

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico - CDTec
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

LigA como vacina contra a leptospirose: Avaliação de diferentes estratégias vacinais

Karina Colonetti

Pelotas, 2012

KARINA COLONETTI

LigA como vacina contra leptospirose: Avaliação de diferentes estratégias vacinais

Trabalho acadêmico apresentado à ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador de Estágio: Samuel Rodrigues Félix

Orientador Acadêmico: Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Pelotas, 2012

Dados de catalogação na fonte:

Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB 10/1032

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

C719I Colonetti, Karina
LigA como vacina contra leptospirose: avaliação de
diferentes estratégias vacinais / Karina Colonetti. – 48f.:
II. color. – Monografia (Conclusão de curso).
Universidade Federal de Pelotas. Centro de
Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2012. –
Orientador Éverton Fagonde da Silva; co-orientador
Samuel Rodrigues Félix.

1.Biotecnologia. 2.Leptospirose. 3.Vacinas. 4.LigA.
I.Silva, Éverton Fagonde da. II.Félix, Samuel Rodrigues.
III.Título.

CDD:

614.56

Banca examinadora:

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva (Orientador), FV/UFPel

Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin, CDTec/UFPel

Prof. Msc. Samuel Rodrigues Félix, FV/UFPel

Dr. Leonardo Garcia Monte, CDTec/UFPel

Agradecimentos

A todos aqueles que tiveram fé na ciência que nós, da turma de biotecnologia de 2009, poderíamos fazer mesmo sem imaginar naquela época qual era o dogma central da biologia molecular.

Às agências de fomento, que contribuíram com a realização deste e de outros trabalhos.

Ao meu orientador Éverton Fagonde da Silva e ao meu co-orientador, Samuel Rodrigues Félix, que acreditaram em mim quando eu mesma não tinha tanta certeza. Obrigada pelo apoio, amizade, oportunidades e, sobretudo, ensinamentos. Desde como amarrar uma membrana de diálise, até análise de dados. E, claro, a explicação sobre o que é um Kerb.

A minha família, por todo o suporte desde... sempre. Ao meu pai Carlos, à minha mãe Luzia, ao meu irmão Cléber e aos meus avós Alda e Valdir (*in memoriam*), obrigado por todos os 'não'. Hoje percebo que a negação é tão importante quanto o aval. E obrigada por todo estímulo, que veio desde as HQs do 'zeca-carioca' lidas à beira do travesseiro.

Ao meu namorado, amigo e companheiro Gabriel, meu anjo, por toda a compreensão, paciência e auxílio nessa etapa da minha vida.

Aos meus amigos, daqui e de lá, Aline, Mariana, Carol, Fran, Walla, Manduca, Ivi, Amilton, Juliana, Samuel, André, Thaís, Michel e Najara por toda a ajuda e momentos juntos.

Aos meus colegas do Laboratório de Vacinologia pela convivência e pelo aprendizado.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho e da minha formação pessoal e acadêmica, em especial ao Prof. Alan J. McBride,

Obrigado!

Resumo

COLONETTI, Karina. **LigA como vacina contra leptospirose: Avaliação de diferentes estratégias vacinais**. 2012. 48f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

A leptospirose é uma das zoonoses mais disseminadas no mundo, possuindo um importante impacto socioeconômico. A vacinação é uma medida profilática empregada para diminuir o número de casos da doença em humanos e, mais comumente, em animais. No entanto, as vacinas disponíveis possuem limitações, pois induzem uma proteção sorovar-específica de curta duração, além de apresentarem reações adversas após a administração. Tendo em vista estas limitações, novas estratégias para o desenvolvimento de uma vacina contra a leptospirose têm sido empregadas, como o uso de antígenos recombinantes e de vacinas de DNA. Neste contexto, a proteína de membrana externa LigA foi utilizada como vacina de DNA empregando a estratégia de *prime-boost* homólogo e heterólogo para a análise do seu potencial protetor em hamsters (*Mesocricetus auratus*). Assim, o gene *ligA* foi clonado no vetor de expressão em eucariotos pVAX, propagado em *E.coli* DH5- α , purificado em larga escala para a obtenção das vacinas de DNA e transfectados em células HEK293 para análise funcional. Após a produção das vacinas, hamsters foram imunizados e a resposta imune avaliada através de ELISA e desafio com cepa virulenta homóloga. Após o desafio, os animais foram acompanhados diariamente quanto aos sinais clínicos e óbitos. Durante a necropsia, os órgãos foram analisados macroscopicamente e coletados para análises imunohistopatológicas e reisolamento do agente. Ao final dos experimentos, apenas machos vacinados com *prime-boost* heterólogo (40%) e homólogo (20%) sobreviveram ao desafio. Para fêmeas, somente um (16,7%) animal do grupo *prime-boost* homólogo sobreviveu. A técnica de *imprint* revelou que nenhum dos animais sobreviventes apresentou leptospiros nos órgãos analisados. As análises do ELISA revelaram níveis variáveis de anticorpos contra rLigA, não correlacionando com proteção. Dessa forma, conclui-se que embora a construção tenha sido funcional *in vitro*, a imunoproteção dos animais não foi significativa.

Palavras-chave: Leptospirose, vacinas recombinantes, hamster, *prime-boost*.

Abstract

COLONETTI, Karina. **LigA como vacina contra leptospirose: Avaliação de diferentes estratégias vacinais**. 2012. 48f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

Leptospirosis is a worldwide spread zoonosis with important socio-economic implications. Vaccination is used as a prophylactic measure to decrease the number of cases in humans and, more frequently, animals. However, available vaccines have substantial limitations due to serovar-specific, short term protection, besides presenting adverse reactions following administration. Owing to these limitations, new strategies to develop alternative vaccines against leptospirosis must be employed, such as the characterization of recombinant proteins and DNA vaccines. In this context, a DNA vaccine constructed with the outer membrane protein LigA was assessed using homologous and heterologous prime-boost strategies, seeking protective potential in the hamster model. Thus, the LigA gene was cloned into a eukaryotic expression vector pVax, propagated in DH5- α *E. coli* strain and purified in large scale to obtain the vaccinal doses. After vaccine production, hamsters were inoculated and the immune response assessed through ELISA and lethal challenge. After challenge, the animals were observed daily for clinical signs or death. During necropsy, macroscopic tissue alterations were noted and organs were harvested for histopathological assessment and leptospiral culture. At 21 days post-challenge, only males vaccinated with heterologous (40%) and homologous (20%) prime-boost strategies survived. One female (16.7%) of the homologous strategy also survived. None of the survivors had visible leptospire in the harvested organs in the imprint assay. The ELISA showed variable antibody levels against rLigA, end these did not correlate with protection. In this light, we have shown that, although the constructions were functional *in-vitro*, they were not capable of generating significant survival rates in the challenge assay.

Key words: Leptospirosis, recombinant vaccines, hamster, *prime-boost*.

Lista de Figuras

Figura 1	Transfecção de células HEK293.....	28
Figura 2	Caracterização da proteína recombinante LigANI por WB e SDS-PAGE.....	29
Figura 3	Gráficos de sobrevivência.....	30
Figura 4	Dados relativos à pesagem do grupo pLigA/rLigA + Al (OH) ₃	30
Figura 5	<i>Imprints</i> representativos de pulmão, fígado e rim positivos.....	30
Figura 6	Detecção de imunoglobulina G por ELISA indireto.....	33

Lista de Tabelas

Tabela 1	Trabalhos publicados sobre vacinas de DNA contra a leptospirose	21
Tabela 2	Imunizações.....	24
Tabela 3	Imunoproteção.....	30
Tabela 4	Técnica de imprint.....	31
Tabela 5	Crescimento de leptospiras a partir do macerado renal.....	32

Lista de abreviaturas e siglas

EMJH	Meio de cultivo Ellinghausen-McCullough modificado por Johnson-Harris
B.O.D	Estufa biológica
LB	Meio de cultivo Luria-Bertani
LigA	<i>Leptospiral immunoglobulin-like A</i>
LigANI	LigA fragmento não indêntico
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>Phosphate-buffered saline</i>)
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
SDS-PAGE	Eletroforese de gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
sp.	Espécie
spp.	Espécies
WB	<i>Western Blotting</i>
g	Força g

Sumário

1	Introdução	12
2	Revisão de literatura	13
3	Metodologia	22
3.1	Cepas, cultivo e bacterinas	22
3.2	Obtenção dos plasmídios e proteínas recombinantes	22
3.3	Transfecção de pVaxLigA em células HEK 293.....	23
3.4	Imunizações	24
3.5	Aspectos éticos	24
3.6	Modelo animal	25
3.7	Coleta de amostras biológicas e desafio	25
3.8	Histopatologia	26
3.9	Técnica de <i>imprint</i>	26
3.10	Reisolamento	26
3.11	ELISA indireto	27
3.12	Análises estatísticas.....	27
4	Resultados	28
4.1	Expressão e caracterização	28
4.2	Modelo animal	29
4.3	Histopatologia	31
4.4	Imprint	31
4.5	Reisolamento	32
4.6	ELISA indireto	32
5	Discussão	34
6	Conclusões e Perspectivas.....	37
6.1	Conclusões.....	37
6.2	Perspectivas.....	37
	Referências	38
	Apêndices.....	45

1 Introdução

A leptospirose é uma das zoonoses mais disseminadas e de maior impacto econômico e social no mundo, ocorrendo principalmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, com clima tropical e subtropical (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009), podendo ser causada por qualquer um dos mais de 260 sorovares patogênicos das espiroquetas do gênero *Leptospira* descritos até o momento (CERQUEIRA; PICARDEAU, 2009). A transmissão ocorre através do contato direto ou indireto com a urina dos animais infectados (ADLER; MOCTEZUMA, 2009).

A vacinação é uma medida empregada para diminuir o número de casos da doença em animais. No entanto, a vacina disponível é uma bacterina, ou seja, uma preparação de leptospiras inativadas e adjuvante (FAINE et al., 1999). Suas principais limitações residem no fato de induzirem proteção de curta duração apenas contra os sorovares presentes na formulação e apresentarem reações adversas após a administração (LEVETT, 2001). Tendo em vista estas limitações, novas estratégias vêm sendo desenvolvidas para a prevenção da leptospirose e outras enfermidades, como o estudo de vacinas com subunidades proteicas (ADLER; MOCTEZUMA, 2009) e vacinas de DNA (CUI, 2005). O princípio “*prime-boost*” é baseado em imunizações múltiplas, sejam elas homólogas, onde o ‘*prime*’ é semelhante ao ‘*boost*’ ou heterólogas, onde o ‘*boost*’ difere do ‘*prime*’ (LU, 2009). Aplicado à leptospirose, ainda existem poucos estudos nesta área.

O gene *ligA* é altamente conservado entre os sorovares patogênicos de *Leptospira* e codifica para uma proteína de fácil acesso ao sistema imune. Desta forma, o presente trabalho objetiva avaliar o potencial protetor deste segmento gênico quando administrado isoladamente (*prime-boost* homólogo) ou coadministrado com seu produto proteico (*prime-boost* heterólogo).

2 Revisão de literatura

A leptospirose é uma doença que acomete humanos e animais, principalmente caninos, bovinos e suínos, sendo causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*. Leptospiras são espiroquetas, com cerca de 0,1µm de diâmetro e 6-20µm de comprimento. O gênero *Leptospira* inclui espécies saprofiticas e patogênicas, o qual pertence à família *Leptospiraceae*, ordem *Spirochaetales* (FAINE et al., 1999).

Morfologicamente todas as leptospiras são indistinguíveis, mas a morfologia de isolados individuais varia com a subcultura *in vitro*, e pode ser restaurada por meio de passagem em modelos animais suscetíveis à doença, como o hamster (HAAKE, 2006). As leptospiras têm extremidades distintas, em forma de ganchos. Possuem estrutura de dupla membrana, na qual a membrana citoplasmática e a parede celular de peptidoglicano são intimamente associadas e estão revestidas pela membrana externa, rica em lipopolissacarídeos (LPS) (HAAKE, 2000). Dois flagelos periplasmáticos com inserções polares são responsáveis pela motilidade e as proteínas FlaA e FlaB constituem a bainha e o núcleo do flagelo, respectivamente (PICARDEAU, 2001). O genoma possui dois cromossomos circulares, um com 4279kb e o outro com 350kb. Não existem registros de plasmídeos para a espécie (ADLER; MOCTEZUMA, 2009).

Descrições de síndromes similares à causada pela leptospirose são descritas desde as antigas civilizações; porém, o primeiro relato clínico descrevendo a leptospirose nos tempos modernos foi realizado somente em 1886, quando o médico alemão Adolf Weil descreveu a forma grave da doença em humanos (KO et al., 2009), que ficou conhecida como síndrome ou doença de Weil.

A identificação do agente etiológico, no entanto, ocorreu somente em 1914, quando Inada e colaboradores obtiveram isolados de *Leptospira* por meio de um

estudo e infecção experimental, no qual inocularam em cobaias (*Cavia* sp.) o sangue de pacientes ictericos e febris (INADA, 1916; NOGUCHI, 1917). Ao analisarem o tecido hepático dos animais infectados, perceberam a presença de espiroquetas, a qual foi denominada *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* (INADA, 1916). Foi, ainda, pelo trabalho de 1916 do pesquisador japonês Noguchi, que o papel do rato na transmissão da doença para humanos foi elucidado (LEVETT, 2001). Após a publicação do trabalho de Inada, houve a confirmação da ocorrência da leptospirose por toda a Europa (LEVETT, 2001).

Em 1918, Noguchi e colaboradores conseguiram classificar o agente em um novo gênero, o qual foi denominado de *Leptospira*. Este gênero incluía leptospiros patogênicas, todas denominadas *Leptospira (Spirochaeta) icterohaemorrhagiae*, e também leptospiros saprófitas (isoladas em 1914, por Wolbach e Binger), devido a similaridades morfológicas. As leptospiros saprófitas foram todas agrupadas sob a denominação de *Spirochaeta biflexa* (NOGUCHI, 1918).

A divisão do gênero *Leptospira* foi feita em duas espécies e contava com uma subdivisão sorológica. As características antigênicas oriundas principalmente de antígenos de natureza lipopolissacarídica (LPS) da parede celular das leptospiros permitiu essa classificação, onde a unidade taxonômica do gênero é o sorovar. Os sorovares antigenicamente relacionados estão reunidos em sorogrupos (DIKKEN; KMETY, 1993). Tanto as espécies patogênicas quanto as saprófitas foram divididas em inúmeros sorogrupos e sorovares, avaliados e diferenciados através de reação de aglutinação cruzada com antígenos homólogos. Assim, duas cepas pertencerão a diferentes sorovares se, após a produção de antissoros e a adsorção cruzada destes com quantidades adequadas do antígeno heterólogo, mais de 10% do título homólogo permanecer regular em pelo menos um dos dois antissoros em testes repetidos (INTERNATIONAL COMMITTEE..., 1986).

Além dos critérios patológicos, a divisão das espécies do gênero também contava com critérios fenotípicos. A *Leptospira interrogans* possuía forma esférica quando as células eram colocadas por 2 h em uma solução de NaCl (1M) a 20-30°C; não cresciam a 13°C e ou na presença de 8-azaguanina (225mg.mL⁻¹). Já a *L. biflexa* não possuía forma esférica quando as células eram colocadas por 2h em uma solução de NaCl (1M) a 20-30°C, e poderiam ser cultivadas a 13°C na presença de 8-azaguanina (LEVETT, 2001; GOMES, 2012).

Em 1987, os estudos de hibridação de DNA impuseram o surgimento de outro sistema de classificação, pela comprovação de alta heterogeneidade entre os sorovares das espécies. A adoção da classificação baseada em componentes moleculares transformou as duas espécies anteriores em sete, cinco pertencentes à antiga *L. interrogans* e duas pertencentes à prévia *L. biflexa* (YASUDA et al., 1987), sendo elas: *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. meyeri*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. weilii* e *L. wolbachii*. Atualmente, 20 espécies estão descritas: as patogênicas *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasie*, *L. weilii*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. wolffii*, *L. broomii*, com cerca de 260 sorovares, e as saprófitas *L. kmetyi*, *L. wolbachii*, *L. meyeri*, *L. biflexa*, *L. vanthiellii*, *L. terpstrae* e *L. yanagawae* com cerca de 60 sorovares (CERQUEIRA; PICARDEAU, 2009).

Apesar da adoção da classificação genética para fins taxonômicos, ela ainda coexiste com a classificação sorológica, principalmente para finalidades epidemiológicas, a qual facilita a correlação com a fonte de infecção, já que os sorovares, na maioria das vezes, estão relacionados com hospedeiros específicos. Desta forma, o sorovar Canicola é comumente encontrado em cães, Bratislava em cavalos e suínos, Hardjo em bovinos e Australis e Pomona em suínos, Icterohaemorrhagiae em ratos (BERNARD, 1993; ELLIS et al., 1986; FONTAINE, 2006; ADLER; MOCTEZUMA, 2009; BHARTI et al., 2003). Porém, dependendo da região geográfica, um animal pode estar relacionado com um ou mais sorovares.

A leptospirose pode ser classificada como uma zoonose, visto que a transmissão entre humanos é praticamente inexistente, apesar de o doente eliminar a bactéria por semanas ou até por um ano. Os principais transmissores da leptospirose são os animais infectados, os quais podem manifestar a doença de forma aguda ou crônica, podendo carrear as leptospiras durante longos períodos e de forma assintomática (BHARTI et al., 2003), eliminando-as contínua ou intermitentemente (LEVETT; HAAKE, 2009). Geralmente, a transmissão ocorre por contato direto ou indireto com a urina dos animais carreadores, através de água, solo ou alimentos contaminados (BHARTI et al., 2003, LEVETT, 2001). Quando expostos a estas condições, as leptospiras penetram na corrente sanguínea pelas membranas mucosas ou conjuntivas, mesmo que intactas, ou pela pele com abrasões e cortes (LEVETT; HAAKE, 2009). Após esta etapa, o patógeno é capaz de se alojar em qualquer órgão, e sua apresentação clínica dependerá do sistema ou sistemas envolvidos (RATHINAM, 2002).

Assim, após as leptospirosas entrarem no corpo e passarem por uma fase de multiplicação na corrente sanguínea (leptospiremia), ocorre a invasão das barreiras teciduais, podendo invadir o sistema nervoso central e do humor aquoso. A migração transendotelial do patógeno é facilitada por uma vasculite sistêmica, o que ocasiona o amplo espectro clínico da doença, podendo ocorrer lesões vasculares graves, levando à hemorragia pulmonar, isquemia do córtex renal e tubular-epitelial, necrose celular, destruição da arquitetura hepática, levando à icterícia e lesão em nível celular do tecido, com ou sem necrose (AREAN, 1962). Pode haver, também, provavelmente pela ação de endotoxinas, miosites e placentites (ADLER, MOCTEZUMA, 2009). A patogênese da leptospirose ainda não é claramente compreendida.

No mundo, são estimados cerca de 500.000 casos anuais (HARTSKEERL et al 2011), embora a doença seja subdiagnosticada, em grande parte, por seus sintomas iniciais serem inespecíficos e por causa da limitada capacidade diagnóstica em locais onde a taxa de leptospirose é elevada (LEVETT; HAAKE, 1999; WHO, 1999). Em sua fase inicial, a leptospirose apresenta sintomas como febre, náuseas, dores de cabeça e indisposição, facilmente confundidos com outras doenças tropicais ou gripe (VINETZ, 2001), apresentando taxa de mortalidade em torno de 10%, e em seus estágios mais graves, quando as complicações são sistêmicas, com icterícia e falência renal, a taxa de mortalidade sobe para mais de 50% (McBRIDE et al 2005).

Inicialmente, a leptospirose foi relacionada com atividades ocupacionais como a medicina veterinária, trabalhadores de abatedouros, agricultores em plantações de arroz ou atividades em saneamento básico. Com a evolução dos equipamentos de segurança de uso individual, ou até mesmo com a evolução do maquinário agrícola, o risco ocupacional (nos países desenvolvidos) foi reduzindo com o passar dos anos. Entretanto, o processo de ocupação descontrolada dos centros urbanos, aliado a más condições de saneamento básico, sobretudo em países em desenvolvimento, fez com que a leptospirose humana fosse considerada na última década como uma zoonose emergente. Além disso, a doença tornou-se um grande problema em áreas rurais e em países tropicais, os quais contam com altos índices de pluviosidade aliados a uma grande diversidade de sorovares presentes (ADLER; MOCTEZUMA, 2009; BHARTI et al., 2003; KO; GOARANT,; PICARDEAU, 1999). No ambiente urbano, as medidas profiláticas são de difícil

implementação e passam, basicamente, por melhoras nas condições de saneamento básico e desratização (MONAHAN; CALLANAN; NALLY, 2009).

No mundo, apenas alguns países fazem uso da vacinação em humanos, tais como China, Cuba, França e Japão, ainda assim, em épocas endêmicas. Estas preparações, na maior parte dos casos, é composta por bacterinas, bactérias inativadas térmica ou quimicamente (SANCHES et al., 2002, MARTINEZ et al., 2004; KOIZUMI; WATANABE, 2005; YANAGIHA et al., 2007). No Brasil, não existe vacina contra a leptospirose disponível para humanos. Para animais, as vacinas contra a leptospirose são comercializadas, e, em sua composição, constam os sorovares que mais atingem a espécie à qual se destinam. Assim, vacinas para cães, por exemplo, contém, geralmente, mas não exclusivamente, os sorovares Canícola e Icterohaemorrhagiae (ADLER; MOCTEZUMA, 2009). Estas vacinas, em sua maior parte, previnem a disseminação renal do patógeno, mas existem relatos de cães imunizados transmitindo a doença para humanos. Ainda, o animal pode ser infectado por um dos sorovares que não está presente na composição da vacina (PRESCOTT, 2008).

Apesar de estar associada com a redução dos casos e uma eficácia maior que 70%, as vacinas compostas por bacterinas estão associadas a efeitos colaterais, sistêmicos e locais, como dor, febre, e, ainda, pode estar relacionada com doenças autoimunes, como a uveíte (FAINE et al., 1999, KOIZUMI; WATANABE, 2005, SANCHES et al., 2000). Estes foram os motivos que levaram a China a testar uma nova formulação para a vacina, passando a utilizar o envelope externo, a qual demonstrou menos efeitos colaterais e boa proteção quando comparado a bacterina (KOIZUMI; WATANABE, 2005). O Japão também utiliza tal formulação (YAN et al., 2003). Entretanto, independente da formulação, o meio de imunização atual ainda é sorovar-específico, oferece uma proteção de curta duração e frequentemente necessita de várias doses (*boosts*). Assim sendo, a procura por uma vacina que ofereça proteção com ausência de efeitos colaterais, efetiva contra a leptospirose aguda e crônica é altamente desejável (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). Atualmente, o foco está nas vacinas recombinantes, sejam elas de subunidade ou DNA, vetorizadas ou não.

As vacinas de subunidade possuem vantagens como a produção de poucos efeitos colaterais, porém, também estão tradicionalmente ligadas a uma baixa resposta imune. A fim de contornar este problema, adjuvantes moduladores de

resposta imune são comumente empregados nas formulações vacinais de vacinas de subunidade (McKEE et al., 2010). O adjuvante mais utilizado atualmente e o único permitido para a vacinação humana são os sais minerais de alumínio, tais como o hidróxido. Apesar de ser considerado um adjuvante pouco potente, o alumínio induz majoritariamente uma resposta Th2 (anticorpos IgG1) (LIU, 2010) e não está relacionada a série de problemas encontrados nos adjuvantes oleosos.

Vários trabalhos demonstram a potencialidade das vacinais de DNA para o desenvolvimento de uma formulação efetiva contra a leptospirose (BAOMIN, 2000; BRANGER, 2005; FAISAL et al., 2008; MANEWATCH, 2007; HE, 2008). As vacinas de DNA têm sido utilizadas para diversas doenças (CUI, 2005), com diversas vantagens associadas a sua produção (ULMER; WAHREN; LIU, 2006), estabilidade à temperatura ambiente (DEVON; WEINER, 2000), facilidade de administração (LIU; ULMER, 2005) aliados a um baixo custo de produção (BABIUK, 2000). Em poucos anos, a tecnologia de vacinas de DNA evoluiu de uma observação interessante a aplicação prática (LOWE; SHEARER; KENNEDDY, 2006). Vacinas gênicas já são utilizadas em cães para tratamento de melanoma com segurança e eficácia (DINIZ, 2010; GROSENBOUGH et al., 2011). A administração de uma única dose de plasmídeo pode proporcionar um amplo espectro de resposta imune, incluindo a ativação dos linfócitos T CD8+ e linfócitos T CD4+, os quais secretam citocinas e têm função reguladora na produção de anticorpos (KOWALCZYK; ERTL, 1999).

Para a leptospirose, na maioria dos animais, a resposta imune é predominantemente humoral (CHALLA, 2011; JOST, 1986). Entretanto, em bovinos, a estimulação via Th1 mostrou-se importante, indicando que a estimulação da resposta imune celular pode desempenhar um importante papel na imunidade contra o patógeno (BALDWIN et al, 2002). Essa hipótese vem sendo cada vez mais aceita diante da descrição do papel da resposta mediada por células contra *Leptospira*, baseada em Th1 CD4⁺ com produção de interferon gama (INF- γ) pelas células gama-delta ($\gamma\delta$ T) (KLIMPEL; MATTHIAS; VINETZ, 2003; NAIMAN et al., 2001).

Diferentes técnicas vacinais vêm sendo desenvolvida ao longo dos anos, e entre elas está o esquema de *prime-boost*, baseada em múltiplas doses do mesmo antígeno. Esta técnica foi utilizada pela primeira vez em 1992, em testes de vacinas em primatas não humanos contra o HIV, em sua versão homóloga, ou seja, duas doses apresentadas na mesma forma vacinal. O método do *prime-boost* heterólogo consiste na ativação de diversas vias imunológicas através de diferentes métodos

vacinais, com o mesmo antígeno. O princípio da utilização do *prime-boost* heterólogo é o estímulo das respostas imune humoral e celular simultaneamente, contornando problemas pertinentes ao uso de vacinas inativadas e de subunidade, as quais não são eficientes em eliciar uma resposta de células T. A vacinação através do *prime-boost* heterólogo fornece oportunidades tanto às abordagens tradicionais quanto às novas formas de imunização, ao provocar respostas imunes únicas, permitindo uma melhor imunogenicidade e/ou proteção (LU, 2009).

A publicação das sequências genômicas inteiras de sorovares patogênicos tem favorecido esclarecimentos acerca de fatores de virulência e possibilitado o desenvolvimento de estratégias baseadas no genoma, tornando possível a prospecção *in silico* de alvos potenciais (BULACH et al., 2006, CHOU et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2004; REM, 2003). A partir dos trabalhos de sequenciamento vários fatores de virulência foram identificados, incluindo as proteínas de membrana externa conhecidas como Lig (*Leptospiral immunoglobulin-like proteins*). As proteínas Lig possuem domínios da superfamília Big (*bacterial immunoglobulin-like*) repetidos em tandem, e são assim denominadas por pertencerem à família Lig, presente apenas em leptospiros patogênicos. Este grupo proteico conta com dois genes e um pseudogene em várias cepas, *ligA*, *ligB* e *ligC*, respectivamente, e sua expressão está diretamente relacionada com a virulência (MATSUNAGA et al., 2003). A expressão destes genes em culturas, particularmente no que se refere ao *ligA*, é relacionada com o número de passagens *in vitro*. Cultivos de alta passagem deixam de expressar a proteína; porém, *in vivo*, a expressão é aumentada. As condições de osmolaridade fisiológicas aumentam as taxa de expressão dos genes *lig* (MATSUNAGA et al., 2005). Imunologicamente, as proteínas Lig são majoritariamente reconhecidas pelo hospedeiro durante a infecção aguda (MATSUNAGA et al., 2003).

Choy et al. (2007) demonstraram que tanto LigA quanto LigB são capazes de ligarem-se a componentes da matriz extra celular e fibrinogênio, sendo considerados componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas adesivas da matriz celular (MSCRAMMs), envolvidos na interação com o hospedeiro. A diversidade de ligantes relatados a família Lig, poderiam, então, estar relacionados à diversos estágios da patogênese, os quais incluem processos críticos de adesão. A invasão dos túbulos distais, por exemplo, seria dada a partir da interação das proteínas Lig com colágeno tipo I no tecido conjuntivo e colágeno tipo

IV e laminina nas membranas basais. Assim, as leptospiras circulantes na corrente sanguínea poderiam ter acesso ao túbulo proximal no rim via glomérulos, onde a lâmina basal fica exposta ao sangue, podendo explicar porque há uma alta densidade de leptospiras naquele local. Ainda, tornariam as leptospiras mais vulneráveis a uma vacina que prevenisse a adesão celular, visto que isto comprometeria os estágios posteriores da infecção.

A LigA é uma proteína de membrana externa (OMP) de 130kDa, a primeira de leptospira a ser descrita como contendo 12 ou mais repetições em tandem e também é a primeira a ser expressa durante a infecção (PALANIAPPAN et al., 2002). Possui 1224 aminoácidos e pode ser dividida em dois segmentos, levando em conta sua similaridade com LigB. A parte inicial, de seis domínios N- terminais, é muito similares a presente na proteína LigB. A segunda parte, composta de seis domínios carboxi-terminais é única (KOIZUMI; WATANABE, 2004), dando origem ao termo LigANI, correspondendo aos nucleotídeos 1873-3675, referente aos aminoácidos 625-1224 (SILVA et al., 2007). Está presente de forma conservada em leptospiras patogênicas, embora não seja encontrada em todas as espécies. Até agora, identificou-se LigA apenas em *L. interrogans* e *L. kirschneri* (MCBRIDE et al, 2009). *L. interrogans* sorovar Lai é o único isolado desta espécie no qual LigA não foi encontrado (REM et al, 2003). Ainda, a diversidade genética dos genes *lig* tem importantes implicações na seleção de peptídeos utilizados para fins vacinais e diagnósticos (MCBRIDE et al., 2009).

O segmento gênico codificador para LigA tem sido extensivamente estudado para fins vacinais, tanto por sua localização na membrana externa, o que o torna acessível para o sistema imune, quanto por sua similaridade entre as espécies patogênicas, o que potencializa a obtenção de uma proteção cruzada. Os resultados de testes de imunoproteção relatados para LigA apresentadas de diversas formas são variáveis, com sobrevivência de 50 a 100% (FAISAL et al., 2008, KOIZUMI; WATANABE, 2004; PALANIAPPAN et al., 2006; SILVA et al., 2007).

Um dos mais recentes trabalhos na área utilizou vários segmentos da proteína com o intuito de identificar quais os domínios mais fortemente ligados à imunoproteção. Como resultado, encontrou-se que são necessários para a imunoproteção os domínios 11 e 12 acompanhados de um terceiro domínio, podendo ser os domínios 10 ou 13 (COUTINHO et al., 2011).

Até o momento, apenas cinco trabalhos foram publicados utilizando vacinas de DNA contra a leptospirose, listados na tabela 1.

Tabela 1. Trabalhos publicados com vacina de DNA contra a leptospirose.

Segmento gênico	Modelo animal	Imunoproteção	Referência
LipL32	Gerbil	Proteção parcial	Branger et al., 2005
FlaB2	Cavia	Proteção parcial	Baomin et al., 2000
LigA truncada	Hamster	Sobrevivência alta dos controles	Faisal et al., 2008
OmpL1	Hamster	Sobrevivência 30%	Manewatch et al, 2007
LipL21	Cavia	Todos os animais sobreviveram	He et al, 2008

As vacinas de DNA apresentam algumas desvantagens como limitação a imunógenos proteicos, possibilidade de produção de anticorpos contra o DNA e possibilidade de tolerância ao antígeno, mas estes trabalhos demonstram a potencialidade das vacinas para o desenvolvimento de uma vacina efetiva contra a leptospirose. Mais estudos necessitam ser feitos a fim de se conhecer a melhor formulação assim como as características imunes geradas por este tipo de vacina.

Atualmente, muitos dos trabalhos sobre vacinas para leptospirose são feitos em *Mesocricetus auratus*, tradicionalmente conhecido como hamster sírio capa dourada. Embora as cepas patogênicas de leptospira tenham a capacidade de infectar uma grande variedade de animais, o hamster sírio é o preferido por ser suscetível à infecção e também por apresentar resultados com melhor reprodutibilidade (HAAKE, 2006). O curso da infecção é muito parecido com o verificado em humanos, o modelo sofre de infecção aguda, apresentando síndrome pulmonar hemorrágica associada à leptospirose, além de ser bem caracterizado para a doença e aceito por órgãos regulatórios para testes de vacinas comerciais (DELLAGOSTIN et al., 2011).

3 Metodologia

3.1 Cepas, cultivo e bacterinas

A cepa *L. interrogans Icterohaemorrhagiae* sorovar Copenhageni FIOCRUZ L1-130 (NASCIMENTO et al., 2004) foi utilizada em todas as etapas. As bactérias foram cultivadas a 30°C em meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) (Difco Laboratories®) enriquecido com 10% de suplemento comercial (Difco®) em estufa bacteriológica (B.O.D) sob condições aeróbicas. A contagem de células foi realizada em câmara de *Petroff-Hausser* (Thomas Scientific®).

A fim de obter bacterinas para a vacinação dos animais, 1×10^8 células de *L. interrogans* cepa L1-130 foram inativadas por calor, a 56°C por 30min, centrifugadas a 10.000xg por 10min e lavadas duas vezes com PBS estéril e ressuspensos em 200µL de PBS estéril.

3.2 Obtenção dos plasmídios e proteína recombinante

O plasmídio pVax/LigA para as vacinas de DNA foram obtidos em parceria com a FIOCRUZ, Laboratório de Tecnologia Recombinante- LATER, Biomanguinhos. Após a caracterização das vacinas de DNA mediante sistema eucarioto, os plasmídios foram novamente propagados em cepa *E. coli* DH5-α, em meio LB com canamicina em sistema de larga escala (500ml) e purificados com o kit *NucleoBond® Xtra Maxi Plus* (Macherey - Nagel), armazenados a -20°C.

Para o sistema de expressão heterólogo visando a obtenção da proteína rLigANI, utilizou-se a cepa de *E. coli* TOP10F (Invitrogen®) transformada com o plasmídeo pET100 (Invitrogen®) com o inserto genômico codante para LigA (domínios 7 a 13), conforme descrito por Silva et al., (2007) crescida em meio LB suplementado com $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de ampicilina e induzidos com IPTG, quando

necessário. O cultivo foi centrifugado, o pellet ressuspendido em solução de lise com ureia e a purificação da proteína foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sepharose, utilizando o sistema AKTAPrime (GE Healthcare®). Após o processo, procedeu-se a diálise com PBS durante 48h. Para todas as cepas de *E. coli* utilizadas, as condições de cultivo foram 37°C, 200 rpm.

3.3 Transfecção de pVaxLigA em células HEK293

A caracterização foi realizada pela transfecção de células HEK293 com o plasmídeo para sistema de expressão eucarioto pVax (Invitrogen®), sem o inserto codante e com o inserto codante para LigA (pVAX/LigA) em uma placa de seis cavidades utilizando Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen®) de acordo com o protocolo do fabricante. Inicialmente, 1,5µL de Lipofectamine® 2000 e 36µL de meio livre de soro foram misturados e incubados por 5 min a temperatura ambiente e 500ng de DNA foi adicionado e incubado a 20 min. Após, outros 500µL de meio livre de soro foi adicionado e a mistura final foi incubada em placa de seis cavidades a 37°C. Quarenta e oito horas depois da transfecção, as células foram lavadas duas vezes com PBS gelado e lisadas com tampão de lise contendo SDS (Tris 50mM, pH 6,8, DTT 50mM, SDS 2%, glicerol 10%, PMSF 100µg.µL⁻¹, leupepetina 10µg.µL⁻¹ e bromofenol blue 0,1%) por 10min no gelo. Os lisados celulares foram fervidos e centrifugados a 12.000 x g a 4°C por 10min. As soluções do sobrenadante foram coletadas e analisadas por *Western Blotting* (WB) (SAMBROOK; RUSSELL, 2001), utilizando anticorpo anti-LigA conjugado com peroxidase e revelação com DAB/H₂O₂.

3.4 Imunizações

As doses vacinais foram compostas de 100µg de DNA plasmidial com ou sem o inserto gênico LigA (131-1224aa) ou 40µg de rLigANI (625-1224 aa). Os imunógenos foram injetados pela via intramuscular, duas vezes, com um intervalo de 14 dias entre as doses. Todas as doses foram ajustadas para um volume final de 200µL. A tabela 2 apresenta os dados referentes às doses recebidas pelos animais conforme o grupo a que pertenciam.

Tabela 2. Imunizações. Doses utilizadas por animal, conforme grupo.

Grupo	1ª dose	2ª dose
1 Bacterina	10 ⁸ células em PBS	10 ⁸ células em PBS
2 PBS	200µL PBS	200µL PBS
3 pVax	100µg pVax	100µg pVax
4 pVax / Al(OH)₃	100µg pVax	15% Al(OH) ₃
5 pLigA	100µg pLigA	100µg pLigA
6 pLigA / rLigA+ Al(OH)₃	100µg pLigA	40µg rLigA + 15% Al(OH) ₃

3.5 Aspectos éticos

Este trabalho faz parte de um projeto cadastrado no COCEPE/UFPel sob o número 5.00.00.019 e analisado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPel, processo nº 23110.004657/2010-84. Os animais utilizados neste trabalho foram tratados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Além disso, o laboratório de Biologia Molecular (CDTec) possui Certificado de Qualidade em Biossegurança nº0081/98.

3.6 Modelo animal

Para os ensaios de imunoproteção utilizaram-se hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*) com quatro semanas de idade, de ambos os sexos, mantidos em regime de nutrição *ad libitum*. Os animais foram alocados em seis grupos distintos, conforme a vacina recebida. Assim, foram formados cinco grupos de seis animais e um grupo de quatro animais (PBS) para fêmeas e (n=34) e cinco grupos de cinco animais e um grupo de quatro animais (PBS) para machos (n=29). Todos os animais foram mantidos no Biotério Central da UFPel em estantes ventiladas, acondicionados em mini-isoladores. Após o desafio, os animais foram monitorados diariamente em relação ao seu comportamento, ao aparecimento de sinais clínicos e ao peso.

3.7 Coleta de amostras biológicas e desafio

Os animais foram submetidos ao desafio 14 dias após a segunda dose vacinal (dia 28). A dose-desafio foi composta de 5×10^2 leptospiiras vivas, de baixa passagem, administrada intraperitonealmente.

Amostras de sangue total foram coletadas em três ocasiões: no dia 0, pré-imunização, no dia 14, antes da segunda dose e no dia 28, precedendo o desafio. As coletas de sangue foram realizadas por flebotomia do plexo retro-orbital. O material foi depositado em microtubos com 15 μ L de EDTA 10%. O sangue foi centrifugado durante 5min a 3000xg para a separação do plasma, o qual foi armazenado sob a -20°C, até a utilização para os ensaios de ELISA.

Rim, fígado e pulmão foram coletados de todos os animais para a análise histopatológica e armazenados em nitrogênio para posterior análise de danos teciduais e celulares. Os animais sobreviventes, 24 dias pós desafio, tiveram os mesmos órgãos coletados, mas um segmento dos órgãos foi armazenado também em formol 10% para impregnação com nitrato de prata.

3.8 Histopatologia

As amostras histológicas coletadas e armazenadas em nitrogênio foram seccionadas por criomicrotomia e coradas com hematoxilina-eosina (HE) para análise do dano tecidual.

As amostras armazenadas em formol 10% foram submetidas a impregnação por prata, com a finalidade de visualizar a presença de leptospiiras no órgão, cobrindo possíveis falhas da técnica de *imprint*, pelo método Levaditi (BRANDESPIM et al., 2003). Resumidamente: a partir da armazenagem em formol 10%, o material foi lavado em água e embebido em álcool etílico absoluto por um dia e então colocado em água até o tecido afundar. O tecido foi impregnado com nitrato de prata 2% a 37°C por quatro dias, trocando a solução diariamente. Lavou-se o tecido em água destilada e em solução redutora. Após novas lavagens com água destilada, o órgão foi desidratado em álcool (50, 70, 80, 90 e 99°GL), diafanizado e incluído em parafina, cortado com lâmina 5 μ m, desparafinado com xilol e montado em resina sintética.

3.9 Técnica de *imprint*

Rim, fígado e pulmão de todos os animais foram coletados e a técnica de *imprint* foi realizada conforme descrito anteriormente por Chagas Júnior et al. (2009). Brevemente, os órgãos foram cortados ao meio e pressionados sobre as lâminas preparadas com poli-L-lisina e fixadas com acetona. Foram, então, hidratadas três vezes e bloqueadas com solução de BSA 0,4% por 40 min. Após lavagem, as lâminas foram cobertas com anticorpo anti-leptospira inteira, produzido em coelhos e incubadas durante 1h. Lavaram-se as lâminas e adicionou-se anti-coelho conjugado a FIT-C. após novo período de incubação, as lâminas foram lavadas e montadas para a leitura em microscópio de campo escuro.

3.10 Reisolamento

O rim esquerdo de todos os animais destinou-se à cultura. O rim esquerdo foi coletado e macerado. O macerado do órgão foi incubado durante uma hora em meio EMJH suplementado em estufa B.O.D a 37°C. Após este período, 500µL de sobrenadante foram passados para novos tubos falcon contendo meio EMJH fresco. As culturas são avaliadas semanalmente, a partir do 20^o dia em cultura. A avaliação prosseguirá até a décima semana.

3.11 ELISA indireto

Para o ELISA indireto, 10 µL do soro de cada um dos animais que compunham os seis diferentes grupos originaram o *pool* do grupo correspondente. Este *pool* foi utilizado para todos os ensaios deste tipo. Inicialmente, microplacas de 96 poços foram sensibilizadas com 50ng do antígeno por cavidade. A etapa de sensibilização ocorreu *over night* a 4°C. Após essa etapa, as placas foram lavadas com PBS-T por três vezes, e bloqueadas por 1h a 37°C com solução de lavagem adicionada de leite em pó desnatado 1%. Novas lavagens foram realizadas e os soros diluídos (1:100) foram adicionados às cavidades e mantidos à 37°C por mais uma hora. Após novas lavagens, adicionou-se conjugado anti-IgG total de hamster sírio (1:6000), seguindo-se uma nova etapa de incubação, nas condições

previamente citadas. Após cinco lavagens, solução de revelação foi adicionada às placas. Depois de um período de incubação de 15min à temperatura ambiente, a reação foi parada com ácido sulfúrico 2M. As densidades ópticas foram obtidas a 492nm.

3.12 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas e os gráficos de sobrevivência foram realizados no programa *Prisma 4 for Windows* versão 4.03. O teste de Fisher foi utilizado para a análise de mortalidade e o *LogRank Test* foi utilizado para a análise de sobrevivência. O Teste *T de Student* foi utilizado para a análise do ELISA.

4 Resultados

4.1 Expressão e caracterização

A técnica de WB para a caracterização das construções plasmidiais em células HEK 293 apresentaram as massas moleculares esperadas para rLigA (131-1224), tanto no extrato celular quanto no sobrenadante. Nenhuma banda foi verificada nos controles de células transfectadas com o vetor sem o inserto ou não transfectadas (figura 1). Resultados condizentes com o esperado também foram observados na caracterização da proteína rLigA (625-1224), tanto por WB quanto por SDS-PAGE (figura 2). Estes resultados confirmaram a expressão celular da vacina de DNA, bem como o reconhecimento das proteínas recombinantes pelos anticorpos anti-rLigA ou anti-cauda de histidina.

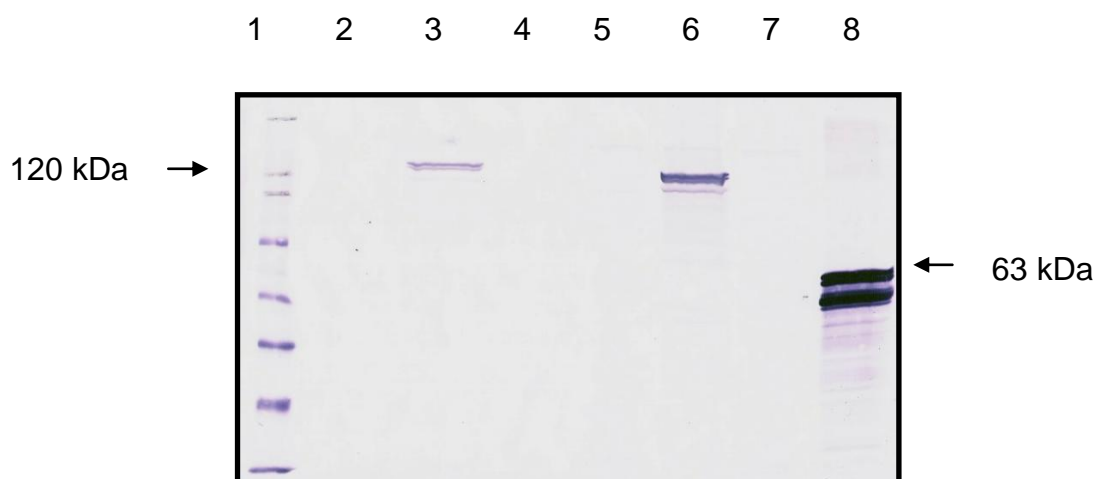


Figura 1. Transfecção de células HEK 293. WB com anticorpo monoclonal anti-LigA conjugado com peroxidase. Coluna 1, marcador molecular Magic Mark (Invitrogen®); coluna 2, sobrenadante pVAX; coluna 3, sobrenadante pVAX/LigA; coluna 4, sobrenadante do controle de células; coluna 5, extrato celular de pVAX; coluna 6, extrato celular de pVAX/LigA; coluna 7, extrato celular do controle das células; coluna 8, 500ng de LigANI (controle positivo).

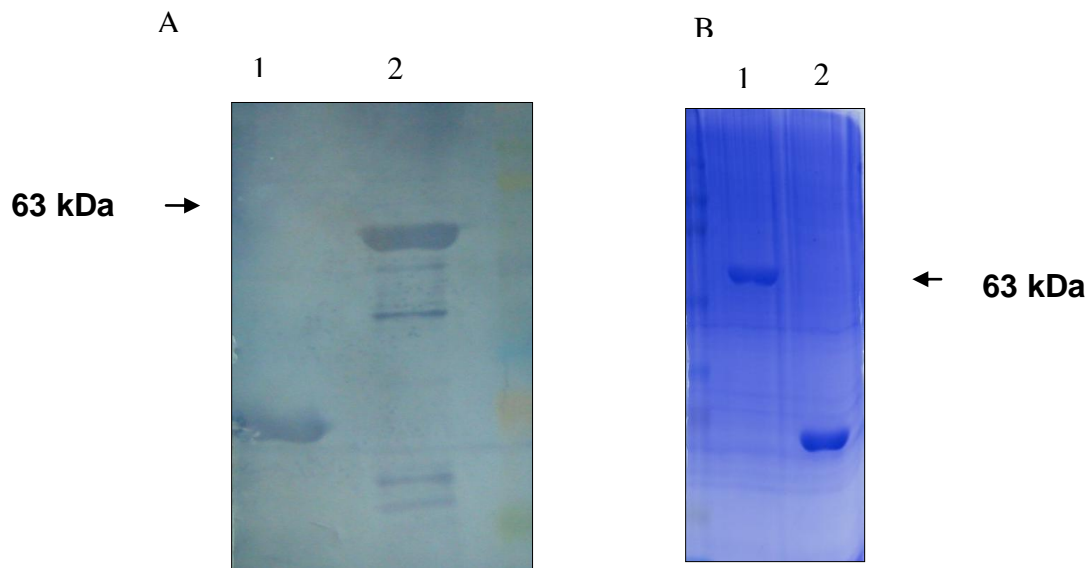


Figura 2. Caracterização da proteína recombinante LigANI por WB e SDS-PAGE. (A) WB com anticorpo monoclonal anti-cauda poli-histidina conjugado com peroxidase (Sigma) na diluição 1:3000. As bandas foram reveladas com DAB/H₂O₂, onde: Coluna 1 (C+), LipL32 (32 kDa), coluna 2, LigANI (63 kDa). (B) SDS-PAGE 12% corado com Comassie Blue, mostrando o resultado da purificação das proteínas recombinantes. Coluna 1, LigANI com 63 kDa e Coluna 2, LipL32 (32 kDa, C+).

4.2 Modelo animal

Todos os animais desafiados apresentaram sinais clínicos para a doença. Os animais que vieram a óbito entre o nono e o décimo quarto dia pós-desafio apresentaram perda de peso de aproximadamente 10% do seu máximo atingido. A tabela 3 e a figura 3 demonstram os dias para óbito e a sobrevivência, enquanto a figura 4 é demonstrativa para os dados das pesagens, onde pode ser verificada a queda de peso brusca que antecede o óbito. Todos os animais do grupo PBS vieram a óbito, enquanto todos os animais do grupo bacterina sobreviveram ao desafio letal.

Tabela 3. Sobrevivência conferida pela imunização com o método *prime-boost* contra desafio letal em hamster.

Grupos	Sobreviventes/Total (%)		Dias para óbito	
	M	F	M	F
pVax	0/5 (0)	0/6 (0)	9,9,10,10,11	9,9,10,10,10,14
pVax / Al(OH) ₃	0/5 (0)	0/6 (0)	9,9,9,9,13	9,10,10,10,11,13
pVaxLigA	1/5 (20)	0/6 (0)	9,10,10,11	10,10,10,10,11,11
pVaxLigA/rLigA + Al(OH) ₃	2/5 (40)	1/6 (16,7)	10,10,11	10,10,11,11,11

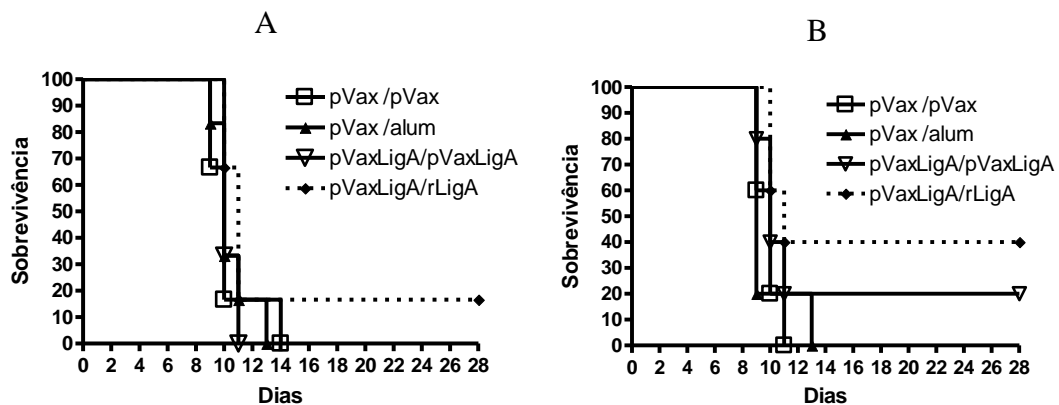


Figura 3. Gráficos de sobrevivência. (A) fêmeas (B) machos. O eixo vertical representa a sobrevivência em porcentagem.

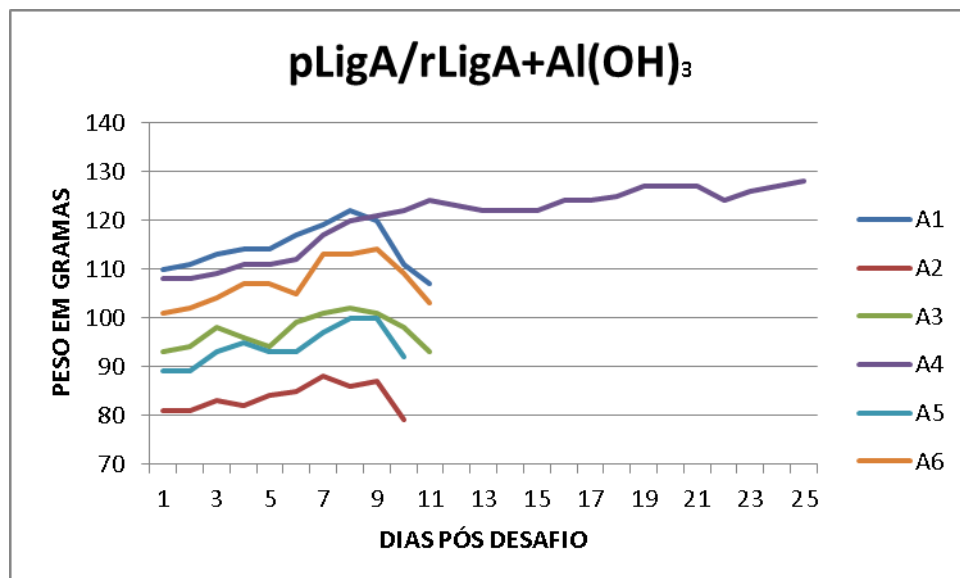


Figura 4. Dados relativos à pesagem do grupo pLigA/rLigA + Al (OH)₃. A figura é demonstrativa para o comportamento do peso dos animais que vieram a óbito. Observa-se declínio de aproximadamente 10% do peso de todos os animais, exceto no animal 4, o único sobrevivente do grupo.

4.3 Histopatologia

Macroscopicamente, todos os animais que vieram a óbito entre o nono e o décimo quarto dia pós-desafio apresentaram sinais típicos para a leptospirose aguda. Os dados referentes à histopatologia dos tecidos coletados ainda estão em andamento.

4.4 Técnica de *imprint*

Para os animais sobreviventes dos grupos 3 e 4 não foi detectada a presença de leptospiras em qualquer um dos órgãos analisados. Para o grupo bacterina, detectou-se presença de leptospiras nos rins para dois animais e no pulmão em um animal. A tabela 4 explicita os resultados da técnica enquanto a figura 5 é representativa para os resultados encontrados nos três órgãos.

Tabela 4. Técnica de *imprint*. *Imprints* positivos por órgão e grupo vacinal, em números absolutos e separados por sexo.

Grupo	Rim		Fígado		Pulmão		Tot de +	
	M	F	M	F	M	F	M	F
1 Bacterina	1/5	1/6	0/5	0/6	0/5	1/6	1/5	2/6
2 PBS	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	4/4	4/4
3 pVax	5/5	6/6	5/5	6/6	5/5	6/6	5/5	6/6
4 pVax / Al(OH)₃	5/5	6/6	5/5	6/6	5/5	6/6	5/5	6/6
5 pVaxLigA	4/5	6/6	3/5	6/6	2/5	6/6	4/5	6/6
6 pVaxLigA/rLigA + Al(OH)₃	3/5	5/6	2/5	5/6	3/5	4/6	3/5	5/6

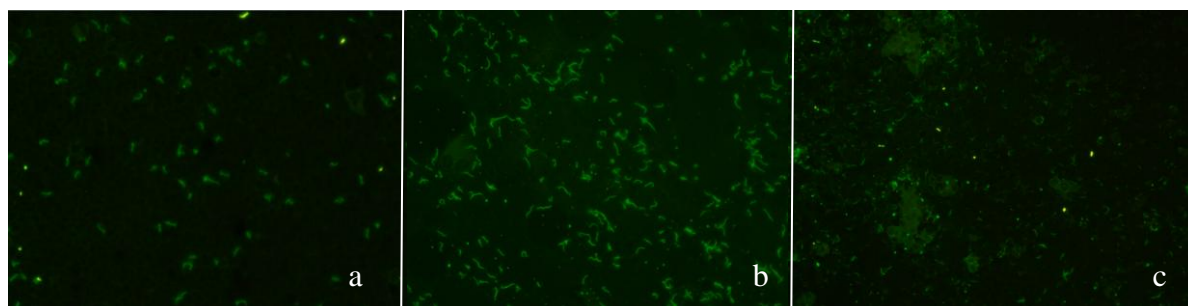


Figura 5. Técnica de *imprint*. Fotos representativas de pulmão (a), fígado (b) e rim positivos (c), observadas em microscópio de fluorescência.

4.5 Reisolamento

Os dados apresentados correspondem a dados parciais, referente ao acompanhamento durante duas semanas após o fim do experimento. Podem-se verificar os dados parciais conforme grupo e sexo na tabela 5.

Tabela 5. Crescimento de leptospiras em cultivo a partir do macerado renal (positivos/total).

Grupo	Machos	Fêmeas	Tempo em cultura*
1 Bacterina	0/5	0/6	2
2 PBS	2/4	2/4	4
3 pVax	3/5	6/6	4
4 pVax / Al(OH) ₃	1/5	5/6	4
5 pVaxLigA	3/5	4/6	4
6 pVaxLigA/rLigA + Al(OH) ₃	3/5	4/6	4

* Tempo de cultura em semanas. Todos os negativos tem tempo de cultura igual a duas semanas.

4.6 ELISA

Para as fêmeas, a resposta imune humoral para IgG total apresentou diferença estatística entre os dias 14 e 28 ($p=0,01$) dos grupos vacinados com pLigA/rLigA e pVax/Alum, havendo, também, diferença estatística entre os dias 0 e 14 ($p=0,01$) e 14 e 28 ($p=0,04$) do grupo vacinado com pLigA/rLigA. Não houve resposta humoral significativamente relevante entre os grupos que receberam

apenas vacinas de DNA, quando comparado ao seu controle, tanto para machos quanto para fêmeas. Em machos também não foi verificada diferença estatística entre quaisquer grupos ou dias (figura 6).

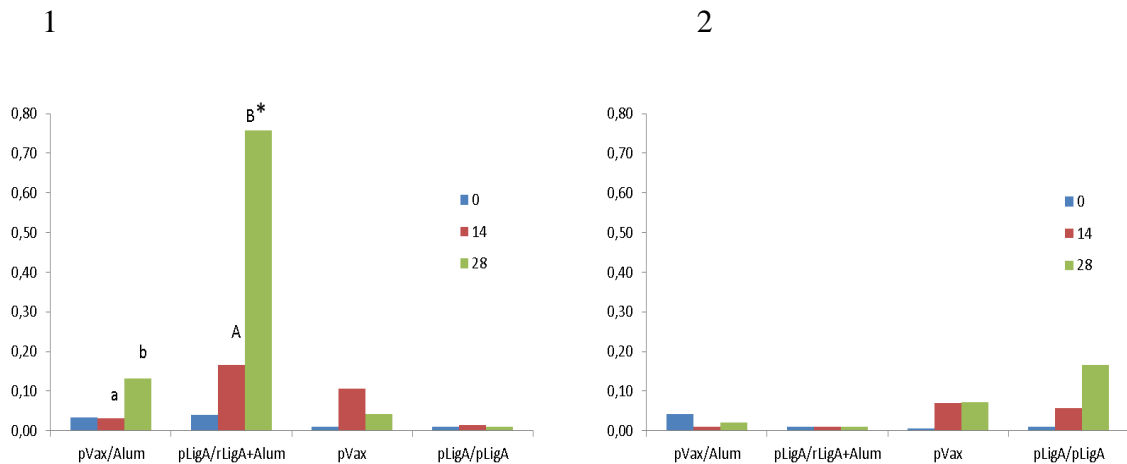


Figura 6. Detecção de imunoglobulina G por ELISA indireto. (1) ELISA IgG total de fêmeas. Letras em iguais representadas em caixas diferentes representam diferença estatística ($p=0,01$). O símbolo * representa diferença estatística entre as respostas desenvolvidas pelas doses dentro do grupo, nos dias 0 e 14 ($p=0,01$); 14 e 28 ($p=0,04$). (2) ELISA IgG total de machos. Não houve diferença estatística entre quaisquer grupos.

5 DISCUSSÃO

A *Leptospira* tem como principais hospedeiros os roedores, os quais podem transmitir o patógeno para animais domésticos e também para humanos. (FAINE, 1999; LEVETT, 2001). Em animais, a leptospirose está relacionada com quedas reprodutivas e de conversão alimentar. Apesar de ser uma doença com índices de mortalidade em torno de 10%, ela está relacionada com uma alta morbidade, inclusive para humanos.

Vários trabalhos têm sido publicados indicando o potencial das proteínas LipL32, LigB e LigA, as quais são proteínas de membrana externa consideradas como candidatas ao desenvolvimento de uma vacina contra a leptospirose. As proteínas da família Lig, em especial LigA e LigB apresentaram os melhores resultados até o momento em experimentos de imunoproteção (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). Dessa forma, nosso estudo realizou a abordagem para avaliar o potencial imunogênico de LigA, utilizando vacinas de DNA e *prime-boost*.

A vacinação com DNA têm sido testada contra vários patógenos, apresentando resultados promissores (CUI, 2005). A resposta imune específica a um antígeno pode ser estimulada pela inoculação intramuscular de um plasmídeo contendo DNA exógeno expresso. Desta maneira, vacinas de DNA podem induzir uma resposta imune significativa tanto celular como humoral sem a adição de nenhum adjuvante (LIU; ZHANG; ZHAO, 2010).

Atualmente, não existe uma vacina contra a leptospirose humana aceita mundialmente. Na área animal, a vacinação é empregada desde a década de 50 (FAINE et al., 1999). Porém, novas estratégias têm sido utilizadas para a diminuição da disseminação das leptospirosas patogênicas entre os rebanhos, devido às grandes perdas econômicas causadas pelas infecções. Assim, a prioridade está sendo no

desenvolvimento de vacinas que gerem uma resposta imune efetiva e inibam a eliminação de leptospiras através da urina (DELLAGOSTIN et al., 2011).

A imunidade estéril é um marcador secundário muito importante em avaliações de candidatos vacinais, tendo em vista que as vacinas comerciais utilizadas em animais não previnem a leptospirúria (ADLER; MOCTEZUMA, 2009). O isolamento através da cultura é considerado o padrão-ouro na detecção direta de leptospiras em amostras biológicas (WHO, 2003). Entretanto, uma série de fatores pode prejudicar a eficácia e viabilidade da detecção de leptospiras na cultura (FAINE, 1999; LEVETT, 2001; PALANIAPPAN et al., 2005; ADLER e MOCTEZUMA, 2009), entre elas, a presença de contaminantes, o que ocasiona potenciais falsos negativos.

A técnica de Levaditi, em conjunto com a técnica de *imprint* e cultura do macerado renal potencializa a detecção do microorganismo. O *imprint*, como se sabe, é uma técnica que só identifica leptospiras inteiras e não diferencia leptospiras viáveis de não viáveis (CHAGAS JÚNIOR, 2009). Além disso, a avaliação macroscópica durante a necropsia e a análise histopatológica realizada em órgãos como pulmões, fígados e rins, pode determinar padrões de manifestações patológicas semelhantes ao que ocorrem em humanos e animais ou, até mesmo, determinar novos padrões de ocorrência relacionados a novos sorovares (ATHANAZIO et al., 2008).

No grupo bacterina, houve presença de leptospiras no *imprint* renal de dois animais e no *imprint* pulmonar de um animal. O candidato vacinal, apesar de não ter protegido os animais da morte de forma estatisticamente relevante, se mostrou eficiente, por hora, em prevenir a colonização dos órgãos dos animais sobreviventes. Estes resultados poderão ser confirmados por outras técnicas em andamento, como a análise histopatológica, Levaditi e cultura renal. Independente de presença de leptospiras nos animais sobreviventes dos grupos vacinais, avaliar-se-á se o dano ocasionado aos tecidos foi de mesma intensidade dos ocorridos nos grupos controle.

O nosso grupo construiu um plasmídeo de expressão eucariota que codifica para o gene *LigA* em um fragmento quase total (90%), os quais transfectaram com sucesso em células HEK293, indicando que o antígeno pode ser apresentado para o sistema imune. Outros grupos falharam em expressar esta proteína em sua totalidade, o que os levou a truncar a proteína em dois segmentos, um referente à parte conservada e outro referente à parte não conservada (Faisal, 2008).

Os dados obtidos contra IgG total para fêmeas e machos indicam uma soroconversão na resposta imune humoral, justificado pela vacinação com a proteína adicionado de hidróxido de alumínio. Uma das principais características adjuvantes de sais de alumínio é justamente uma resposta do tipo Th2 aumentada. Apesar de não ser verificado soroconversão na resposta imune humoral para machos, houve uma sobrevivência maior do sexo masculino. As causas para estes resultados poderão ser elucidadas a partir de PCR em tempo real dos órgãos individuais dos animais, à partir do material estocado em nitrogênio, inicialmente destinados apenas para a histopatologia. Para bacterinas, apesar da imunoproteção, em testes do tipo ELISA também não se verifica soroconversão estatisticamente significativa.

A ausência de resposta imune humoral para as vacinas de DNA, contendo apenas o plasmídeo, ocorreu em ambos os gêneros. Apesar de a caracterização ter sido positiva para células HEK 293, devemos considerar que a transfecção *in vitro* é realizada sob condições ótimas. Em modelo animal, essas condições não são as mesmas, e talvez uma sensibilização prévia do tecido seja requerida, através de eletroporação ou injeção de sacarose, para um processo de transfecção mais eficiente. Dentre os motivos que podem ter interferido numa boa transfecção, etapa fundamental para o sucesso de uma vacina de DNA, estão, ainda, o tamanho do plasmídeo inserido e condições de salinidade após a etapa de purificação.

No que concerne ao modelo animal, nossos achados corroboram com os resultados encontrados por outros grupos, que, inclusive utilizam a perda de peso como critério para a eutanásia dos animais (Coutinho et al., 2011). Houve, ainda, presença de pulmões com hemorragia difusa ou petequial, icterícia e baço aumentado, sinais macroscópicos para animais doentes por leptospirose.

Neste trabalho, descrevemos com sucesso a construção e a caracterização de um plasmídeo que codifica para LigA em um fragmento que compreende 90% da sequência total do gene. Além disso, testamos a imunoproteção em hamsters através de desafio com cepa patogênica homóloga, revelando graus variáveis de proteção. Outros estudos serão planejados a fim de caracterizar a resposta imune e otimizar a resposta *in vivo* para o mesmo fragmento.

6 Conclusões e Perspectivas

6.1 Conclusões

- A construção do plasmídeo recombinante codando para a maior parte da proteína LigA (131-1224) é funcional em células HEK 293.
- O plasmídeo pVax/LigA utilizado como vacina de DNA não é capaz de conferir imunoproteção significativa quando apresentado nas condições descritas neste trabalho.

6.2 Perspectivas

- Testar a expressão do plasmídeo recombinante em células murinas.
- Caracterizar o plasmídeo construído em camundongos para a tipificação das respostas imunes desenvolvidas, tanto humoral quanto celular, por citometria de fluxo;
- Realizar estudos de dose-resposta.

Referências

- ADLER, B., MOCTEZUMA, A. P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 287-296, 2010.
- AREÁN, V. M. The pathologic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil's disease). **American Journal of Pathology**. v. 40 p. 393-423, 1962.
- ATHANAZIO, D. A.; SILVA, E. F.; SANTOS, C. S.; ROCHA, G. M.; VANNIERSANTOS, M. A.; MCBRIDE, A. J. A.; KO, A. I; REIS, M. G. *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. **Acta Tropica**, v.105, 176–180, 2008.
- BAOMIN, D.; ZILI, Y.; ZHUANG, C.; HEPING, Y.; ZHIMAO, F. Protection against leptospirosis by immunization with plasmid DNA encoding 33 kDa endoflagellin of *L. interrogans* serovar Lai. **Chinese Medical Science Journal**, v.15, n.1, p.14-19, 2000.
- BALDWIN, C. L.; SATHIYASEELAN, T.; NAIMAN, B.; WHITE, A. M.; BROWN, R.; BLUMERMAN, S.; et al. Activation of bovine peripheral blood gammadelta T cells for cell division and IFN-gamma production. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 87, p. 251–259, 2002.
- BERNARD, W. Leptospirosis. **The Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**. v. 9, p. 435–444, 1993.
- BHARTI, A.R.; NALLY, J.E.; RICALDI, J.N.; MATTHIAS, M.A.; DIAZ, M.M.; LOVETT, M.A.; LEVETT, P.N.; GILMAN, R.H.; WILLIG, M.R.; GOTUZZO, E.; VINETZJ. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infection Disease**. v.3, p.757-771, 2003.
- BRANDESPIN, D. F.; GIRILO, R. J. S.; LOPES, F. L.; MAGAJEVSKI, F. S., NURMBERGER JUNIOR, R.; ALESSI, A. C. Infecção experimental por *Leptospira interrogans* sorovar Pomona em hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos: alterações estruturais e avaliação das técnicas de levaditi e imunohistoquímica. **Ars Veterinária**, v. 19, n. 3, p. 272-279, 2003.
- BRANGER, C.; CHATRENET, B.; GAUVRIT, A.; AVIAT, F.; AUBERT, A.; BACH, J. M.; ANDRÉ-FONTAINE, G. Protection against *Leptospira interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. **Infection and Immunity**, v.73, p. 4062-4069, 2005.

- BULACH D. M.; ZUERNER R. L.; WILSON P.; SEEMANN T.; MCGRATH A.; CULLEN, P. A.; DAVIS, J.; JOHNSON, M.; KUCZEK, E. ALT, D. P., BURCH, B. P.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I. DAVIES, J. K.; ADLER, B. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 14560–14565, 2006.
- CERQUEIRA, G.M.; PICARDEAU, M. A century of *Leptospira* strain typing. **Infection and Genetic Evolution**, v.9, n.5, p.760-768, 2009.
- CHALLA, S.; NALLY, J. E.; JONES, C.; SHEORAN, A. S. Passive immunization with *Leptospira* LPS-specific agglutinating but not non-agglutinating monoclonal antibodies protect guinea pigs from fatal pulmonary hemorrhages induced by serovar Copenhageni challenge. **Vaccine**. v. 29, p. 4431-4434, 2011.
- CHOU, L. F.; CHEN, Y. T.; LU, C. W.; KO, Y. C.; TANG, C. Y.; PAN, M. J.; TIAN, Y. C.; CHIU, C. H.; HUNG, C. C; YANG, C. W. Sequence of *Leptospira santarosai* serovar Shermani genome and prediction of virulence-associated genes. **Gene**, v. 511, n. 2, p. 364-370, 2012.
- CHOY, H. A.; KELLEY, M. M.; CHEN, T. L.; MOLLER, A. K.; MATSUNAGA, J.; HAAKE, D. A. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. **Infection and Immunity**, v.75, n.5, p.2441-2450, 2007.
- COUTINHO, M. L.; CHOY, H. A.; KELLEY, M. M.; MATSUNAGA, J.; BABBITT, J. T.; LEWIS, M. S.; ALEIXO, J. A.; HAAKE, D. A. A LigA three-domain region protects hamsters from lethal infection by *Leptospira interrogans*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.5, n.12, 2011.
- CUI, Z. DNA vaccine. **Advanced Genetics**, v.54, p.257-289, 2005.
- DELLAGOSTIN, O. A.; GRASSMANN, A. A.; HARTWIG, D. D.; FELIX, S. R. SILVA, E. F.; McBRIDE, A. J. A. Recombinant vaccines against Leptospirosis. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 7, p. 1215-1224, 2011.
- DEVON, J. S.; WEINER, D. B. DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 68, p. 793- 806, 2000.
- DINIZ, M. O.; LASARO, M. O.; ERTL, H. C.; FERREIRA, L. C. Immune responses and therapeutic antitumor effects of an experimental DNA vaccine encoding human papillomavirus type 16 oncoproteins genetically fused to herpesvirus glycoprotein D. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, p. 1576-1583, 2010.
- ELLIS, W. A; HOVIND-HOUGEN, K.; MOLLER, S.; BIRCH-ANDRESEN, A. Morphological changes upon subculturing of freshly isolated strains of *Leptospira interrogans* serovar hardjo. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene**. v.255, p.323–335, 1983.
- FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C. A.; PEROLAT, P. *Leptospira and Leptospirosis*, Austrália, p. 272, 1999.

FAISAL, S. M.; YAN, W.; CHEN, C. S.; PALANIAPPAN, R. U.; CHANG, Y. F. Evaluation of protective immunity of *Leptospira* immunoglobulin like protein A (LigA) DNA vaccine. **Vaccine**, v.26, n.2, p.277-287, 2008.

FAISAL, S. M.; YAN, W.; MCDONOUGH, S. P.; CHANG, Y. F. *Leptospira* immunoglobulin-like protein A variable region (LigAvar) incorporated in liposomes and PLGA microspheres produces a robust immune response correlating to protective immunity. **Vaccine**, v.27 p.378-387, 2009.

FONTAINE, A. G.; Caniense leptospirosis- Do we have a problem? **Veterinary microbiology**, n. 117, p. 19-24, 2006.

GOMES, J. P.; Tópicos em bacteriologia veterinária. FAVET-UFRGS. Gênero *Leptospira* spp. 2012.

GROSENBAUGH, D. A.; LEARD, A. T.; BERGMAN, P. J.; KLEIN, M. K.; MELEO, K.; SUSANECK, S.; HESS, P. R.; JANKOWSKI, M. K.; JONES, P. D.; LEIBMAN, N. F.; JOHNSON, M. H.; KURZMAN, I. D.; WOLCHOK, J. D. Safety and efficacy of a xenogeneic DNA vaccine encoding for human tyrosinase as adjunctive treatment for oral malignant melanoma in dogs following surgical excision of the primary tumor. **American Journal of Veterinary Research**.v.72 n.12 p.1631-1638, 2011.

HAAKE, D. A. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. **Microbiology**, n. 146, p.1491–1504, 2000.

HAAKE, D. A. Hamster model of leptospirosis. **Current Protocols in Microbiology**, Unit–12E.2.

HARTSKEERL, R.A.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W.A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clinical Microbiology and Infection**, v.17, n.4, p.494-501, 2011.

HE, H. J.; WANG, W. Y.; WU, Z. D.; LI, J.; TAN, L. Z. Protection of guinea pigs against *Leptospira interrogans* serovar Lai by LipL21 DNA vaccine. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 5, n. 5, p. 385-91, 2008.

INADA, R.; IDO, Y.; HOLD, R.; KANEKO, R.; ITO, H. **Journal of Experimental Medicine**., xxiii, p.377, 1916.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON SYSTEMATIC BACTERIOLOGY
SUBCOMMITTEE ON THE TAXONOMY OF LEPTOSPIRA. 1987. **Anais do...**
Minutes of the meeting, 5 e 6 de setembro, 1987.

JOHNSON, R. C.; FAINE, S. *Leptospiraceae*. In **Bergey's manual of systematic bacteriology**, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, 1984. p. 62–67.

- JOST, B. H.; ADLER, B.; VINH, T.; FAINE, S. A monoclonal antibody reacting with a determinant on leptospiral lipopolysaccharide protects guinea pigs against leptospirosis. **Journal of Medical Microbiology**, v.22, p. 269–275, 1986.
- KLIMPEL, G. R.; MATTHIAS, M. A.; VINETZ, J. M. *Leptospira interrogans* activation of human peripheral blood mononuclear cells: preferential expansion of TCR gamma delta+ T cells vs TCR alpha beta+ T cells. **Journal of Immunology**, v. 171, p. 1447–1455, 2003.
- KMETY, E.; DIKKEN, H. Classification of the species *Leptospira interrogans* and history of its serovars. **University Press Groningen**, Groningen, The Netherlands, 1993.
- KO, A. I., GOARANT, C., PICARDEAU, M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 736-747, 2009.
- KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. **Vaccine**, v. 22, p.1545-1552, 2004.
- KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospirosis vaccines: Past, present and future. **Journal of Postgraduate Medicine**, v.51, p. 210-214, 2005.
- KOWALCZYK, D. W.; ERTL, H. C. immune responses to DNA vaccines. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 55, p. 751-770, 1999.
- LEVETT, P. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, p. 296–326, 2001.
- LEVETT, P. N.; HAAKE, D. A. *Leptospira* Species (Leptospirosis). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (ed). Mandell, Douglas, and Bennett's **Principles and Practice of Infectious Diseases**, 7th ed. Orlando, FL: Saunders Elsevier; 2009.
- LIU, M. A.; ULMER, J. B. Human clinical trials of plasmid DNA vaccines. **Advanced Genetics**, v. 55, p.25-40, 2005.
- LIU, G.; ZHANG, L.; ZHAO, Y. Modulation of immune responses through direct activation of Toll-like receptors to T cells. **Clinical and Experimental Immunology**, v.160, n.2, p.168–175, 2010.
- LOWE, D. B.; SHEARER, M. H.; KENNEDY, R. C. DNA vaccines: successes and limitations in cancer and infectious disease. **Journal of Cell Biochemistry**, v.98, p.235-242, 2006.
- LU, S. Heterologous prime-boost vaccination. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, p. 346-351, 2009.
- MANEEWATCH, S.; TAPCHASRI, P.; SAKOLVAREE, Y.; KLAYSING, B.; TONGTAWA, P.; CHAISRI, U.; SONGSERM, T.; WONGRATANACHEEWIN, S.; SRIMANOTE, P.; CHONGSA-NGUANZ, M.; CHAICUMPA, W. OmpL1 DNA vaccine cross-protects against heterologous *Leptospira* spp. challenge. **Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology**, v.25, n.1, p.75-82, 2007.

MARTÍNEZ, R.; PÉREZ, A.; QUIÑONES, M. C.; CRUZ, R.; ALVAREZ, A.; ARMESTO, M.; FERNÁNDEZ, C.; MENÉNDEZ, J.; RODRÍGUEZ, I.; BARÓ, M.; DÍAZ, M.; RODRÍGUEZ, J.; SIERRA, G.; OBREGÓN, A. M.; TOLEDO, M. E.; FERNÁNDEZ, N. Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba. **Revista Panamericana de Salud Pública**, n. 15, p. 249-255, 2004.

MATSUNAGA, J.; SANCHEZ, Y.; XU, X.; HAAKE, D.A. Osmolarity, a key environmental signal controlling expression of leptospiral proteins LigA and LigB and the extracellular release of LigA. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 70–78, 2005.

MATSUNAGA, J.; BAROCCHI, M. A.; CRODA, J.; YOUNG, T. A.; SANCHEZ, Y.; SIQUEIRA, I.; BOLIN, C. A.; REIS, M. G.; RILEY, L. W.; HAAKE, D. A.; KO, A. I. 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.; CERQUEIRA, G. M.; SUCHARD, M. A.; MOREIRA, A. N.; ZUERNER, R. L.; REIS, M. G.; HAAKE, D. A.; KO, A. L.; DELLAGOSTIN, O. A. Genetic diversity of the leptospiral immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic *Leptospira* spp. **Infection Genetics and Evolution**, n. 9, p.196–205, 2009.

McKEE, A. S.; MacLEOD, M. K.; KAPPLER, J. W.; MARRACK, P. Immune mechanisms of protection: can adjuvants rise to the challenge? **BMC Biology**, v.8, n.37, 2010.

MONAHAN, A.M.; CALLANAN, J.J.; NALLY, J.E. Host-pathogen interactions in the kidney during chronic leptospirosis. **Veterinary Pathology**, v. 46, n. 5, p. 792-799, 2009.

NAIMAN, B. M.; ALT, D.; BOLIN, C. A.; ZUERNER, R.; BALDWIN, C. L. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and gammadelta T lymphocytes. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 7550–7558, 2001.

NASCIMENTO, A. L.; KO, A. I.; MARTINS, E. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; HO, P. L.; HAAKE, D. A.; et al. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **Journal of Bacteriology**, n. 186, p. 2164–2172, 2004.

PALANIAPPAN, R. U.; CHANG, Y. F.; JUSUF, S. S.; ARTIUSHIN, S.; TIMONEY, J. F.; MCDONOUGH, S. P.; BARR, S. C.; DIVERS, T. J.; SIMPSON, K. W.; MCDONOUGH, P. L.; MOHAMMED, H. O. Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. **Infection and Immunity**, v.70, n.11, p.5924-5930, 2002.

PALANIAPPAN, R. U.; MCDONOUGH, S. P.; DIVERS, T. J.; CHEN, C. S.; PAN, M. J.; MATSUMOTO, M. et al. Immunoprotection of recombinant leptospiral

immunoglobulin-like protein A against *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection. **Infection and Immunity**, v. 74, p.1745-1750, 2006.

PICARDEAU, M., BRENOT, A., SAINT GIRONS, I. First evidence for gene replacement in *Leptospira* spp. Inactivation of *L. biflexa* flaB results in non-motile mutants deficient in endoflagella. *Molecular Microbiology*, v.40, p.189–199, 2001.

PRESCOTT, J. F. Canine leptospirosis in Canada: a veterinarian's perspective. **Canadian Medical Association Journal** v. 178, p. 397–398, 2008.

RATHINAM, S. R. Ocular leptospirosis. *Current Opinion in Ophthalmology*, v.13, p. 381-386, 2002.

REN, S.; FU, G.; JIANG, X.; ZENG, R.; MIAO, Y.; XU, H.; et al. Unique and physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole genome sequencing. **Nature**, n. 422, p. 888–893, 2003.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. *Molecular Cloning – A laboratory Manual*. ed. Cold Spring Harbor, New York, 2001.

SÁNCHEZ, R. M.; SIERRA, A. P.; SUÁREZ, M. B.; ALVAREZ, A. M.; HERNÁNDEZ, J. M.; GONZÁLEZ, M. D.; DE LA PAZ, R. C.; DE LOS REYES, G.; BATISTA B. M.; GONZÁLEZ, G. S.; DEL RÍO, M. A.; COBAS, A. S.; RAMOS, O.S. Evaluation of the effectiveness of a new vaccine against human leptospirosis in groups at risk. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 8, p. 385-392, 2000.

SÁNCHEZ, R. M.; SIERRA, A. P.; OBREGÓN FUENTES, A. M.; GONZÁLEZ, I. R.; GIL, A. B.; SUÁREZ, M. B.; SILVEIRA, J. R.; GASTÓN, B. D. Reactogenicity and immunogenicity of Cuban trivalent inactivated vaccine against human leptospirosis in different vaccination schedules. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, n. 54, p. 37-43, 2002.

SILVA, E. F.; MEDEIROS, M. A.; MCBRIDE, A. J.; MATSUNAGA, J.; ESTEVES, G. S.; RAMOS, J. G.; SANTOS, C. S.; CRODA, J.; HOMMA, A.; DELLAGOSTIN, O. A.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. The terminal portion of *Leptospira* immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of Leptospirosis. **Vaccine**, v. 25 p.6277-6286, 2007.

ULMER, J. B.; WAHREN, B.; LIU, M. A. Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. **Trends in Immunology**, v.12, p.216-222, 2006.

VINETZ, J. M. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, n. 14, p. 527-538, 2001.

World Health Organization. *Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control*. Geneva, Switzerland: WHO, 2003.

YAN, Y.; CHEN, Y.; LIOU, W.; DING, J.; CHEN, J.; ZHANG, J.; ZHANG, A.; ZHOU, W.; GAO, Z.; YE, X.; XIAO, Y. An evaluation of the serological and epidemiological

effects of the outer envelope vaccine to *Leptospira*. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 66, p. 224-230, 2003.

YASUDA, P. H.; STEIGERWALT, A. G.; SULZER, K. R.; KAUFMANN, A. F.; ROGERS, F.; BRENNER, D. J. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, n. 4, p. 407-415, 1987.

YANAGIHARA, Y.; VILLANUEVA, S. Y.; YOSHIDA, S.; OKAMOTO, Y.; MASUZAWA, T. Current status of leptospirosis in Japan and Philippines. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 30, p.399-413, 2007.

Apêndices

Apêndice A – Participação em eventos e publicações durante o tempo de estágio

Participação em congressos e trabalhos relacionados a este e a outros projetos, publicados em anais de evento pela autora durante o tempo de estágio curricular.

Evento: XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of the Brazilian Society for Tropical Medicine (ICTMM)

Título do trabalho apresentado: **Isolation and virulence characterization in hamster model of leptospires from cattle in Brazil.**

Autores: Colonetti, K; Seixas Neto, A. C. P; Schiavi, N. B.; Félix, S. R.; Vasconcellos, F. A.; Cezarini, C. C.; Medeiros, M. A., Dellagostin, O. A.; Silva, E. F.

Evento: XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of the Brazilian Society for Tropical Medicine (ICTMM)

Título do trabalho: **Alterative adjuvants in leptospirosis vaccines: using green propolis to boost protection.**

Autores: Colonetti, Karina; Fagundes, Michel Quevedo; Felix, Samuel Rodrigues; Fischer, Gefferson; Dellagostin, Odir; Fagonde, Éverton Silva

Evento: 21º Congresso de Iniciação Científica, 4º Mostra Científica, Universidade Federal de Pelotas (XXI CIC)

Título do trabalho apresentado: **Avaliação do potencial protetor de LigA e LipL32 apresentadas como vacinas de DNA em estratégia de “prime-boost” homólogo e heterólogo.**

Autores: Colonetti, K.; Fagundes, M. Q.; Seixas Neto, A. C. P.; Medeiros, M. A.; Silva, E. F.

Apêndice B – Atividades paralelas realizadas durante o tempo de estágio

O presente trabalho apresenta dados relativos ao principal projeto desenvolvido durante o tempo de estágio curricular. Outros trabalhos paralelos desenvolvidos pela aluna neste período, não detalhados neste documento constam abaixo:

- Padronização de cinco pares de *primers* para a amplificação de sequências gênicas relacionadas a virulência em *Salmonella sp.*
Atividades relacionadas: extração de DNA, PCR, eletroforese em gel de agarose.
Status: em andamento.
- Preparação de proteínas recombinantes de *Leptospira spp.* para a produção de anticorpos policlonais em aves e monoclonais em camundongos.
Atividades relacionadas: diálise, eletroforese em gel de poliacrilamida, *Western Blotting*.
Status: em andamento.
- Preparação de vacinas de DNA codando para o gene de *LipL32* para avaliação do potencial protetor do segmento em estratégia de *prime-boost* homólogo e heterólogo.
Atividades relacionadas: propagação, caracterização e quantificação do plasmídios e produção de proteínas recombinantes, inativação térmica de leptospiros, preparação das doses vacinais, acompanhamento do crescimento e qualidade da cepa para desafio, programação do experimento, requerimento e recebimento de animais.
Status: experimentação animal em andamento.

