofilizado como base inicial da extração, verificou-se que a solubilização da massa ocorre de forma mais homogênea. A extração a partir da massa liofilizada teve rendimento 3,5 vezes maior comparando com o obtido partindo de massa úmida e com pureza cerca de 4% maior.

A conjugação entre a proteína modificada Lsa63AH e o LPS de *L. biflexa* utilizando CDAP como agente ativador gerou moléculas conjugadas com massa molecular acima de 140 kDa. Entretanto, apesar da presença do conjugado Lsa63AH-LPS, houve perda de 78% em massa proteica, indicando a necessidade da otimização do método de conjugação e purificação. Futuramente será necessário realizar um estudo do potencial imunológico do conjugado Lsa63AH-LPS para avaliação como possível candidato vacinal contra leptospirose.

3. Referências

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Celular and Molecular Immunology**. 5 ed. Elsevier, 2003. 0-7216-0008-5.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAL, S. The basics of the basic and clinical immunology. **Actualites Pharmaceutiques**, 55, n. 560, p. 9-9, Nov 2016.

ADLER, B. Vaccines against leptospirosis. **Curr Top Microbiol Immunol**, 387, p. 251-272, 2015. Research Support, Non-U.S. Gov't Review.

ADLER, B.; DE LA PENÃ-MOTECZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Vet Microbiol**, 140, n. 3-4, p. 287-296, Jan 27 2010. Review.

ADLER, B.; DE LA PENA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Vet Microbiol**, 140, n. 3-4, p. 287-296, Jan 27 2010. Review.

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Recombinant organisms for production of industrial products. **Bioeng Bugs**, 1, n. 2, p. 116-131, Mar-Apr 2010. Review.

ALBERTS, B. **Essential cell biology : an introduction to the molecular biology of the cell**. New York: Garland Pub., 1998. 0815320450 0815329717 (pbk.).

ALBERTS, B.; WATSON, J.; LEWIS, J.; JOHNSON, A. *et al.* Pathogens, Infection, and Innate Immunity. *In: Molecular Biology of the Cell* 4th ed. Nova Iorque: Garland Science, 2002. cap. 25.

ATZINGEN, M. V.; VIEIRA, M. L.; OLIVEIRA, R.; DOMINGOS, R. F. *et al.* Evaluation of immunoprotective activity of six leptospiral proteins in the hamster model of leptospirosis. **Open Microbiol J**, 6, p. 79-87, 2012.

BALLARD, S. A.; WILLIAMSON, M.; ADLER, B.; VINH, T. *et al.* Interactions of virulent and avirulent leptospire with primary cultures of renal epithelial cells. **J Med Microbiol**, 21, n. 1, p. 59-67, Feb 1986. Research Support, Non-U.S. Gov't.

BARBOSA, A. S.; ABREU, P. A.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M. *et al.* Immune evasion of leptospira species by acquisition of human complement regulator C4BP. **Infect Immun**, 77, n. 3, p. 1137-1143, Mar 2009. Research Support, Non-U.S. Gov't.

BASHIRU, G.; BAHAMAN, A. R. Advances & challenges in leptospiral vaccine development. **Indian J Med Res**, 147, n. 1, p. 15-22, Jan 2018. Review.

BENSCHOP, J.; HEUER, C.; JAROS, P.; COLLINS-EMERSON, J. *et al.* Sero-prevalence of leptospirosis in workers at a New Zealand slaughterhouse. **New Zealand Medical Journal**, 122, n. 1307, p. 39-47, 2009.

BERG, H. C.; TURNER, L. Movement of microorganisms in viscous environments. **Nature**, 278, n. 5702, p. 349-351, Mar 22 1979. Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.

BERTI, F.; ADAMO, R. Antimicrobial conjugate vaccines: an overview of classic and modern approaches for protein modification **Chemical Society Review**, 47, p. 9015-9025, 2018.

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, J. N.; MATTHIAS, M. A. *et al.* Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Disease**, 3, n. 12, p. 2808-2817, 2003.

BLOM, A. M.; HALLSTROM, T.; RIESBECK, K. Complement evasion strategies of pathogens-acquisition of inhibitors and beyond. **Mol Immunol**, 46, n. 14, p. 2808-2817, Sep 2009. Research Support, Non-U.S. Gov't Review.

BOLGIANO, B.; MAWAS, F.; BURKIN, K.; CRANE, D. T. *et al.* A retrospective study on the quality of Haemophilus influenzae type b vaccines used in the UK between 1996 and 2004. **Hum Vaccin**, 3, n. 5, p. 176-182, Sep-Oct 2007. Research Support, Non-U.S. Gov't.

BOLIN, C. A.; CASSELLS, J. A.; ZUERNER, R. L.; TRUEBA, G. Effect of vaccination with a monovalent Leptospira interrogans serovar hardjo type hardjo-bovis vaccine on type hardjo-bovis infection of cattle. **Am J Vet Res**, 52, n. 10, p. 1639-1643, Oct 1991.

BOLIN, C. A.; THIERMANN, A. B.; HANDSAKER, A. L.; FOLEY, J. W. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine on Leptospira interrogans serovar hardjo type hardjo-bovis infection of pregnant cattle. **Am J Vet Res**, 50, n. 1, p. 161-165, Jan 1989.

BOLIN, C. A.; ZUERNER, R. L.; TRUEBA, G. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine containing Leptospira interrogans serovar hardjo type hardjo-bovis on type hardjo-bovis infection of cattle. **Am J Vet Res**, 50, n. 12, p. 2004-2008, Dec 1989. Comparative Study.

BOURHY, P.; COLLET, L.; BRISSE, S.; PICARDEAU, M. Leptospira mayottensis sp. nov., a pathogenic species of the genus Leptospira isolated from humans. **International Journal of Evolutionary Microbiology**, 12, 64, p. 4061-4067, 2014.

BOURHY, P.; LOUVEL, H.; SAINT GIRONS, I.; PICARDEAU, M. Random insertional mutagenesis of Leptospira interrogans, the agent of leptospirosis, using a mariner transposon. **J Bacteriol**, 187, n. 9, p. 3255-3258, May 2005.

BRENNER, D. J.; KAUFMANN, A. F.; SUZLER, K. R.; STEIGERWALT., A. G. *et al.* Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. **International Journal of Systems Bacteriology**, 49 pt 2, p. 839-858, 1999.

BRITO, L. A.; SINGH, M. Acceptable levels of endotoxin in vaccine formulations during preclinical research. **J Pharm Sci**, 100, n. 1, p. 34-37, Jan 2011. Review.

BRUCE, M. G.; SANDERS, E. J.; LEAKE, J. A.; ZAIDEL, O. *et al.* Leptospirosis among patients presenting with dengue-like illness in Puerto Rico. **Acta Trop**, 96, n. 1, p. 36-46, Oct 2005.

BULACH, D.; KALAMBAHETI, T.; DE LA PEÑA-MOCTECZUMA, A.; ADLER, B. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Leptospira*. **Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, 2, n. 4, p. 375-380, 2000.

BULACH, D. M.; ZUERNER, R. L.; WILSON, P.; SEEMANN, T. *et al.* Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 103, n. 39, p. 14560-14565, Sep 26 2006. Research Support, Non-U.S. Gov't
Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.

BURGESS, R. R. Refolding solubilized inclusion body proteins. **Methods Enzymol**, 463, p. 259-282, 2009. Review.

CAO, X. J.; DAI, J.; XU, H.; NIE, S. *et al.* High-coverage proteome analysis reveals the first insight of protein modification systems in the pathogenic spirochete *Leptospira interrogans*. **Cell Res**, 20, n. 2, p. 197-210, Feb 2010. Research Support, Non-U.S. Gov't.

CHASSIN, C.; PICARDEAU, M.; GOUJON, J. M.; BOURHY, P. *et al.* TLR4- and TLR2-mediated B cell responses control the clearance of the bacterial pathogen, *Leptospira interrogans*. **J Immunol**, 183, n. 4, p. 2669-2677, Aug 15 2009. Research Support, Non-U.S. Gov't.

CHENG, J.; QIN, J.; XIE, G. [Epidemiological observation on effect of Leptospiral outer membrane vaccine]. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi**, 22, n. 2, p. 108-110, Apr 2001.

CHIRATHAWORN, C.; INWATTANA, R.; POOVORAWAN, Y.; SUWANCHAROEN, D. Interpretation of microscopic agglutination test for leptospirosis diagnosis and seroprevalence. **Asian Pac J Trop Biomed**, 4, n. Suppl 1, p. S162-164, May 2014.

CINCO, M.; BANFI, E. Activation of complement by leptospire and its bactericidal activity. **Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A**, 254, n. 2, p. 261-265, Apr 1983.

COSTA, F.; HAGAN, J. E.; CALCAGNO, J.; KANE, M. *et al.* Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Negl Trop Dis**, 9, n. 9, p. e0003898, 2015. Meta-Analysis
Research Support, N.I.H., Extramural
Research Support, Non-U.S. Gov't
Review
Systematic Review.

COSTANTINO, P.; RAPPUOLI, R.; BERTI, F. The design of semi-synthetic and synthetic glycoconjugate vaccines. **Expert Opin Drug Discov**, 6, n. 10, p. 1045-1066, Oct 2011.

CRODA, J.; FIGUEIRA, C. P.; WUNDER, E. A., JR.; SANTOS, C. S. *et al.* Targeted mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species: disruption of the LigB gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. **Infect Immun**, 76, n. 12, p. 5826-5833, Dec 2008. Research Support, N.I.H., Extramural
Research Support, Non-U.S. Gov't.

CRUMP, J. A.; MORRISSEY, A. B.; NICHOLSON, W. L.; MASSUNG, R. F. *et al.* Etiology of severe non-malaria febrile illness in Northern Tanzania: a prospective cohort study. **PLoS Negl Trop Dis**, 7, n. 7, p. e2324, 2013. Research Support, N.I.H., Extramural
Research Support, Non-U.S. Gov't.

CULLEN, P. A.; CORDWELL, S. J.; BULACH, D. M.; HAAKE, D. A. *et al.* Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. **Infect Immun**, 70, n. 5, p. 2311-2318, May 2002. Research Support, Non-U.S. Gov't.

CULLEN, P. A.; HAAKE, D. A.; BULACH, D. M.; ZUERNER, R. L. *et al.* LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. **Infect Immun**, 71, n. 5, p. 2414-2421, May 2003.

DAVANLOO, P.; ROSENBERG, A. H.; DUNN, J. J.; STUDIER, F. W. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 81, n. 7, p. 2035-2039, Apr 1984.

DE CASTRO, C.; PARRILLI, M.; HOLST, O.; MOLINARO, A. Microbe-Associated Molecular Patterns in Inate Immunity: Extraction and Chemical Analysis of Gram-Negative Bacterial Lipopolysaccharides. *In: Methods in Enzymology*: Elsevier, 2010. v. 480, cap. 5.

DELLAGOSTIN, O. A.; GRASSMANN, A. A.; RIZZI, C.; SCHUCH, R. A. *et al.* Reverse Vaccinology: An Approach for Identifying Leptospiral Vaccine Candidates. **Int J Mol Sci**, 18, n. 1, Jan 14 2017. Review.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnol Adv**, 27, n. 3, p. 297-306, May-Jun 2009. Review.

DONAHUE, R. A.; BEBEE, R. L. BL21-SI™ Competent Cells for Protein Expression in *E. coli*. *Focus*, 21: 49-51 p. 1999.

DUBENDORFF, J. W.; STUDIER, F. W. Creation of a T7 autogene. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase under control of its cognate promoter. **J Mol Biol**, 219, n. 1, p. 61-68, May 5 1991. Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, 28, p. 350-356, 1956.

EHRlich, G. D.; HILLER, N. L.; HU, F. Z. What makes pathogens pathogenic. **Genome Biol**, 9, n. 6, p. 225, 2008. Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review.

ELLIS, W. A. Animal leptospirosis. **Curr Top Microbiol Immunol**, 387, p. 99-137, 2015. Review.

ERRIDGE, C.; BENNET-GUERRERO, E.; POXTON, I. R. Structure and Function of Lipopolysaccharides. **Microbes and Infection**, 4, p. 837-851, 2002.

ESHGHI, A.; LOURDAULT, K.; MURRAY, G. L.; BARTPHO, T. *et al.* *Leptospira interrogans* catalase is required for resistance to H₂O₂ and for virulence. **Infect Immun**, 80, n. 11, p. 3892-3899, Nov 2012. Research Support, Non-U.S. Gov't.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira* and Leptospirosis. **Melbourne: Australia MedSci**, 1999a.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. Pathogenesis, Virulence, Immunity. *In: Leptospira and Leptospirosis*. 2nd ed. Melbourne, Australia: MedSci, 1999b.

FAINE, S.; VANDERHOEDEN, J. Virulence-Linked Colonial and Morphological Variation in *Leptospira*. **J Bacteriol**, 88, p. 1493-1496, Nov 1964.

FAISAL, S. M.; YAN, W.; CHEN, C. S.; PALANIAPPAN, R. U. *et al.* Evaluation of protective immunity of *Leptospira* immunoglobulin like protein A (LigA) DNA vaccine against challenge in hamsters. **Vaccine**, 26, n. 2, p. 277-287, Jan 10 2008.

FARKAS, P.; CIZOVA, A.; BEKESOVA, S.; BYSTRICKY, S. Comparison of EDC and DMTMM efficiency in glycoconjugate preparation. **Int J Biol Macromol**, 60, p. 325-327, Sep 2013. Research Support, Non-U.S. Gov't.

FARR, R. W. Leptospirosis. **Clinical Infectious Diseases**, 21, n. 1, p. 1-6, 1995.

FERNANDES, L. G.; VIEIRA, M. L.; ALVES, I. J.; DE MORAIS, Z. M. *et al.* Functional and immunological evaluation of two novel proteins of *Leptospira* spp. **Microbiology**, 160, n. Pt 1, p. 149-164, Jan 2014. Research Support, Non-U.S. Gov't.

FERNANDES, L. G. V.; TEIXEIRA, A. F.; FILHO, A. F. S.; SOUZA, G. O. *et al.* Immune response and protective profile elicited by a multi-epitope chimeric protein derived from *Leptospira interrogans*. **Int J Infect Dis**, 57, p. 61-69, Apr 2017.

FLANNERY, B.; PEREIRA, M. M.; VELLOSO, L. D. F.; CARVALHO, C. D. C. *et al.* Referral pattern of leptospirosis cases during a large urban epidemic of dengue. **Am J Trop Med Hyg**, 65, n. 5, p. 657-663, Nov 2001.

FORBES, A. E.; ZOCHOWSKI, W. J.; DUBREY, S. W.; SIVAPRAKASAM, V. Leptospirosis and Weil's disease in the UK. **QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians**, 105, n. 12, p. 1151-1162, 2012.

FRANTZ, C.; STEWART, M. K.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **Journal of Cell Science**, 123, p. 4195-4200, 2010.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S. *et al.* Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. **The Proteomics Protocols Handbooks**, p. 571-607 2005.

GRASSMANN, A. A.; SOUZA, J. D.; MCBRIDE, A. J. A Universal Vaccine against Leptospirosis: Are We Going in the Right Direction? **Front Immunol**, 8, p. 256, 2017.

GUHA, M.; MACKMAN, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. **Cell Signal**, 13, n. 2, p. 85-94, Feb 2001. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
Review.

HAAKE, D. A.; CHAO, G.; ZUENER, R. L.; BARNETT, J. K. *et al.* The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infection and Immunity**, 68, n. 4, p. 2276-2285, 2000.

HAAKE, D. A.; LEVETT, P. N. Leptospirosis in humans. **Curr Top Microbiol Immunol**, 387, p. 65-97, 2015. Research Support, N.I.H., Extramural
Research Support, Non-U.S. Gov't
Review.

HAAKE, D. A.; ZUCKERT, W. R. The leptospiral outer membrane. **Curr Top Microbiol Immunol**, 387, p. 187-221, 2015. Research Support, N.I.H., Extramural
Research Support, Non-U.S. Gov't
Review.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J Mol Biol**, 166, n. 4, p. 557-580, Jun 5 1983. Research Support, Non-U.S. Gov't
Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

IZURIETA, R.; GALWANKAR, S.; CLEM, A. Leptospirosis: The "mysterious" mimic. **J Emerg Trauma Shock**, 1, n. 1, p. 21-33, Jan 2008.

JOST, B. H.; ADLER, B.; FAINE, S. Experimental immunisation of hamsters with lipopolysaccharide antigens of *Leptospira interrogans*. **J Med Microbiol**, 29, p. 115-120, 1989.

KAISER, G. E.; DOETSCH, R. N. Letter: Enhanced translational motion of *Leptospira* in viscous environments. **Nature**, 255, n. 5510, p. 656-657, Jun 19 1975.

KAYHTY, H.; KARANKO, V.; PELTOLA, H.; MAKELA, P. H. Serum antibodies after vaccination with *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide and responses to reimmunization: no evidence of immunologic tolerance or memory. **Pediatrics**, 74, n. 5, p. 857-865, Nov 1984. Clinical Trial
Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

KO, A. I.; GORANT, C.; PICARDEAU, M. *Leptospira*: The Dawn of the Molecular Genetics Era for an Emerging Zoonotic Pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, 7, n. 10, p. 736-747, 2009.

KOZLOWSKI, L. P. Proteome-pl: proteome isoelectric point database. **Nucleic Acids Res**, 45, n. D1, p. D1112-D1116, Jan 4 2017.

KUBLER-KIELB, J.; COXON, B.; SCHNEERSON, R. Chemical structure, conjugation, and cross-reactivity of *Bacillus pumilus* Sh18 cell wall polysaccharide. **J Bacteriol**, 186, n. 20, p. 6891-6901, Oct 2004.

LAMBERT, A.; TAKAHASHI, N.; CHARON, N. W.; PICARDEAU, M. Chemotactic behavior of pathogenic and nonpathogenic *Leptospira* species. **Appl Environ Microbiol**, 78, n. 23, p. 8467-8469, Dec 2012. Research Support, N.I.H., Extramural
Research Support, Non-U.S. Gov't.

LAURICHESSE, H.; GOURDON, F.; SMITS, H. L.; ABDOE, T. H. *et al.* Safety and immunogenicity of subcutaneous or intramuscular administration of a monovalent inactivated vaccine against *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae in healthy volunteers. **Clin Microbiol Infect**, 13, n. 4, p. 395-403, Apr 2007. Randomized Controlled Trial.

LEES, A.; BRETT, L. N.; MOND, J. J. Activation of soluble polysaccharides with 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate for use in protein-polysaccharide conjugate vaccines and immunological reagents. **Vaccine**, 14, n. 3, p. 190-196, 1996.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, 14, p. 296-326, 2001.

LI, C.; MOTAEB, A.; SAL, M.; GOLDSTEIN, S. F. *et al.* Spirochete periplasmic flagella and motility. **Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, 2, n. 4, p. 345-354, 2000.

LI, S.; OJCIUS, D. M.; LIAO, S.; LI, L. *et al.* Replication or death: distinct fates of pathogenic *Leptospira* strain Lai within macrophages of human or mouse origin. **Innate Immun**, 16, n. 2, p. 80-92, Apr 2010. Research Support, Non-U.S. Gov't.

LINK, A. J.; ROBISON, K.; CHURCH, G. M. Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12. **Electrophoresis**, 18, n. 8, p. 1259-1313, Aug 1997. Comparative Study Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Review.

LJUNGH, A.; MORAN, A. P.; WADSTRÖM, T. Interactions of bacterial adhesins with extracellular matrix and plasma proteins: pathogenic implications and therapeutic possibilities **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 16, p. 117-126, 1996.

MAILLOUX, M.; DEBARBAT, F.; MOLLARET, H. H. [Leptospirosis on the Island of Reunion. I. Human leptospiroses]. **Bull Soc Pathol Exot Filiales**, 76, n. 5 Pt 2, p. 729-735, Dec 1983.

MAMAT, U.; WILKE, K.; BRAMHILL, D.; SCHROMM, A. B. *et al.* Detoxifying *Escherichia coli* for endotoxin-free production of recombinant proteins. **Microb Cell Fact**, 14, p. 57, Apr 16 2015. Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't.

MARCSISIN, R. A.; BARTPHO, T.; BULACH, D. M.; SRIKRAM, A. *et al.* Use of a high-throughput screen to identify *Leptospira* mutants unable to colonize the carrier host or cause disease in the acute model of infection. **J Med Microbiol**, 62, n. Pt 10, p. 1601-1608, Oct 2013. Evaluation Study Research Support, Non-U.S. Gov't.

MARTINEZ, R.; PEREZ, A.; QUINONES MDEL, C.; CRUZ, R. *et al.* [Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba]. **Rev Panam Salud Publica**, 15, n. 4, p. 249-255, Apr 2004. Clinical Trial Clinical Trial, Phase III Randomized Controlled Trial.

MASUKO, T.; MINAMI, A.; IWASAKI, N.; MAJIMA, T. *et al.* Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. **Anal Biochem**, 339, n. 1, p. 69-72, Apr 1 2005.

MASUZAWA, T.; SUZUKI, R.; YANAGIHARA, Y. Comparison of protective effects with tetra-valent glycolipid antigens and whole cell-inactivated vaccine in

experimental infection of *Leptospira*. **Microbiol Immunol**, 35, n. 3, p. 199-208, 1991. Comparative Study
Research Support, Non-U.S. Gov't.

MATSUO, K.; ISOGAI, E.; ARAKI, Y. Occurrence of [\rightarrow 3)-beta-D-Manp-(1 \rightarrow 4)-beta-D-Manp-(1 \rightarrow)]n units in the antigenic polysaccharides from *Leptospira biflexa* serovar patoc strain Patoc I. **Carbohydr Res**, 328, n. 4, p. 517-524, Oct 6 2000.

MERI, T.; MURGIA, R.; STEFANEL, P.; MERI, S. *et al.* Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospires. **Microb Pathog**, 39, n. 4, p. 139-147, Oct 2005. Comparative Study
Research Support, Non-U.S. Gov't.

MERIEN, F.; BARANTON, G.; PEROLAT, P. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. **Infect Immun**, 65, n. 2, p. 729-738, Feb 1997. Research Support, Non-U.S. Gov't.

MERIEN, F.; TRUCCOLO, J.; BARANTON, G.; PEROLAT, P. Identification of a 36-kDa fibronectin-binding protein expressed by a virulent variant of *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. **FEMS Microbiol Lett**, 185, n. 1, p. 17-22, Apr 1 2000. Research Support, Non-U.S. Gov't.

MIDWINTER, A.; FAINE, S.; ADLER, B. Vaccination of mice with lipopolysaccharide (LPS) and LPS-derived immuno-conjugates from *Leptospira interrogans*. **Journal of Medical Microbiology**, 33, n. 3, p. 199-204, 1990.

MIDWINTER, A.; VINH, T.; FAINE, S.; ADLER, B. Characterization of an antigenic oligosaccharide from *Leptospira interrogans* serovar pomona and its role in immunity. **Infect Immun**, 62, n. 12, p. 5477-5482, Dec 1994. Research Support, Non-U.S. Gov't.

MIERENDORF, R. C.; MORRIS, B. B.; HAMMER, B.; NOVY, R. E. Expression and Purification of Recombinant Proteins Using the pET System. *In*: RAPPLEY, R. (Ed.). **The Nucleic Acid Protocols Handbook**. Totowa, Nova Jersey, EUA: Humana Press Totowa 2000.

MORGAN, J.; BORNSTEIN, S. L.; KARPATI, A. M.; BRUCE, M. *et al.* Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. **Clinical Infectious Diseases**, 34, n. 12, p. 1593-1599, 2002.

MURRAY, G. L. The molecular basis of leptospiral pathogenesis. **Curr Top Microbiol Immunol**, 387, p. 139-185, 2015. Review.

MURRAY, G. L.; LO, M.; BULACH, D. M.; SRIKRAM, A. *et al.* Evaluation of 238 antigens of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo for protection against

kidney colonisation. **Vaccine**, 31, n. 3, p. 495-499, Jan 7 2013. Research Support, Non-U.S. Gov't.

MURRAY, G. L.; SRIKRAM, A.; HENRY, R.; HARTSKEERL, R. A. *et al.* Mutations affecting *Leptospira interrogans* lipopolysaccharide attenuate virulence. **Mol Microbiol**, 78, n. 3, p. 701-709, Nov 2010. Research Support, Non-U.S. Gov't.

NAHORI, M. A.; FOURNIE-AMAZOUZ, E.; QUE-GEWIRTH, N. S.; BALLOY, V. *et al.* Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. **J Immunol**, 175, n. 9, p. 6022-6031, Nov 1 2005. Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

NASCIMENTO, A. L.; KO, A. I.; MARTINS, E. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B. *et al.* Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **J Bacteriol**, 186, n. 7, p. 2164-2172, Apr 2004. Research Support, Non-U.S. Gov't.

NELSON, D. L.; COX, M. M.; LEHNINGER, A. L. **Lehninger principles of biochemistry**. Seventh edition. ed. 2013. 9781464126116

OCHIAI, M.; KATAOKA, M.; TOYOIZUMI, H.; YAMAMOTO, A. *et al.* Endotoxin content in *Haemophilus influenzae* type b vaccine. **Jpn J Infect Dis**, 57, n. 2, p. 58-59, Apr 2004. Research Support, Non-U.S. Gov't.

OMS. Assessment Report of the Global Vaccine Action Plan. 2018.

PATRA, K. P.; CHOUDHURY, B.; MATTHIAS, M. M.; BAGA, S. *et al.* Comparative analysis of lipopolysaccharides of pathogenic and intermediately pathogenic *Leptospira* species. **BMC Microbiol**, 15, p. 244, Oct 30 2015. Comparative Study.

PAYNE, J. W.; GILVARG, C. Size Restriction on Peptide Utilization in *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, 243, n. 6291-6299, p. 6291, 1968.

PELET, J. M.; PUTNAM, D. An in-depth analysis of polymer-analogous conjugation using DMTMM. **Bioconjug Chem**, 22, n. 3, p. 329-337, Mar 16 2011. Research Support, Non-U.S. Gov't.

pET System Manual. NOVAGEN. 1999.

PLANK, R.; DEAN, D. Overview of the epidemiology, microbiology and pathogenesis of *Leptospira* ssp. in humans. **Microbes and Infection**, 2, p. 1265-1267, 2000.

POULIQUEN, P.; CATILINA, P. Enquete de pharmacosurveillance aupres des medecins vaccineurs. **Rev Med Trav.** , 27, p. 83-88, 2000.

QI, X. Y.; KEYHANI, N. O.; LEE, Y. C. Spectrophotometric determination of hydrazine, hydrazides, and their mixtures with trinitrobenzenesulfonic acid. **Anal Biochem**, 175, n. 1, p. 139-144, Nov 15 1988. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

QUE-GEWIRTH, N. L. S.; RIBEIRO, A. A.; KALB, S. R.; COTTER, R. J. *et al.* A Methylated Phosphate Group and Four Amide-linked Acyl Chains in *Leptospira interrogans* Lipid A: The Membrane Anchor of an Unusual Lipopolysaccharide that Activates TLR2. **Journal of Biological Chemistry**, 279, n. 24, p. 25420-25429, 2004.

QUESENBERRY, M. S.; LEE, Y. C. A rapid formaldehyde assay using purpald reagent: application under periodation conditions. **Anal Biochem**, 234, n. 1, p. 50-55, Feb 1 1996. Comparative Study.

RAMOS, C. C. R.; ABREU, P. A. E.; NASCIMENTO, A. L. T. O.; HO, P. L. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 37, p. 1103-1109, 2004.

RAPPUOLI, R.; DE GREGORIO, E.; COSTANTINO, P. On the mechanisms of conjugate vaccines. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 116, n. 1, p. 14-16, Jan 2 2019. Comment.

REIS, R. B.; RIBEIRO, G. S.; FELZEMBURGH, R. D.; SANTANA, F. S. *et al.* Impact of Environment and Social Gradient on *Leptospira* Infection in Urban Slums. **PLoS Neglected Tropical Disease**, 2, n. 4, 2008.

REN, S. X.; FU, G.; JIANG, X. G.; ZENG, R. *et al.* Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. **Nature**, 422, n. 6934, p. 888-893, Apr 24 2003. Research Support, Non-U.S. Gov't.

RICALDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; VINETZ, J. M.; LEWIS, A. L. Expression of sialic acids and other nonulosonic acids in *Leptospira*. **BMC Microbiol**, 12, p. 161, Aug 1 2012. Research Support, N.I.H., Extramural.

RINEHART, C. L.; ZIMMERMAN, A. D.; BUTERBAUGH, R. E.; JOLIE, R. A. *et al.* Efficacy of vaccination of cattle with the *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjoprajitno component of a pentavalent *Leptospira* bacterin against experimental challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo type hardjo-bovis. **Am J Vet Res**, 73, n. 5, p. 735-740, May 2012. Randomized Controlled Trial.

ROSSOL, M.; HEINE, H.; MEUSCH, U.; QUANDT, D. *et al.* LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. **Crit Rev Immunol**, 31, n. 5, p. 379-446, 2011. Research Support, Non-U.S. Gov't Review.

SAMBROOK, J. F.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SAÚDE, M. D. **Casos confirmados de Leptospirose. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas de 2000 a 2018**. 2018a. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/agosto/03/Leptospirose-Casos-01-08-2018.pdf>. Acesso em: 03 de agosto.

SAÚDE, M. D. **Óbitos por Leptospirose. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2017**. 2018b. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/09/Leptospirose-2000-2017-obitos.pdf>. Acesso em: 03 de agosto.

SAÚDE, M. D. **Casos confirmados de Leptospirose. Brasil, Regiões e Unidades Federativas (residência). 2007-2019**. 2020a. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2020/fevereiro/07/casos-conf-lepto-2007-2019.pdf>. Acesso em: 21 de janeiro.

SAÚDE, M. D. **Óbitos por Leptospirose. Brasil, Regiões e Unidades Federadas (residência). 2007 - 2019**. 2020b. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2020/fevereiro/07/obito-lepto-2007-2019.pdf>. Acesso em: 21 de janeiro.

SCHEIN, C. H. Production of soluble proteins in bacteria. **Nature Biotechnology**, 7, 1989.

SCHWARZ, H.; SCHMITTNER, M.; DUSCHL, A.; HOREJS-HOECK, J. Residual endotoxin contaminations in recombinant proteins are sufficient to activate human CD1c+ dendritic cells. **PLoS One**, 9, n. 12, p. e113840, 2014. Research Support, Non-U.S. Gov't.

SHAFER, D. E.; TOLL, B.; SCHUMAN, R. F.; NELSON, B. L. *et al.* Activation of soluble polysaccharides with 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate (CDAP) for use in protein-polysaccharide conjugate vaccines and immunological reagents. II. Selective crosslinking of proteins to CDAP-activated polysaccharides. **Vaccine**, 18, n. 13, p. 1273-1281, Jan 18 2000. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

SHELDON, I. M.; DOBSON, H. Reproductive challenges facing the cattle industry at the beginning of the 21st century. **Reprod Suppl**, 61, p. 1-13, 2003.

SILVA, M.; CABRERA-CRESPO, J.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; MIYAJI, E. N. *et al.* Optimizing expression of *Streptococcus pneumoniae* surface protein a, PspA: serocross-reactivity within families of antisera induced against clades 1

and 3. **Mol Biotechnol**, 37, n. 2, p. 146-154, Oct 2007. Research Support, Non-U.S. Gov't.

SINGH, A.; UPADHYAY, V.; UPADHYAY, A. K.; SINGH, S. M. *et al.* Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. **Microb Cell Fact**, 14, p. 41, Mar 25 2015. Research Support, Non-U.S. Gov't
Review.

SMYTHE, L.; ADLER, B.; HARTSKEERL, B. A.; GALLOWAY, R. L. *et al.* Classification of *Leptospira* genomospecies 1, 3, 4 and 5 as *Leptospira alstonii* sp. nov., *Leptospira vanthielii* sp. nov., *Leptospira terpstrae* sp. nov. and *Leptospira yanagawae* sp. nov., respectively. **International Journal of Evolutionary Microbiology**, 5, 63, p. 1859-1862, 2013.

SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **Microb Cell Fact**, 4, n. 1, p. 1, Jan 4 2005.

STERN, E.; GALLOWAY, R.; SHADOMY, S. V.; WANNEMUEHLER, K. *et al.* Outbreak of leptospirosis among Adventure Race participants in Florida **Clinical Infectious Diseases**, 50, n. 6, p. 843-849, 2012.

STUDIER, W. F. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. **Protein Expression and Purification**, 4, p. 207-234, 2005.

TOMA, C.; MURRAY, G. L.; NOHARA, T.; MIZUYAMA, M. *et al.* Leptospiral outer membrane protein LMB216 is involved in enhancement of phagocytic uptake by macrophages. **Cell Microbiol**, 16, n. 9, p. 1366-1377, Sep 2014. Research Support, Non-U.S. Gov't.

TOMA, C.; OKURA, N.; TAKAYAMA, C.; SUZUKI, T. Characteristic features of intracellular pathogenic *Leptospira* in infected murine macrophages. **Cell Microbiol**, 13, n. 11, p. 1783-1792, Nov 2011. Comparative Study
Research Support, Non-U.S. Gov't.

TSAI, C. M.; FRASCH, C. E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. **Anal Biochem**, 119, n. 1, p. 115-119, Jan 1 1982.

TZIANABOS, A. O. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. **Clin Microbiol Rev**, 13, n. 4, p. 523-533, Oct 2000. Review.

VASCONCELOS, H. C. Environmental and socioeconomic factors related to the distribution of leptospirosis cases in the state of Pernambuco, 2001-2009. **Caderno de Saúde Coletiva**, 20, n. 1, p. 49-56, 2012.

VIEIRA, M. L.; ATZINGEN, M. V.; OLIVEIRA, R.; MENDES, R. S. *et al.* Plasminogen binding proteins and plasmin generation on the surface of

Leptospira spp.: the contribution to the bacteria-host interactions. **J Biomed Biotechnol**, 2012, p. 758513, 2012. Research Support, Non-U.S. Gov't.

VIEIRA, M. L.; DE MORAIS, Z. M.; GONCALES, A. P.; ROMERO, E. C. *et al.* Lsa63, a newly identified surface protein of *Leptospira interrogans* binds laminin and collagen IV. **J Infect**, 60, n. 1, p. 52-64, Jan 2010. Research Support, Non-U.S. Gov't.

VIEIRA, M. L.; FERNANDES, L. G.; DOMINGOS, R. F.; OLIVEIRA, R. *et al.* Leptospiral extracellular matrix adhesins as mediators of pathogen-host interactions. **FEMS Microbiol Lett**, 352, n. 2, p. 129-139, Mar 2014. Research Support, Non-U.S. Gov't
Review.

VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P.; SHRIRAM, A. N. Leptospirosis: an emerging global public health problem. **J Biosci**, 33, n. 4, p. 557-569, Nov 2008.

VINCENT, A. T.; SCHIETTEKATTE, O.; GOARANT, C.; NEELA, V. K. *et al.* Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. **PLoS Negl Trop Dis**, 13, n. 5, p. e0007270, May 2019. Research Support, Non-U.S. Gov't.

VINH, T.; FAINE, S.; ADLER, B. Adhesion of leptospires to mouse fibroblasts (L929) and its enhancement by specific antibody. **J Med Microbiol**, 18, n. 1, p. 73-85, Aug 1984. Research Support, Non-U.S. Gov't.

VIRIYAKOSOL, S.; MATTHIAS, M. A.; SWANCUTT, M. A.; KIRKLAND, T. N. *et al.* Toll-like receptor 4 protects against lethal *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae infection and contributes to in vivo control of leptospiral burden. **Infect Immun**, 74, n. 2, p. 887-895, Feb 2006. Research Support, N.I.H., Extramural.

WANG, Z.; JIN, L.; WEGRZYN, A. Leptospirosis vaccines. **Microb Cell Fact**, 6, p. 39, Dec 11 2007.

WERTS, C.; TAPPING, R. I.; MATHISON, J. C.; CHUANG, T. H. *et al.* Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. **Nature Immunology**, 2, n. 4, p. 346-352, 2001.

WESTPHAL, O.; JANN, K. Bacterial polysaccharides extraction with phenol-water and further applications of the procedure. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, 5, 1965.

XU, Y.; YE, Q. Human leptospirosis vaccines in China. **Hum Vaccin Immunother**, 14, n. 4, p. 984-993, Apr 3 2018. Research Support, Non-U.S. Gov't
Review.

YANG, C. W. Leptospirosis renal disease: understanding the initiation by Toll-like receptors. **Kidney Int**, 72, n. 8, p. 918-925, Oct 2007.

YURI, K.; TAKAMOTO, Y.; OKADA, M.; HIRAMUNE, T. *et al.* Chemotaxis of leptospire to hemoglobin in relation to virulence. **Infect Immun**, 61, n. 5, p. 2270-2272, May 1993.

ZHANG, L.; ZHANG, C.; OJCIUS, D. M.; SUN, D. *et al.* The mammalian cell entry (Mce) protein of pathogenic *Leptospira* species is responsible for RGD motif-dependent infection of cells and animals. **Mol Microbiol**, 83, n. 5, p. 1006-1023, Mar 2012. Research Support, Non-U.S. Gov't.