

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia  
Centro de Desenvolvimento Tecnológico



Dissertação

**Avaliação de vacinas recombinantes contra a  
leptospirose**

**Michel Quevedo Fagundes**

Pelotas, 2011

**MICHEL QUEVEDO FAGUNDES**

**Avaliação de vacinas recombinantes contra a leptospirose**

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

Orientador: Éverton Fagonde da Silva

Co-Orientador: Odir Antônio Dellagostin

Pelotas, 2012

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

F156a Fagundes, Michel Quevedo

Avaliação de vacinas recombinantes contra a leptospirose / Michel Quevedo Fagundes. – 61f. : tab. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico, 2012. – Orientador Éverton Fagonde da Silva ; co-orientador Odir Antônio Dellagostin.

1.Biotecnologia. 2.Leptospirose. 3.Proteínas recombinantes. 4.Vacinas de DNA. 5.Própolis. I.Silva, Éverton Fagonde da. II.Dellagostin, Odir Antônio. III.Título.

CDD: 614.56

**Banca examinadora:**

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Prof. Dr. Geferson Fischer

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite

Dr. Marco Alberto Stoller Medeiros

*Á minha mãe Zoni, minha irmã Roberta, meus tios Émerson e  
Gisele e meus avós Osmar e Anira (in memoriun).*

## **Agradecimentos**

À Universidade Federal de Pelotas, ao PPGB, a FAPERGS e ao CNPq, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva, pela confiança, paciência, preocupação, ensinamentos e principalmente pela amizade.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Odir Dellagostin, pela amizade, competência, suporte e pelo exemplo.

À minha mãe Zoni, pelos ensinamentos que me levaram até aqui e a minha irmã Roberta, pela eterna amizade e amor.

À minha tia Gizele e meu avô Osmar, que me mostraram que eu podia ser sempre melhor.

Aos amigos do Laboratório de Vacinologia Amílton, Juliana, André, Samuel, Karina e Dani pelo companheirismo, amizade, incentivo e auxílio.

Aos demais colegas do laboratório de Vacinologia, estagiários e amigos do Centro de Desenvolvimento Tecnológico, pela amizade apoio e convívio agradável.

Aos meus amigos Bruno, Tiago, Wilian e Domênico, pela amizade, alegria e apoio sempre que necessário.

À equipe do Biotério Central da UFPel por todo o auxílio durante os experimentos.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

**O meu muito Obrigado!**

## Resumo

FAGUNDES, Michel Quevedo. **Avaliação de vacinas recombinantes contra a leptospirose**. 2012. 60f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A leptospirose é considerada um problema global para a saúde pública e veterinária. No Brasil, a enfermidade possui maior impacto em populações vulneráveis, as quais estão distribuídas nas favelas das grandes cidades, onde tradicionalmente ocorre elevada morbidade e mortalidade. Desta forma, torna-se necessário o estabelecimento de novas efetivas de intervenção para a redução dos casos. As vacinas disponíveis para a prevenção da enfermidade em humanos e animais são comprovadamente limitadas, já que induzem imunidade pouco duradoura e sorovar-específica, além de provocarem efeitos colaterais. Novas estratégias para o desenvolvimento de uma vacina contra a leptospirose têm sido empregadas, como a caracterização de proteínas recombinantes, a construção de vacinas de DNA e o teste de novos adjuvantes para modulação da resposta imune. Neste contexto, as proteínas de membrana externa LipL32, LigB e LigA foram selecionadas para este trabalho, pois são conservadas e encontradas somente entre sorovares patogênicos de *Leptospira*. Assim, os genes *lipL32* e *ligA* foram clonados no vetor de expressão em eucariotos pVAX para a obtenção de vacinas de DNA, e as proteínas rLigBNI e rLipL32 foram testadas utilizando o própolis como co-adjuvante na forma de vacinas de subunidade. Após a produção das vacinas, hamsters foram vacinados e a resposta imune foi avaliada através de ELISA, qPCR e desafio. Dentre as preparações testadas, a resposta imune teve níveis mais elevados e significativos para a vacina de DNA contendo o gene *lipL32* e para a vacina de subunidade de LigBNI. Além disso, estas vacinas foram capazes de proteger significativamente os animais contra o desafio homólogo, mostrando o potencial destas formulações para o desenvolvimento de uma vacina recombinante para a leptospirose.

Palavras-chave: Leptospirose. Proteínas recombinantes. Vacinas de DNA. Própolis.

## Abstract

FAGUNDES, Michel Quevedo. **Avaliação de vacinas recombinantes contra a leptospirose**. 2012. 60f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Leptospirosis is considered a global problem regarding both veterinary medicine and public health. In Brazil, the disease has greater impact in vulnerable populations, living in slums of great cities, where high morbidity and mortality occur. This situation requires the establishment of new intervention policies in order to reduce cases. Available vaccines to prevent the disease in humans and animals are notoriously underachieving, producing short term, serovar specific protection and collateral effects. New strategies are being employed to develop novel vaccines against leptospirosis, such as the characterization of recombinant proteins, construction of DNA vaccines, and use of alternative adjuvants. Surface exposed proteins LipL32, LigB, and LigA are highly conserved and found only in pathogenic serovars, therefore these were selected to be used in this study. *LigA* and *LipL32* genes were cloned into the pVAX eukaryote expression vector to be used as DNA vaccines. rLigBNI and rLipL32 were assessed as subunit recombinant antigens using propolis as a co-adjuvant. Hamsters were immunized and the response was assessed through qPCR, ELISA, and lethal challenge. DNA vaccine containing the LipL32 gene, and the subunit rLigBNI vaccine had the highest results in the immune-stimulation assays. Furthermore, these immunogens were able to significantly protect animals against lethal challenge, demonstrating their potential for leptospirosis vaccine development.

Keywords: Leptospirosis. Recombinant vaccines. DNA vaccines. Propolis.

## Lista de Figuras

Figura 1	SDS-PAGE 15% corado com Comassie Blue, mostrando o resultado da purificação das proteínas recombinantes. Coluna 1, LigBNI com 66 kDa e Coluna 2, LipL32 com 32 kDa .....	32
Figura 2	<i>Western Blotting</i> com anticorpo monoclonal anti-cauda polihistidina conjugado com peroxidase (Sigma) na diluição 1:3000. As bandas foram reveladas com DAB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , onde: Coluna 1, LipL32 (32 kDa), coluna 2, LigBNI (66 kDa) .....	33
Figura 3	<i>Western Blotting</i> com anticorpo policlonal anti-LigA conjugado com biotina na diluição 1:3000. As bandas foram reveladas com fosfatase alcalina. Coluna 1, marcador molecular Magic Mark (Sigma), 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) .....	35
Figura 4	<i>Western Blotting</i> com anticorpo policlonal anti-LipL32 conjugado com biotina na diluição 1:3000. As bandas foram reveladas com fosfatase alcalina. Coluna 1, marcador molecular Magic Mark (Sigma), coluna 2, 1 µg de LipL32 (controle positivo), coluna 3, extrato celular do controle de células, coluna 4, extrato celular de pVAX/LipL32, coluna 5, extrato celular de pVAX, coluna 6, extrato celular do controle de células, coluna 7, sobrenadante do pVAX/LipL32 e coluna 8, sobrenadante de pVAX .....	35
Figura 5	Curvas de sobrevivência dos experimentos de imunoproteção com vacinas recombinantes .....	37
Figura 6	Acompanhamento do peso dos hamsters como ponto final do experimento de imunoproteção. No eixo y, o peso em gramas e no eixo x os dias pós desafio .....	38
Figura 7	Proteção conferida pela imunização com a vacina de DNA pVaxLigA contra desafio letal em hamster .....	42

Figura 8	Resposta individual das citocinas em relação as vacinas de subunidade testadas. A expressão diferencial relativa de mRNA do gene calibrador $\beta$ -actina foi analisada em relação ao grupos estimulados com as vacinas e controle ( $p < 0,01$ ) .....	43
Figura 9	Imunogenicidade das vacinas de subunidade em ELISA indireto. Valores das médias dos animais dos grupos imunizados nos dias 0 e 28. Resultados obtidos após 3 repetições. (A) LipL32, Concentração de Ag/cavidade= 100ng. Conjugado= Ig de coelho anti-IgG Hamster-peroxidase diluído 1:6000. (B) LigBNI, Concentração de Ag/cavidade= 50ng. Conjugado= Ig de coelho anti-IgG Hamster-peroxidase diluído 1:6000. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) .....	45
Figura 10	Imunogenicidade das vacinas de DNA em ELISA indireto. Valores das médias dos animais dos grupos imunizados nos dias 0 e 42. Resultados obtidos após 3 repetições. (A) LigA, Concentração de Ag/cavidade= 50ng. Conjugado= Ig de coelho anti-IgG Hamster-peroxidase diluído 1:6000. (B) LipL32, Concentração de Ag/cavidade= 100ng. Conjugado= Ig de coelho anti-IgG Hamster-peroxidase diluído 1:6000. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,01$ ) .....	46

## Lista de Tabelas

Tabela 1	Delineamento para a imunização com vacinas de subunidade e controles .....	27
Tabela 2	Imunizações com vacina de DNA e subunidade com LigA .....	28
Tabela 3	Imunizações com vacina de DNA e subunidade com LipL32 .....	29
Tabela 4	Caracterização química da própolis verde determinado pela cromatografia líquida de alta performance – HPLC (% v/v) .....	34
Tabela 5	Proteção conferida pela imunização com vacinas de subunidade e bacterina contra desafio letal em hamster .....	36
Tabela 6	Proteção conferida pela imunização com vacinas de subunidade e bacterina contra desafio letal em hamster .....	39
Tabela 7	Proteção conferida pela imunização com a vacina de DNA pVaxLigA contra desafio letal em hamster .....	40
Tabela 8	Proteção conferida pela imunização com a vacina de DNA pVaxLipL32 contra desafio letal em hamster .....	41

## Lista de Abreviaturas

BM	BioManguinhos
CDTec	Centro de Desenvolvimento Tecnológico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EMJH	Ellinghausen–McCullough modificado por Johnson–Harris
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
<i>g</i>	Força <i>g</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IFN	Interferon
IL	Interleucinas
IP	Intraperitoneal
LATER	Laboratório de Tecnologia Recombinante
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LipL32	Lipoproteína de <i>Leptospira</i> de 32 kDa
LigA	<i>Leptospiral immunoglobulin-like A</i>
LigB	<i>Leptospiral immunoglobulin-like B</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MAT	Teste de soroaglutinação microscópica
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
pH	Potencial de Hidrogênio
qPCR	Reação em cadeia da Polimerase quantitativo
RJ	Rio de Janeiro
SDS-PAGE	Sódio Dodecil Sulfato – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
TGF	Fator de crescimento tumoral
WB	Western Blotting
$\mu\text{g}$	Micrograma(s)
$\mu\text{L}$	Microlitro(s)
$^{\circ}\text{C}$	Grau(s) Célcus

## Sumário

<b>1 Introdução .....</b>	<b>14</b>
<b>2 Objetivos .....</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Objetivo Geral .....</b>	<b>22</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>22</b>
<b>3 Material e Métodos .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Cepas, cultivo e extração de DNA .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2 Modelo animal .....</b>	<b>23</b>
<b>3.3 Obtenção dos plasmídeos .....</b>	<b>24</b>
<b>3.4 Preparo das células competentes e transformação bacteriana .....</b>	<b>24</b>
<b>3.5 Clonagem e expressão das proteínas recombinantes .....</b>	<b>25</b>
<b>3.6 Preparação e caracterização do extrato alcoólico da própolis verde ..</b>	<b>26</b>
<b>3.7 Transfecção de pVaxLipL32 e pVaxLigA em células HEK293 .....</b>	<b>26</b>
<b>3.8 Imunização dos hamsters com vacina de subunidade .....</b>	<b>27</b>
<b>3.9 Imunização dos hamsters com vacina de DNA .....</b>	<b>28</b>
<b>3.10 Desafio dos hamsters .....</b>	<b>28</b>
<b>3.11 Extração de RNA do sangue e síntese de cDNA .....</b>	<b>29</b>
<b>3.12 PCR quantitativo (qPCR) para citocinas .....</b>	<b>29</b>
<b>3.13 Análise dos dados e estatística do qPCR .....</b>	<b>30</b>
<b>3.14 ELISA indireto .....</b>	<b>30</b>
<b>3.15 Reisolamento de leptospiros e Histopatologia .....</b>	<b>31</b>
<b>3.16 Aspectos éticos .....</b>	<b>31</b>

<b>4 Resultados .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1 Expressão das proteínas recombinantes .....</b>	<b>32</b>
<b>4.2 Caracterização do extrato alcoólico da amostra de própolis .....</b>	<b>33</b>
<b>4.3 Transfecção de pVaxLipL32 e pVaxLigA em células HEK293 .....</b>	<b>34</b>
<b>4.4 Ensaios de imunoproteção, reisolamento e histopatologia .....</b>	<b>36</b>
<b>4.5 Avaliação da resposta imune celular induzida pelas vacinas de subunidade .....</b>	<b>41</b>
<b>4.6 Avaliação da resposta imune humoral induzida pelas vacinas de subunidade e de DNA .....</b>	<b>44</b>
<b>5 Discussão .....</b>	<b>47</b>
<b>6 Conclusões .....</b>	<b>53</b>
<b>Referências .....</b>	<b>54</b>

## 1 Introdução

A leptospirose é uma antropozoonose direta que ocorre de forma endêmica mundialmente (DELLAGOSTIN et al., 2011). Atualmente, ela é reconhecida como um importante e emergente problema de saúde pública global, devido principalmente ao aumento na sua incidência em países em desenvolvimento, onde ela é seriamente negligenciada pelos governos (HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011).

O ressurgimento do interesse no controle da leptospirose deve-se a sua ocorrência como epidemias cíclicas, tanto em países de clima tropical, subtropical ou temperado, desenvolvidos ou em desenvolvimento (BHARADWAJ, 2004). O aumento na incidência dos casos de leptospirose humana costuma ocorrer durante os períodos de chuva e enchentes. Na América Latina, esses períodos têm sido intensificados por fenômenos climatológicos, os quais são caracterizados por aumentos significativos nos níveis pluviométricos (KO et al., 1999; LEVETT, 2001).

A infecção em humanos pela *Leptospira* resulta do contato com a urina contaminada de animais doentes, que pode ser direto ou indireto com a água, solo ou alimentos (LEVETT, 2001; BHARTI et al., 2003; BHARADWAJ, 2004). Em 90% dos casos, as manifestações clínicas da doença são benignas e autolimitadas (LEVETT, 2001), não permitindo uma distinção entre a leptospirose e inúmeras outras síndromes febris e miálgicas semelhantes. Os sintomas vão desde um estado febril moderado, com vômitos, dores de cabeça, musculares e abdominais, evoluindo em 5 a 15% dos casos a quadros mais severos como a doença de Weil, caracterizada por falhas renais e do fígado, ou leptospirose pulmonar, que acarreta hemorragia pulmonar fatal, com uma taxa de mortalidade variável de 5 a 40% (SEHGAL; MURHEKAR; SUGUNAN, 1995; FAINE et al., 1999; BHARTI et al., 2003).

Na área animal, a leptospirose vem causando impacto econômico para a agropecuária, com alta mortalidade nos rebanhos, abortos, natimortos, infertilidade e

redução na produção de leite (BHARTI et al., 2003). Esses problemas resultam em graves prejuízos para os produtores e, conseqüentemente, para a economia dos países acometidos, pois causam transtornos produtivos e reprodutivos em animais (FAINE et al., 1999). Em caninos, o uso de vacinas diminuiu consideravelmente a ocorrência da infecção em nível mundial, reduzindo assim a atenção clínica para a enfermidade. Entretanto, nas últimas décadas, a leptospirose reemergiu como uma importante causa de doença febril, hepática e renal em cães. Por outro lado, a leptospirose felina é rara, embora a incidência da doença seja maior do que a divulgada (BOLIN, 1996; ANDRÉ-FONTAINE, 2006.).

Taxonomicamente, as leptospirosas são eubactérias patogênicas e saprófitas que pertencem ao gênero *Leptospira*, família Leptospiraceae e a ordem Spirochaetales (FAINE et al., 1999). Atualmente, 20 espécies estão descritas: as patogênicas *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. weilli*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. wolffii*, *L. broomii*, que contém 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). A classificação de sorovar é baseada na expressão de antígenos de superfície expostos da camada de lipopolissacarídeos (LPS) e sua especificidade depende da orientação e composição do componente sacarídeo deste LPS (LEVETT, 2001). Este sistema de classificação é de grande valor epidemiológico, coexistindo com a classificação genotípica. Os sorovares tendem a infectar hospedeiros específicos, como o sorovar Canicola os caninos, sorovar Pomona os suínos, sorovar Copenhageni os roedores, fato esse, que facilita a identificação de potenciais fontes de transmissão em investigações de surtos (BHARTI et al., 2003).

Atualmente, apenas três espécies de leptospirosas possuem seu genoma seqüenciado, com as sequências genômicas de *L. biflexa* (duas cepas do sorovar Patoc1), *L. interrogans* (sorovares Lai e Copenhageni) e *L. borgpetersenii* (duas cepas do sorovar Hardjo) publicadas e disponíveis para uso (REN et al., 2003; NASCIMENTO et al., 2004; BULACH et al., 2006). A maioria dos genes no genoma de *Leptospira* não possui ortólogos em genomas de outras espiroquetas, indicando um alto grau de divergência para os outros membros do mesmo filo (XUE; YAN; PICARDEAU, 2009). Além disso, análises comparativas dos genomas das espécies patogênicas e saprófitas revelaram determinantes genéticos importantes que podem estar envolvidos na patogênese.

Uma característica diferencial das leptospiras é que seu genoma codifica para mais lipoproteínas que genomas de outras bactérias que não espiroquetas. O genoma de *L. interrogans*, por exemplo, contém aproximadamente 145 genes que codificam lipoproteínas, além de supostas proteínas extracelulares e de membrana externa (SETUBAL et al., 2006). Por esta razão, os fatores de virulência identificados até o momento são majoritariamente proteínas de superfície (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010), incluindo as que demonstraram ligação *in vitro* a vários componentes da matriz extracelular e que, provavelmente, medeiam a interação *Leptospira*-célula hospedeira (MERIEN et al., 2000; CHOY et al., 2007; STEVENSON et al., 2007; ATZINGEN et al., 2008; HAUK et al., 2008; HOKE et al., 2008).

Com o recente desenvolvimento de ferramentas moleculares para a manipulação genética das leptospiras, alguns candidatos a fatores de virulência foram identificados. O primeiro a ser identificado foi a lipoproteína de membrana externa Loa22, que é reconhecida por anticorpos presentes no soro de humano convalescente, mas não teve sua função esclarecida (RISTOW et al., 2007). Posteriormente, a heme oxigenase codificada por *hemO*, que atua no anel tetrapirrólico da hemoglobina liberando ferro, também foi deletada de *L. interrogans* e a cepa mutante foi atenuada (MURRAY et al., 2009). Outro gene deletado de uma cepa de *L. interrogans* foi o da proteína FliY, responsável pelo controle do motor flagelar em leptospiras. Assim, o fenótipo mutante apresentou motilidade reduzida, sendo facilmente eliminado por macrófagos e sua virulência demonstrou ser atenuada em infecções experimentais de cobaias (LIAO et al., 2009). Além desses três fatores, a deleção de genes envolvidos na biossíntese do LPS revelou um mutante com um fenótipo com modificação antigênica e consequente perda de epítomos (MURRAY et al., 2010).

Durante algum tempo pensou-se que a lipoproteína LipL32 fosse um suposto fator de virulência, em função do alto nível de expressão desta proteína durante infecções agudas letais, além dos diversos trabalhos que demonstraram a capacidade de ligação desta proteína a componentes da matriz extracelular como a laminina, colágeno, fibronectina e plasminogênio (HAUK et al., 2008; HOKE et al., 2008). Além dessas razões, LipL32 é uma lipoproteína exposta na superfície de membrana e responsável por cerca de 75% do proteoma total de membrana de leptospiras patogênicas (MALMSTROM et al., 2009), altamente conservada entre

cepas patogênicas e não possui nenhum ortólogo em *L. biflexa* (HAAKE et al., 2004). Entretanto, uma cepa mutante de LipL32, obtida por mutagênese através da inserção do transposon *Himar1*, mostrou-se uma eficiente cepa para causar a doença aguda e colonização crônica em hamsters (MURRAY et al., 2009). Apesar das evidências, o verdadeiro papel desta proteína na patogênese ainda não é claro.

As proteínas LigA e LigB, caracterizadas como proteínas da superfamília de proteínas do tipo imunoglobulinas bacterianas (PALANIAPPAN et al., 2002; MATSUNAGA et al., 2003), também estão presentes somente em cepas patogênicas. Elas ligam-se *in vitro* a proteínas da matriz extracelular como a fibronectina, fibrinogênio, colágeno e laminina (CHOY et al., 2007; LIN; CHANG, 2007; LIN et al., 2008), são expressas em condições fisiológicas e reconhecidas por soros de pacientes com leptospirose (CRODA et al., 2007; MATSUNAGA et al., 2007; SRIMANOTI et al., 2008). Entretanto, uma mutação em LigB de *L. interrogans* não afetou a habilidade da bactéria em causar leptospirose aguda em hamsters ou colonização persistente em ratos (CRODA et al., 2008). A presença de outras supostas adesinas com funções potencialmente redundantes em *Leptospira* pode ser a explicação para os fenótipos conferidos pelos mutantes em LipL32 e LigB (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009).

Medidas higiênico-sanitárias básicas que evitam o contato com a urina ou água contaminada são muito úteis, mas de difícil implementação (MONAHAN; CALLANAN; NALLY, 2009). A dificuldade na prevenção através de medidas profiláticas e os prejuízos econômicos e à saúde pública justificam o uso e desenvolvimento de vacinas em populações animais e humanas (WHO, 2003). Vacinas contra a leptospirose têm sido utilizadas desde 1920. O uso de vacinas atenuadas, com cepas avirulentas ou saprófitas não é mais aceito para os humanos. Muitas destas preparações geram uma resposta imune muito exacerbada no hospedeiro, com efeitos colaterais indesejados como febre, vermelhidão, dor e inchaço no local da inoculação (LEVETT, 2001). Por este fato, uma vacina contra a leptospirose deve ser imunogênica, efetiva na prevenção da leptospirose aguda e crônica, de amplo espectro, de longa duração, segura e esterilizante (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009).

Atualmente, bacterinas são utilizadas para a vacinação humana apenas na China, Japão, Vietnã e Cuba, após o advento de enchentes (WANG; JIN; WEGRZYN, 2007). Vacinas para animais estão disponíveis em todo o mundo, mas

protegem somente contra sorovares antigenicamente relacionados, além de revacinações anuais serem necessárias (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2009). Neste contexto, vacinas recombinantes surgem como uma opção para contornar estes problemas, tendo um grande potencial para a prevenção contra a leptospirose.

Diferentes preparações recombinantes contra a leptospirose foram construídas com os métodos da biotecnologia moderna, das quais proteínas de membrana externa, lipoproteínas e fatores de virulência possuem um interesse especial (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). O primeiro estudo realizado com antígenos recombinantes de *Leptospira* utilizou vesículas de membrana externa de *E. coli* contendo OmpL1 e LipL41. Esta vacina induziu uma proteção de 71% quando administradas sinergisticamente em modelo hamster (HAAKE et al., 1999). Apesar desta vacina não ser comercializada, este estudo proveu evidências científicas da eficácia das vacinas recombinantes para a prevenção da leptospirose em modelo animal suscetível (WANG; JIN; WEGRZYN, 2007).

Apesar de LipL32 ser a principal proteína da membrana externa de leptospiros patogênicas, os resultados de estudos usando o antígeno em preparações vacinais são insatisfatórios (DELLAGOSTIN et al., 2011). Por outro lado, as proteínas LigA e LigB apresentaram resultados promissores em experimentos de imunoproteção em modelo animal (KOIZUMI; WATANABE, 2004; PALANIAPPAN et al., 2006; SILVA et al., 2007; FAISAL et al., 2009). Estas proteínas são altamente conservadas, estão presentes em todas as cepas patogênicas (LigB), reconhecidas pelo soro de pacientes com leptospirose e ligam-se a componentes da matriz extracelular (CHOY et al., 2007, McBRIDE et al., 2009; FIGUEIRA et al., 2011). Além disso, até o momento, a vacina que apresentou o melhor resultado foi uma vacina de subunidade de LigA a qual conferiu um nível de proteção de 100% em modelo camundongo e hamster (KOIZUMI; WATANABE, 2004; SILVA et al., 2007).

Vacinas de subunidade possuem vantagens como a produção de poucos efeitos colaterais, porém, também estão associadas com imunogenicidade reduzida. A inclusão de adjuvantes ou moduladores da resposta imune na formulação vacinal pode ajudar a contornar este problema (McKEE et al., 2010). O adjuvante mais utilizado atualmente são sais minerais de alumínio. Apesar de ser considerado um adjuvante pouco potente, o alumínio induz uma resposta Th2 (anticorpos IgG1) (LIU

et al., 2010). Vários antígenos, adjuvantes e sistemas de apresentação do antígeno têm sido avaliados, mas nenhum até o momento conseguiu o principal objetivo de uma vacina contra leptospirose, a proteção heteróloga e a eliminação do estado de carreador.

Vacinas de DNA têm sido utilizadas para diversas doenças (CUI, 2005). Estas vacinas possuem diversas vantagens sobre vacinas de proteínas recombinantes. Inicialmente, vacinas de DNA são de fácil produção (ULMER; WAHREN; LIU, 2006), custo baixo (BABIUK et al., 2000) e fáceis de administrar (LIU; ULMER, 2005). Em poucos anos, a tecnologia de vacinas de DNA evoluiu de uma observação interessante a aplicação prática (LOWE; SHEARER; KENNEDDY, 2006). Até o momento, apenas cinco trabalhos foram publicados utilizando esta metodologia. Uma vacina de DNA codificando LipL32 foi testada em gerbils e uma proteção parcial foi alcançada (BRANGER et al., 2005). Outro trabalho utilizou o gene da endoflagelina *flaB2* em experimentos com cavas, obtendo também uma proteção parcial (BAOMIN et al., 2000). Faisal et al. (2008) utilizou uma vacina codificando LigA em modelo hamster, obtendo uma proteção total, mas a sobrevivência do grupo controle não vacinado foi alta, com cerca de 60%. Outro trabalho utilizou OmpL1 como antígeno vacinal em modelo hamster e obteve 30% de proteção (MANEWATCH et al., 2007). Finalmente, He et al. (2008) utilizou o gene da lipoproteína de 21 kDa em *Cavia* como modelo de infecção. Entretanto, todos os animais sobreviveram ao desafio homólogo, tanto dos grupos vacinados como grupos controle. As vacinas de DNA apresentam algumas desvantagens como limitação a imunógenos protéicos, 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, mas mais estudos necessitam ser feitos a fim de se conhecer a melhor formulação assim como as características imunes geradas este tipo de vacina.

Outra abordagem estudada atualmente é o uso de adjuvantes ou co-adjuvantes. Na última década, diversos trabalhos tratando da composição e propriedades biológicas da própolis têm sido publicadas, revelando o seu potencial para o desenvolvimento de novos fármacos (SFORCIN et al., 2007). A própolis é uma substância resinosa obtida pelas abelhas através da colheita de resinas da flora (pasto agrícola) da região e alteradas pela ação das enzimas contidas em sua

saliva. A cor, sabor e o aroma da própolis variam de acordo com a sua origem botânica (SFORCIN; BANKOVA, 2011).

A própolis apresenta uma série de propriedades biológicas e farmacológicas, como imunomodulação, antitumoral, antiinflamatório, antioxidante, antibacteriano, antiviral, antifúngico, antiparasita entre outras (BANSKOTA; TEZUKA; KADOTA, 2001). Especificamente em relação ao sistema imune, alguns trabalhos têm demonstrado a capacidade imunomodulatória da própolis. Um trabalho recente demonstrou que a administração de um extrato etanólico de própolis brasileira verde (200 mg/kg) em camundongos durante três dias potencializou a imunidade inata, ativando os passos iniciais da resposta inata aumentando a expressão de TLR-2, TLR-4 e citocinas pró-inflamatórias por macrófagos e células do baço, contribuindo para o reconhecimento de microrganismos e ativação de linfócitos pelas células apresentadoras de antígenos (ORSATTI et al., 2010). A própolis brasileira verde também aumentou a geração de peróxido de hidrogênio, favorecendo a morte de microrganismos (ORSI et al., 2000).

O uso da própolis a 10% estimula a produção de anticorpos (SFORCIN; ORSI; BANKOVA, 2005). O trabalho de Kujumgiev et al. (1999) sugeriu que os diferentes compostos possam ser os responsáveis pelas propriedades biológicas da própolis, e devido a isso, um único componente não tem uma atividade potencial como o extrato total. Esses dados sugerem que a própolis possui uma capacidade adjuvante quando associada com vacinas. Fischer et al. (2007) associaram a própolis brasileira verde à vacina inativada do herpesvírus tipo I (SuHV-1), verificando que camundongos inoculados com a vacina SuHV-1, hidróxido de alumínio e própolis mostraram altos níveis de anticorpos. Outro trabalho deste grupo mostrou que em modelo bovino, a vacina contra a herpes bovina tipo 5 (BoHV-5) contendo própolis na sua formulação aumentou consideravelmente o título de anticorpos neutralizantes em comparação com a vacina comercial (FISCHER et al., 2007).

A própolis também foi eficiente como um adjuvante a vacina inativada contra *Aeromonas hydrophila* em carpas, já que a atividade fagocítica e os anticorpos séricos destes peixes contra *A. hydrophila* foram maiores se comparado com as vacinas sem a própolis (CHU, 2006). Estes trabalhos demonstram a potencialidade da própolis sobre a resposta imune humoral e encoraja o desenvolvimento de novas vacinas utilizando-a como imunomodulador.

Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e testar duas estratégias de composições vacinais para o controle da leptospirose. Na primeira abordagem, uma vacina de subunidade recombinante utilizando como antígeno LigBNI e LipL32 foi construída, caracterizada e sua eficácia testada em modelo animal suscetível a leptospirose. Na segunda abordagem, vacinas de DNA codificando os antígenos LigA (131-1224 aa) e LipL32 foram construídas, caracterizadas e avaliadas através de desafio letal homólogo em modelo animal suscetível a leptospirose.

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar vacinas de subunidade e DNA contra a leptospirose em modelo animal.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Realizar a clonagem e a expressão heteróloga das proteínas recombinantes LipL32 e LigBNI de *L. interrogans* Copenhageni FIOCRUZ L1-130;
- Preparar, caracterizar e avaliar a própolis como co-adjuvante nas vacinas de subunidade constituídas com as proteínas recombinantes LipL32 e LigBNI;
- Testar a eficiência das vacinas de subunidade em hamsters através de teste de desafio com cepa homóloga, avaliando parâmetros sub-letais da leptospirose, através de cultivo bacteriano e da histopatologia renal nos animais imunizados;
- Avaliar a resposta imune dos hamsters vacinados com as vacinas de subunidade através de ELISA e PCR quantitativo;
- Avaliar vacinas de DNA com os genes LipL32 e LigA de *L. interrogans* Copenhageni FIOCRUZ L1-130 através de ensaios de imunogenicidade e imunoproteção em hamsters;

### **3 Material e Métodos**

#### **3.1 Cepas, cultivo e extração de DNA**

A cepa *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae sorovar Copenhageni FIOCRUZ L1-130 (NASCIMENTO et al., 2004) foi utilizada em todas as etapas. A cepa foi cultivada a 30°C em meio Ellinghausen–McCullough–Johnson–Harris (EMJH) (Difco Laboratories) enriquecido com 10% de suplemento Difco. Para extração do DNA genômico a cultura foi centrifugada a 2.000 x *g*, ressuspendida em solução salina 1% e fervida por 10 minutos. A cepa *E. coli* TOP10F (Invitrogen) foi utilizada como sistema de expressão heterólogo, sendo cultivada a 37°C em ágar Luria-Bertani (LB) (Difco Laboratories), suplementado com 100µg.mL<sup>-1</sup> de ampicilina, quando necessário.

#### **3.2 Modelo animal**

Hamsters (*Mesocricetus auratus*) com idade entre 4 e 6 semanas foram utilizados para os ensaios de imunoproteção. Os animais foram obtidos e mantidos no Biotério Central da UFPel em racks ventilados, dentro de mini-isoladores, agrupados em cinco a seis animais para cada tratamento. Os animais foram avaliados clinicamente e pesados antes do desafio. Após o desafio, os animais foram monitorados diariamente em relação ao seu comportamento e o aparecimento de sinais clínicos. Os animais foram considerados doentes (e eutanasiados no mesmo dia) quando apresentaram sinais clínicos e perda de peso corporal maior ou igual a 10% (COUTINHO et al., 2011).

### 3.3 Obtenção dos plasmídeos

Para as vacinas de subunidade, foram utilizados plasmídeos construídos em trabalhos anteriores. Para a proteína LigB, foi utilizado o plasmídeo pET/LigBNI contendo a porção não idêntica de LigB, correspondendo aos nucleotídeos 1873-3773, codificando um peptídeo de 633 aminoácidos, construído por Silva et al. (2007). Para a proteína LipL32, foi utilizado o plasmídeo pAE/LipL32 contendo a proteína LipL32 em sua extensão total, construído por Seixas et al. (2007). Para as vacinas de DNA, foi utilizado o fragmento correspondente aos aminoácidos 131-1224 do gene LigA de *Leptospira interrogans* cepa L1-130, e a sequência inteira da proteína LipL32. As vacinas de DNA expressando as proteínas LipL32 e LigA (131-1224 aa), e a proteína LigA foram obtidas através de colaboração com o Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER), BioManguinhos, Fundação Oswaldo Cruz (BM-FIOCRUZ/RJ).

### 3.4 Preparo das células competentes e transformação bacteriana

Células competentes de *E. coli* TOP10F (Invitrogen) foram preparadas para eletroporação conforme descrito por Sambrook e Russell (2001), com algumas modificações. Uma alíquota da cultura de *E. coli* TOP10F (Invitrogen) armazenada a  $-70^{\circ}\text{C}$ , foi descongelada e semeada em placa de ágar LB. A placa foi incubada a  $37^{\circ}\text{C}$  por um período de 16 a 24 horas. Do crescimento resultante, uma colônia isolada foi semeada em 20mL de LB líquido e incubada a  $37^{\circ}\text{C}$  em agitador orbital a por 12h. Após, o cultivo foi inoculado em LB líquido e cultivado a  $37^{\circ}\text{C}$ , sob agitação, até atingir a cerca de  $5 \times 10^7$  cél.mL<sup>-1</sup>. Ao final do período de incubação o cultivo foi mantido em banho de gelo por 20 minutos e centrifugados ( $4000 \times g$ , 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ ). O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuscitado em 200mL de água ultra-pura estéril gelada ( $4^{\circ}\text{C}$ ). A amostra foi mais uma vez centrifugada sob as mesmas condições, o *pellet* ressuscitado em 100mL de glicerol 10% estéril a  $4^{\circ}\text{C}$ , novamente centrifugado e ressuscitado em 2mL de glicerol 10% estéril. As células foram fracionadas e congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Para cada processo de transformação utilizou-se 50µL de células competentes de *E. coli* TOP10F (Invitrogen) e 2µL do produto de ligação. Após o processo de eletroporação adicionou-se imediatamente 450µL de meio LB líquido e transferiu-se para um tubo de microcentrífuga de 1,5mL

de capacidade, que foi incubado em agitador orbital a 225 rpm a 37°C por 1 hora. O cultivo foi plaqueado em ágar LB sólido acrescido de 100µg.mL<sup>-1</sup> de ampicilina e as placas incubadas a 37°C, por 12h.

### 3.5 Clonagem e expressão das proteínas recombinantes

A clonagem dos genes foi realizada conforme descrito por Sambrook e Russell (2001), com algumas modificações. Os fragmentos amplificados por PCR foram clonados no vetor pAE (RAMOS et al., 2004), checados em gel de agarose 1% e purificados utilizando o *GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences), seguindo orientações do fabricante. Os fragmentos foram digeridos com enzimas de restrição e re-purificados com *GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences). O vetor pAE foi digerido e purificado também. Para a reação de ligação foi utilizada a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) e as concentrações equimolares do inserto e do vetor. Em massa, as concentrações ideais utilizadas foram de 1µg do vetor e 100ng do inserto. A reação de ligação foi mantida a 16°C por 2 horas. O produto da ligação foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli* TOP10F, como descrito. As colônias que cresceram nas placas, oriundas do processo de transformação, foram submetidas a um processo de triagem rápida pelo método *microprep* (JOUGLARD et al., 2002). Os clones caracterizados como recombinantes nesta triagem, ou seja, que apresentavam o plasmídeo pAE mais o inserto, foram selecionados e cultivados em 5mL de LB líquido acrescido de 100µg.mL<sup>-1</sup> de ampicilina, a 37°C overnight. Deste cultivo utilizou-se 3mL para extração de DNA plasmidial através do *GFX<sup>TM</sup> Micro Plasmid Prep Kit* (Amersham Biosciences) e o DNA resultante desta extração foi submetido a digestão com enzimas de restrição para checar a presença e orientação do inserto. O restante do cultivo foi utilizado como inóculo em 9mL de LB líquido acrescido de 100µg.mL<sup>-1</sup> de ampicilina e a cultura incubada a 37°C até atingir a densidade ótica a 600nm (OD600) de 0,5 a 0,7. Neste momento, a cultura foi fracionada em duas alíquotas de igual volume (5mL), sendo uma induzida com 1mM de isopropil β-D-tiogalactosídeo (IPTG) e a outra servindo de controle negativo (não induzido), ambas incubadas durante 3 horas e trinta minutos, para que tanto as amostras induzidas quanto as não induzidas apresentassem o mesmo número de células. Ao final do cultivo coletou-se uma alíquota (1mL) de cada amostra,

centrifugou-se 14.000 x *g* por 1 min e o *pellet* foi utilizado para verificar a expressão em pequena escala das proteínas recombinantes, através de uma eletroforese em um SDS-PAGE com extrato protéico total de cada clone, como descrito por Sambrook e Russell (2001). A expressão das proteínas recombinantes foi também confirmada através da técnica de *Western blotting* (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) utilizando anticorpo monoclonal anti-cauda poli-histidina conjugado com peroxidase (Sigma) na diluição 1:3.000, conforme instruções do fabricante.

### **3.6 Preparação e caracterização do extrato alcoólico da própolis verde**

A amostra de própolis verde foi obtida em Minas Gerais pela Nectar Farmacêutica Ltda. e acondicionado a -20°C. O extrato foi preparado como previamente descrito (PAULINO et al., 2002). Resumidamente, a amostra de própolis foi congelada e macerada com uma solução de extração contendo etanol absoluto, e mantido sob agitação a 37°C durante 7 dias. Após, o solvente foi evaporado e a matéria seca foi dissolvida em PBS (pH 6,2) em uma concentração final de 40mg/mL. A composição química do extrato de própolis verde foi determinada através de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), utilizando um cromatógrafo Merck-Hitachi (Alemanha), equipado com uma bomba de pressão L-7100 e um diodo detector L-7455. A separação foi feita em uma coluna Lichrochart (Merck, Darmstadt, Alemanha). A detecção dos componentes foi monitorada a 280nm e a análise dos dados foi realizada utilizando o Merck-Hitachi D-7000 (Chromatography Data Station, DAD Manager).

### **3.7 Transfecção de pVaxLipL32 e pVaxLigA em células HEK293**

Células HEK293 (Human Embryonic Kidney) foram transfectadas com os plasmídeos pVAX/LipL32 e pVAX/LigA em uma placa de seis cavidades utilizando Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, USA) 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 transfeção, 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, leupepetina 10µg/µL e bromofenol blue 0,1%) por 10 min no gelo. Os lisados celulares foram fervidos e centrifugados a 12.000 x g a 4°C por 10 min. As soluções do sobrenadante foram coletadas e analisadas por *Western Blot*.

### 3.8 Vacinação dos hamsters com vacina de subunidade

Para os experimentos de vacina de subunidade, hamsters fêmeas com 4 a 5 semanas de idade foram vacinados pela via intramuscular com as preparações vacinais seguindo o esquema da tab.1 no dia 0 e no dia 14. As emulsões foram preparadas pela mistura das proteínas, o adjuvante oleoso Montanide/Marcol (10-90) e o extrato de própolis (5mg por dose) com 200-400µL de PBS. A bacterina foi obtida conforme o descrito por Silva et al. (2007) e utilizada como controle positivo. Um grupo inoculado apenas com PBS estéril foi considerado como controle negativo. Todas as doses foram ajustadas para o volume de 500 µL com PBS e os hamsters foram imunizados com o volume máximo de 250µL por ponto de inoculação. Amostras de sangue pré e pós-imunizações foram coletadas por flebotomia do plexo venoso retro-orbital no dia anterior a primeira imunização e no dia anterior ao desafio, respectivamente.

Tabela 1 – Delineamento para a imunização com vacinas de subunidade e controles. Volume de inóculo de 500 µL.

<b>Grupos</b>	<b>Doses</b>
<b>PBS</b>	500µL
<b>Bacterina</b>	10 <sup>8</sup> Leptospiras
<b>LigBNI + Óleo</b>	40µg + 15%
<b>LigBNI + Óleo + Própolis</b>	40µg + 15% + 5mg
<b>LipL32 + Óleo</b>	40µg + 15%
<b>LipL32 + Óleo + Própolis</b>	40µg + 15% + 5mg
<b>LipL32 + Óleo + LigBNI</b>	40µg + 15% + 40µg
<b>LipL32 + LigBNI + Óleo + Própolis</b>	40µg + 40 µg + 15% + 5mg

### 3.9 Imunização dos hamsters com vacina de DNA

Para os experimentos de vacina de DNA, hamsters machos com 4 a 6 semanas de idade foram imunizados pela via intramuscular com as preparações seguindo o esquema das tab.2 e tab.3, nos dias 0 e 21. Na primeira dose, as vacinas foram preparadas para cada grupo de animais com os plasmídeos (100µg) e na segunda dose, o protocolo foi modificados para os grupo 2, o qual recebeu a mistura das proteínas (40µg) com o adjuvante hidróxido de alumínio (Al(OH)<sub>3</sub>) a 15% e 200-400µL de PBS, e para o grupo 4 na mistura de hidróxido de alumínio (Al(OH)<sub>3</sub>) a 15% e 200-400µL de PBS. Os grupos 3 e 4 foram considerados como controle negativo. Os hamsters foram imunizados com no máximo de 200µL no local da inoculação. Amostras de soro e sangue pré e pós-imunizações foram coletadas por flebotomia do plexo venoso retro-orbital no dia anterior a primeira imunização e no dia anterior ao desafio, respectivamente.

Tabela 2 – Imunizações com vacina de DNA e subunidade com LigA

<b>Grupos/Imunógenos</b>	<b>1ª Dose</b>	<b>2ª Dose</b>
<b>1- pLigA</b>	100µg	100µg
<b>2- pLigA/rLigA + Al(OH)<sub>3</sub></b>	100µg (pLigA)	40µg (rLigA)+ 15%
<b>3- pVax</b>	100µg	100µg
<b>4- pVax/Al(OH)<sub>3</sub></b>	100µg	15%

### 3.10 Desafio dos hamsters

O desafio dos animais foi realizado através da via intraperitoneal duas semanas após a última imunização com as vacinas de DNA e de subunidade. Após descongelamento e crescimento em meio líquido EMJH a 30°C, as cepas FIOCRUZ L1-130 HR 5.5, HR 6.3 e HR 6.4 foram utilizadas para o desafio dos experimentos da vacina de subunidade, vacina DNA de LigA e vacina DNA de LipL32, respectivamente. Quando a cepa atingiu a concentração de 1 a 2 x 10<sup>8</sup> leptospiras

por mL, verificada por contagem em câmara de Petroff-Hauser (Thomas Scientific), ela foi diluída até a dose utilizada nos desafios, de 1.000 leptospiros por animal. Todas as análises estatísticas e os gráficos de sobrevivência foram realizados no programa *Prisma 4 for Windows* versão 4.03. O *Fisher's Test* foi utilizado para a análise de mortalidade, disponível em: <http://www.langsrud.com/stat/fisher.htm>.

Tabela 3 – Imunizações com vacina de DNA e subunidade com LipL32

<b>Grupos/Imunógenos</b>	<b>1ª Dose</b>	<b>2ª Dose</b>
<b>1- pVaxLipL32</b>	100µg	100µg
<b>2- pVaxLipL32/ rLipL32 + Al(OH)<sub>3</sub></b>	100µg	40µg + 15%
<b>3- pVax</b>	100µg	100µg
<b>4- pVax/Al(OH)<sub>3</sub></b>	100µg	15%

### 3.11 Extração de RNA do sangue e síntese de cDNA

O RNA total proveniente da coleta de sangue do *pool* de cada grupo (200µL) foi extraído utilizando o RiboPure™-Blood (Ambion), de acordo com instruções do fabricante. As amostras de RNA extraídas foram tratadas com oito U µL<sup>-1</sup> DNase I (Applied Biosystems) a 37°C por 10 min e quantificadas utilizando o espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare). Um total de 500ng de RNA foi sintetizado em cDNA utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) seguindo instruções do fabricante, utilizando hexâmeros randômicos para o anelamento dos primers.

### 3.12 PCR quantitativo (qPCR) para citocinas

A amplificação dos PCR foi feita utilizando Strategene® Mx3005PTM Real-Time PCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Todas as reações foram feitas com SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) utilizando 25µL de volume em cada reação (1,4µL cDNA, 12,5µL Master Mix, 0,5µM de cada

*primer*). As condições de amplificação consistiram de uma pré-incubação inicial a 95°C por 10 min, seguida da amplificação do DNA alvo durante 45 ciclos (95°C por 15s, 60°C ou 61°C por 1 min e extensão a 72°C). A análise das curvas de anelamento dos primers foi realizada imediatamente após a amplificação a uma taxa linear de transição de temperatura de 0,1°C/s de 55°C a 95°C, com aquisição de fluorescência contínua. Neste estudo, o gene da  $\beta$ -actina foi utilizado como referência de normalização. As citocinas analisadas foram IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ , conforme descrito por Vernel-Pauillac e Merien et al. (2006).

### 3.13 Análise dos dados e estatística do qPCR

Os dados foram analisados utilizando o método do  $\Delta\Delta CT$ . Resumidamente, o  $C_T$  de cada citocina testada no *pool* de sangue coletado de cada grupo de hamsters foi normalizado com  $C_T$  do gene da  $\beta$ -actina e então comparado com a mesma citocina normalizada com as amostras pré-ímmes *pool* de sangue coletado de cada grupo de hamsters (normalizador) para determinar  $\Delta\Delta CT$ . O volume final é mostrado como o aumento relativo na expressão entre os hamsters imunizados e não imunizados.

### 3.14 ELISA indireto

A resposta imune foi monitorada por ELISA com o soro individual de cada animal, onde os antígenos utilizados foram as proteínas LipL32, LigBNI e LigANI purificadas. Na padronização do ELISA indireto foi realizado o *checkerboard titration* com diferentes concentrações dos antígenos, de soros de hamsters imunizados, assim como do conjugado. Assim, placas de poliestireno foram sensibilizadas com 100ng de proteína LipL32 ou 50ng de LigBNI ou LigANI purificadas e incubadas a 4°C por 12 horas, no volume de 50 $\mu$ L/cavidade. Posteriormente, foram lavadas 3 vezes com PBS-T (tampão salina fosfato pH 7,6 contendo Tween 20 a 0,05%). As placas foram bloqueadas com leite em pó desnatado 0,25% por 1 hora a 37°C e lavadas novamente 3 vezes com PBS-T. Após, colocou-se os soros diluídos 1:3200 (LipL32) ou 1:6400 (LigBNI ou LigANI) em PBS-T e incubou-se a 37°C por 1 hora. A seguir foram feitas 3 lavagens com PBS-T e adicionou-se o soro anti-imunoglobulina

de hamster conjugado com peroxidase na diluição de 1:6000 (Dako, USA), seguido por uma incubação a 37°C por 1 hora. Após cinco lavagens com PBS-T foi adicionado o substrato ELISA-OPD Peroxidase (Sigma, USA) e incubado por 15 minutos a temperatura ambiente em local escuro. A leitura da densidade óptica foi feita a 450nm em um leitor de ELISA. Todas as análises entre grupos foram realizadas através do Teste t de Student.

### **3.15 Reisolamento de leptospiras e Histopatologia**

Ao final dos experimentos, os animais sobreviventes foram eutanasiados, procedendo-se a necropsia e a análise macroscópica dos animais. Neste procedimento, verificando-se a presença de hemorragias, icterícia e congestão de órgãos. Além disso, procedeu-se a coleta de um rim de cada animal para a tentativa de reisolamento de leptospiras, e o outro rim e o fígado foram coletados e encaminhados para a realização da análise histopatológica no Departamento de Patologia veterinária da UFPel. Para os animais que adoeceram e morreram durante os experimentos, o procedimento de necropsia realizado foi o mesmo descrito para os animais sobreviventes, entretanto, através de amostragem, realizou-se a coleta de órgãos para o reisolamento e a análise histopatológica, confirmando assim a etiologia do óbito. Para a histologia, lesão leve foi considerada como 1+, lesão moderada como 2+ e lesão grave como 3+. Todos os procedimentos foram realizados conforme a descrição de Silva et al. (2008).

### **3.16 Aspectos éticos**

Esta dissertação 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.

## 4 Resultados

### 4.1 Expressão das proteínas recombinantes

A cepa de *E. coli* TOP10F foi transformada com os plasmídeos pAE/lipL32 e pAE/ligBNI e as colônias transformadas foram utilizadas para inocular meio líquido. Na fase de crescimento logarítmico procedeu-se a indução da expressão da proteína recombinante através da adição de IPTG. Amostras coletadas após 4 horas de indução revelaram que as proteínas LipL32 e LigBNI foram expressas pela cepa de *E. coli* TOP10F (fig.1).

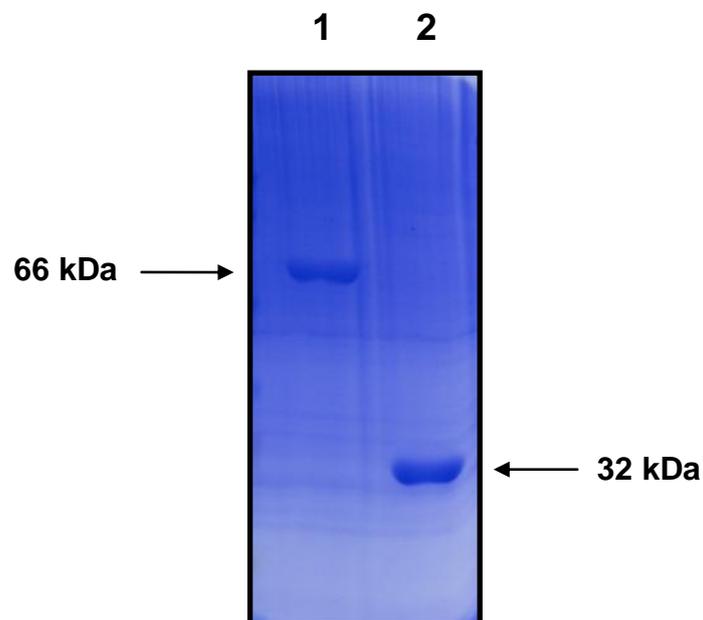


Figura 1 – SDS-PAGE 15% corado com Comassie Blue, mostrando o resultado da purificação das proteínas recombinantes. Coluna 1, LigBNI com 66 kDa e Coluna 2, LipL32 com 32 kDa

Visando a purificação das proteínas em maior escala, a cepa de *E. coli* TOP10F foi cultivada em um volume de 500ml de meio LB. Deste cultivo obteve-se um volume final de 10mL de proteína purificada. A quantificação feita pelo método de microtitulação de Bradford revelou uma concentração de 0,5mg/mL. Esta quantidade de proteína foi suficiente para todas as imunizações, bem como para o ELISA indireto.

A expressão das proteínas recombinantes foi confirmada através de WB utilizando anticorpo monoclonal anti-cauda poli-histidina conjugado com peroxidase (Sigma), na diluição 1:3.000, o qual reconheceu as proteínas recombinantes. Este resultado pode ser visualizado na fig.2.

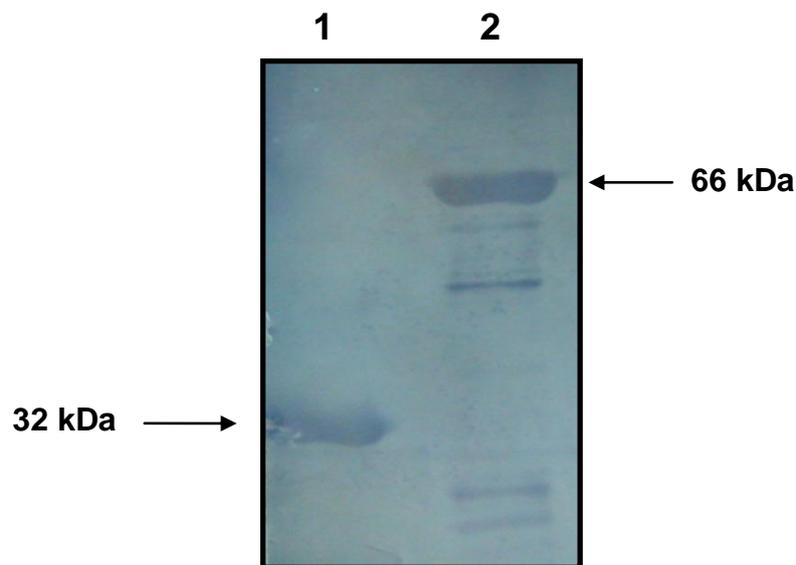


Figura 2 – WB com anticorpo monoclonal anti-cauda poli-histidina conjugado com peroxidase (Sigma) na diluição 1:3000. As bandas foram reveladas com DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, onde: Coluna 1, LipL32 (32 kDa), coluna 2, LigBNI (66 kDa)

#### 4.2 Caracterização do extrato alcoólico da amostra de própolis

Como pode ser observado na tab.4, a análise de HPLC da amostra de própolis verde utilizada neste experimento mostrou altas quantidades dos compostos fenólicos ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C), ácido 3,5-diprenil-4-

hidroxicinâmico (derivado 8) e do ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico. Nesta amostra de própolis verde, os flavonóides corresponderam a 14,74 % do extrato seco.

Tabela 4 – Caracterização química da própolis verde determinado pela cromatografia líquida de alta performance – HPLC (% v/v)

Composto	%
2,2-Dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano	0,597
Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C)	2,856
Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (derivado 1)*	0,099
Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (derivado 2)*	0,238
Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (derivado 3)*	0,226
Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (derivado 4)*	0,072
Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (derivado 5)*	0,253
Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (derivado 6)*	0,109
Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (derivado 7)*	0,511
Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (derivado 8)*	1,252
Ácido 3-prenil-4-diidrocinamoiloxicinâmico	0,061
Ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico	4,975
Ácido 6-propenóico-2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano	0,391
Ácido p-cumárico	3,097
<b>Total</b>	<b>14,74</b>

Fonte: USP, 2012.

### 4.3 Transfecção de pVAX/LipL32 e pVAX/LigA em células HEK293

A expressão das proteínas LipL32 e LigA foi demonstrada pela transfecção transiente em células HEK293, seguida pela análise de WB. Os genes construídos LipL32 e LigA expressaram altos níveis das proteínas correspondentes com a massa molecular aparente de 32kDa e 121kDa, respectivamente (fig.3 e fig.4).

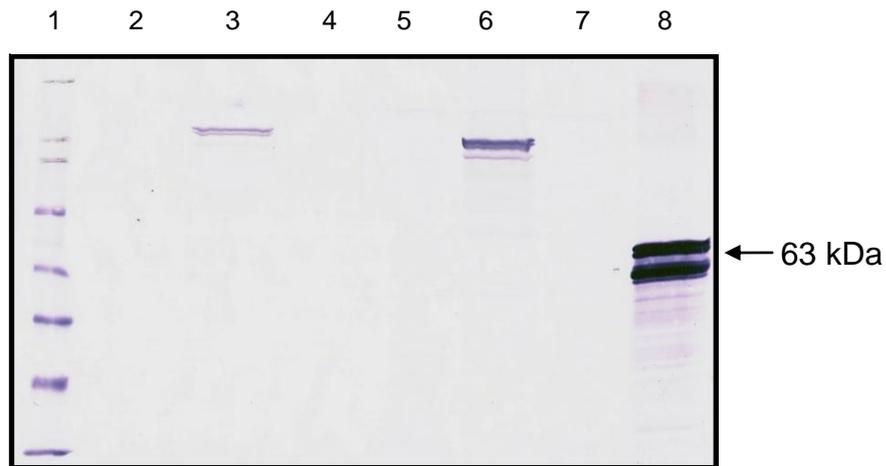


Figura 3 – *Western Blotting* com anticorpo policlonal anti-LigA conjugado com biotina na diluição 1:3000. As bandas foram reveladas com fosfatase alcalina. Coluna 1, marcador molecular Magic Mark (Sigma), coluna 2, sobrenadante pVAX, coluna 3, sobrenadante pVAX/LigA, coluna 4, sobrenadante do controle 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)

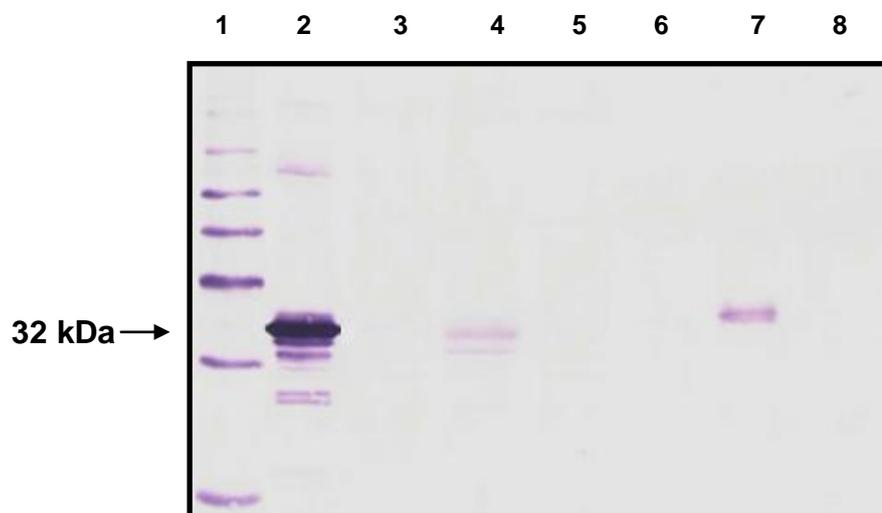


Figura 4 – *Western Blotting* com anticorpo policlonal anti-LipL32 conjugado com biotina na diluição 1:3000. As bandas foram reveladas com fosfatase alcalina. Coluna 1, marcador molecular Magic Mark (Sigma), coluna 2, 1 µg de LipL32 (controle positivo), coluna 3, extrato celular do controle de células, coluna 4, extrato celular de pVAX/LipL32, coluna 5, extrato celular de pVAX, coluna 6, extrato celular do controle de células, coluna 7, sobrenadante do pVAX/LipL32 e coluna 8, sobrenadante de pVAX

#### 4.4 Ensaios de imunoproteção, reisolamento e histopatologia

A vacinação dos hamsters com as vacinas de subunidade contendo as preparações de rLigBNI/óleo, rLigBNI/óleo/própolis, rLipL32/óleo/própolis, rLipL32/óleo/rLigBNI, rLipL32/óleo/própolis/LigBNI e bactéria (controle positivo) conferiram níveis de proteção variáveis (20-100%) nos hamsters contra o desafio homólogo com dose letal. Por outro lado, nenhum animal sobreviveu no grupo rLipL32/óleo e no grupo controle negativo (PBS) (tab.5).

Ao realizarmos a análise da mortalidade usando o *Fisher's test*, comparando-se com o grupo controle negativo, a proteção conferida com significância estatística foi obtida com duas doses de  $10^8$  leptospiras (100%,  $p < 0,001$ ) para o grupo bactéria, com duas doses de 40µg de proteína recombinante nos grupos rLigBNI/óleo (80%,  $p = 0,047$ ) e rLigBNI/óleo/própolis (80%,  $p = 0,047$ ) (tab.5).

Na análise de sobrevivência através do *Logrank test*, os mesmos grupos de vacina de subunidade e bactéria conferiram proteção com significância estatística aos animais ( $p = 0,0132$ ), quando comparados com o grupo controle (tab.5 e fig.5).

Tabela 5 – Proteção conferida pela vacinação com vacinas de subunidade e bactéria contra desafio letal em hamster

Grupos	Sobreviventes/Total (%)	Dias para óbito
<b>PBS</b>	0/5 ( 0 )	8,9,9,11,12
<b>Bactéria</b> <sup>(a)(b)</sup>	5/5 (100)	-
<b>LigBNI + Óleo</b> <sup>(a)(b)</sup>	4/5 ( 80 )	10
<b>LigBNI + Óleo + Própolis</b> <sup>(a)(b)</sup>	4/5 ( 80 )	10
<b>LipL32 + Óleo</b>	0/5 ( 0 )	9,9,9,10,11
<b>LipL32 + Óleo + Própolis</b>	1/5 ( 20 )	8,8,9,9
<b>LipL32 + Óleo + LigBNI</b>	1/5 ( 20 )	9,9,9,10
<b>LipL32 + LigBNI + Óleo + Própolis</b>	3/5 ( 60 )	8,9

Legenda: <sup>(a)</sup> proteção estatisticamente significativa  $p = 0,0132$ , quando a sobrevivência foi comparada com o grupo controle negativo (PBS) no *Logrank Test*; <sup>(b)</sup> proteção estatisticamente significativa  $p = 0,047$  no *Fisher's Test*.

Quanto a avaliação clínica, observou-se que os animais que morreram durante os experimentos apresentavam sinais da leptospirose como prostração, apatia, desidratação e isolamento. Entretanto, o sinal mais evidente foi a perda de

peso nos dias antecessores ao óbito. Na fig.6, pode-se observar a curva de peso dos animais, evidenciando-se a relação perda de peso com o dia do óbito.

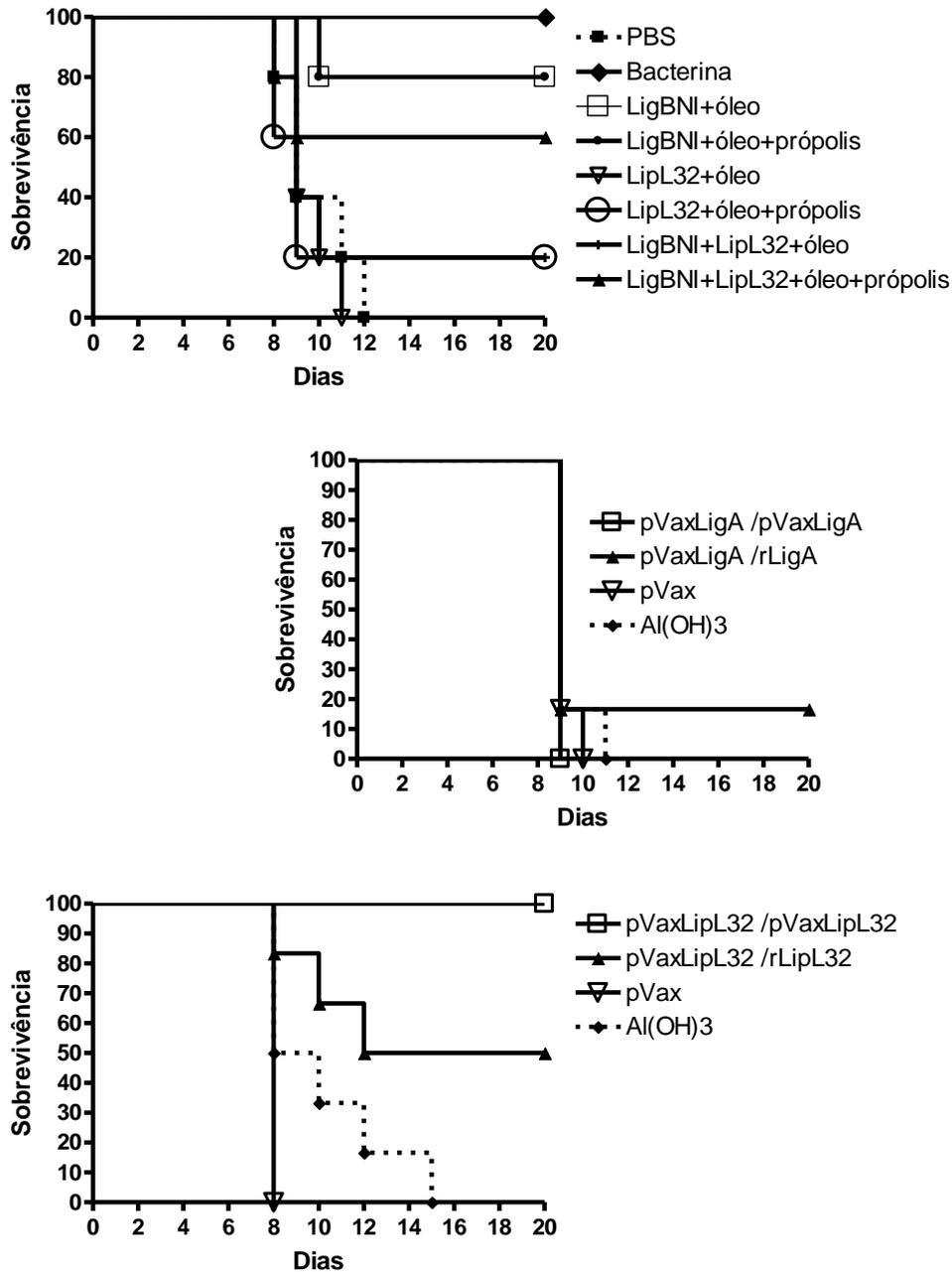


Figura 5 – Curvas de sobrevivência dos experimentos de imunoproteção com vacinas recombinantes

Após cada óbito ou ao final dos experimentos, todos os animais foram necropsiados e analisados quanto aos achados macroscópicos. Os rins foram coletados para o reisolamento bacteriano e encaminhados para o Departamento de Patologia da Faculdade de Veterinária (UFPel) para a análise histopatológica.

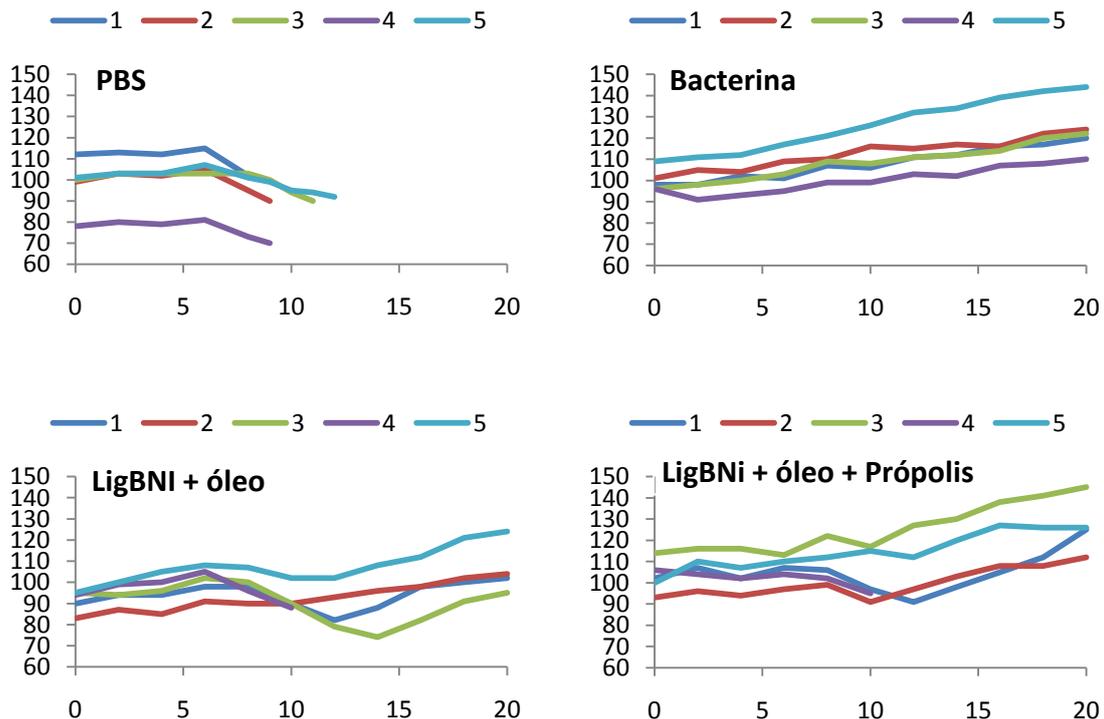


Figura 6 – Acompanhamento do peso dos hamsters como ponto final do experimento de imunoproteção. No eixo y, o peso em gramas e no eixo x os dias pós desafio.

Durante a necropsia, na análise macroscópica, pode-se perceber a presença de lesões como hemorragia em pulmões, congestão de órgãos e icterícia nas mucosas, nos animais do grupo controle e óbitos dos grupos vacinais, com gravidade leve a severa, o que não ficou evidente nos animais que sobreviveram até o final do experimento (dados não mostrados).

Em relação às culturas bacterianas, os reisolamentos foram obtidos em todos os grupos vacinados, revelando que nenhuma das preparações foi capaz de conferir imunidade esterilizante em 100% dos animais (tab.6).

Tabela 6 – Proteção conferida pela imunização com vacinas de subunidade e bacterina contra desafio letal em hamster

Grupos (% sobrevivência)	Animais Dias p/ óbito	Cultura (- ou +)	HE rim (0 a 3+)
PBS (0%)	8	+	n *
	9	+	1+
	11	+	n
	9	+	2+
	12	+	n
Bacterina (100%)	20	+	n
	20	+	n
	20	-	n
	20	+	n
	20	+	n
LigBNI + Óleo (80%)	20	-	n
	20	-	3+
	20	-	n
	10	+	n
	20	-	3+
LigBNI + Óleo + Própolis (80%)	20	-	2+
	20	-	n
	20	+	n
	10	+	n
	20	-	2+
LipL32 + Óleo (0%)	9	+	n
	10	+	n
	11	-	n
	9	-	n
	9	+	n
LipL32 + Óleo + Própolis (20%)	8	+	n
	9	-	n
	9	-	n
	20	+	n
	8	+	n
LipL32 + Óleo + LigBNI (20%)	9	-	n
	9	+	2+
	10	+	n
	20	-	n
	9	+	1+
LipL32 + LigBNI + Óleo + Própolis (60%)	20	-	n
	8	+	2+
	20	-	n
	9	+	2+
	20	-	n

Legenda: \* n= não realizada, 1+ lesão leve, 2+ lesão moderada e 3+ lesão grave.

Na análise histopatológica, os resultados parciais revelaram que todos os animais analisados apresentaram lesões discretas a severas em nível renal, como degeneração hidrópica, vasodilatação e congestão de vasos, hemorragias, infiltrado intersticial de células mononucleadas, glomérulos com hiperplasticidade, congestão e atrofia, entre outras lesões, mesmo em animais que apresentaram culturas

bacterinas negativas. Assim, fica evidente que embora os animais sobrevivessem a leptospirose letal, apresentavam lesões com gravidades variáveis em nível renal (tab.6).

Em relação à proteção conferida pelas vacinas de DNA, as tab. 7 e 8 mostram os percentuais de sobrevivência e os dias para o óbito dos animais. A imunização dos hamsters com as vacinas de DNA expressando a proteína LigA revelou que o único grupo com animal sobrevivente (16,7%, n=6) foi o tratamento em que os animais foram imunizados na primeira dose com DNA e a segunda dose com a proteína recombinante LigA (131-1224 aa) em hidróxido de alumínio. Os demais animais foram a óbito em dias variáveis como é demonstrado na tab.7 e fig.5. Nenhuma análise estatística sobre a mortalidade e sobrevivência foi realizada. Os resultados da cultura bacteriana e da histopatologia não estão disponíveis.

Tabela 7 – Proteção conferida pela imunização com a vacina de DNA pVaxLigA contra desafio letal em hamster

<b>Grupos</b>	<b>Sobreviventes/Total (%)</b>	<b>Dias para óbito</b>
<b>1- pVaxLigA</b>	0/6 ( 0 )	9,9,9,9,9,9
<b>2- pVaxLigA / rLigA + Al(OH)<sub>3</sub></b>	1/6 ( 16,7 )	9,9,9,9,9
<b>3- pVax</b>	0/6 ( 0 )	9,9,9,9,9,10
<b>4- pVax / Al(OH)<sub>3</sub></b>	0/6 ( 0 )	9,9,9,9,9,11

Já no experimento com a vacina de DNA expressando a proteína LipL32, as preparações de pVaxLipL32 (2 doses) e pVaxLipL32 / rLipL32+Al(OH)<sub>3</sub> conferiram proteção nos hamsters contra o desafio com dose letal de 100% e 50%, respectivamente. Por outro lado, nenhum animal sobreviveu nos grupos pVax e Al(OH)<sub>3</sub>, considerados como controle negativo (tab.8).

Ao realizarmos a análise da mortalidade usando o *Fisher's test*, comparando-se os tratamentos com os grupos controle negativo, a proteção conferida com significância estatística foi obtida apenas aos animais imunizados com pVaxLipL32 ( $p=0,002$ ).

Tabela 8 – Proteção conferida pela imunização com a vacina de DNA pVaxLipL32 contra desafio letal em hamster

Grupos	Sobreviventes/Total (%)	Dias para óbito
1- pVaxLipL32 <sup>(a)(b)</sup>	6/6 ( 100 )	-
2- pVaxLipL32 / rLipL32 + Al(OH) <sub>3</sub> <sup>(c)</sup>	3/6 ( 50 )	8,10,12
3- pVax	0/6 ( 0 )	8,8,8,8,8,8
4- pVax / Al(OH) <sub>3</sub>	0/6 ( 0 )	8,8,8,10,12,15

Legenda: <sup>(a)</sup> proteção estatisticamente significativa  $p=0,0009$  no *Logrank Test*; <sup>(b)</sup> proteção estatisticamente significativa  $p=0,002$  no *Fisher's Test*; <sup>(c)</sup> proteção estatisticamente significativa  $p=0,005$  no *Logrank Test*.

Entretanto, quando realizou-se a análise de sobrevivência através do *Logrank test*, os grupos pVaxLipL32 ( $p=0,0009$ ) e pVaxLipL32 / rLipL32+Al(OH)<sub>3</sub> ( $p=0,005$ ) conferiram proteção com significância estatística aos animais desafiados, quando comparados com os respectivos grupos controle (tab.8 e fig.5). Assim como o experimento com a vacina de DNA com LigA, os resultados da cultura bacteriana e da histopatologia não estão disponíveis.

#### 4.5 Avaliação da resposta imune celular induzida pelas vacinas de subunidade

A indução de citocinas do tipo Th1 (IFN- $\gamma$ , e TGF- $\beta$ ), IL-2 e Th2 (IL-4 e IL-10) foram avaliadas a partir de qPCR do mRNA do sangue total dos hamsters imunizados. Os animais imunizados com LipL32 e adjuvante oleoso sugerem uma resposta do tipo Th2 (fig.6), em função dos elevados níveis da expressão de IL-4 e baixos de IFN- $\gamma$  em relação ao PBS, e uma resposta mais acentuada em relação ao padrão encontrado no grupo vacinal contendo LipL32, adjuvante oleoso e própolis, onde foi observado um aumento menor na expressão de IL-4 (fig.7).

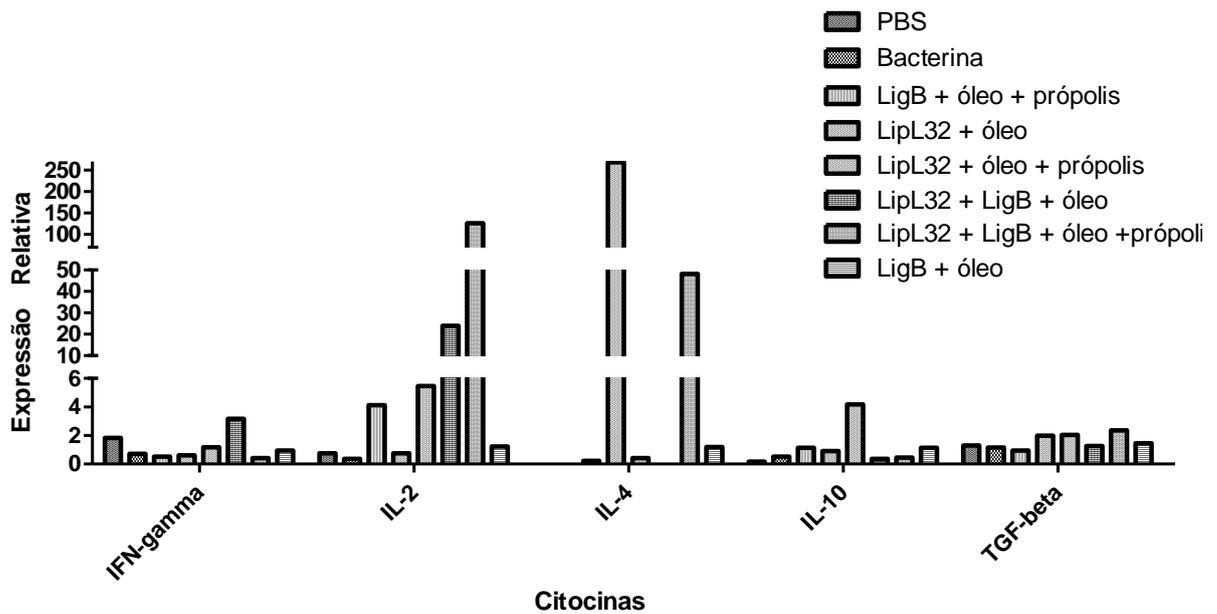


Figura 7 – Resposta de citocinas em relação as vacinas de subunidade testadas. A expressão diferencial relativa de mRNA do gene calibrador  $\beta$ -actina foi analisada em relação ao grupos estimulados com as vacinas e controle ( $p < 0,01$ )

O grupo vacinado com LipL32, LigB e adjuvante oleoso foi o apresentou uma expressão de citocinas com um perfil sugestivo de uma resposta Th1. As citocinas IFN- $\gamma$  e IL-2 foram mais expressas em relação ao PBS, e, além disto, houve uma diminuição na expressão de IL-10, citocina relacionada com a resposta Th<sub>reg</sub> (fig.7). Já o grupo vacinal contendo LipL32, LigB e adjuvante oleoso e própolis, não houve um padrão de resposta imune aparentemente claro como nos outros grupos. As citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 diminuíram sua expressão e IL-2 e IL-4 tiveram sua expressão relativa ao PBS aumentadas (fig.7). Nos grupos vacinais contendo LigB e adjuvante oleoso e LigB, adjuvante oleoso e própolis e no grupo bacterina, o padrão de indução de citocinas Th1 e Th2 foi o mesmo, sem a polarização significativa para nenhum destes tipos de resposta imune. A fig.8 mostra a expressão relativa individual de cada citocina.

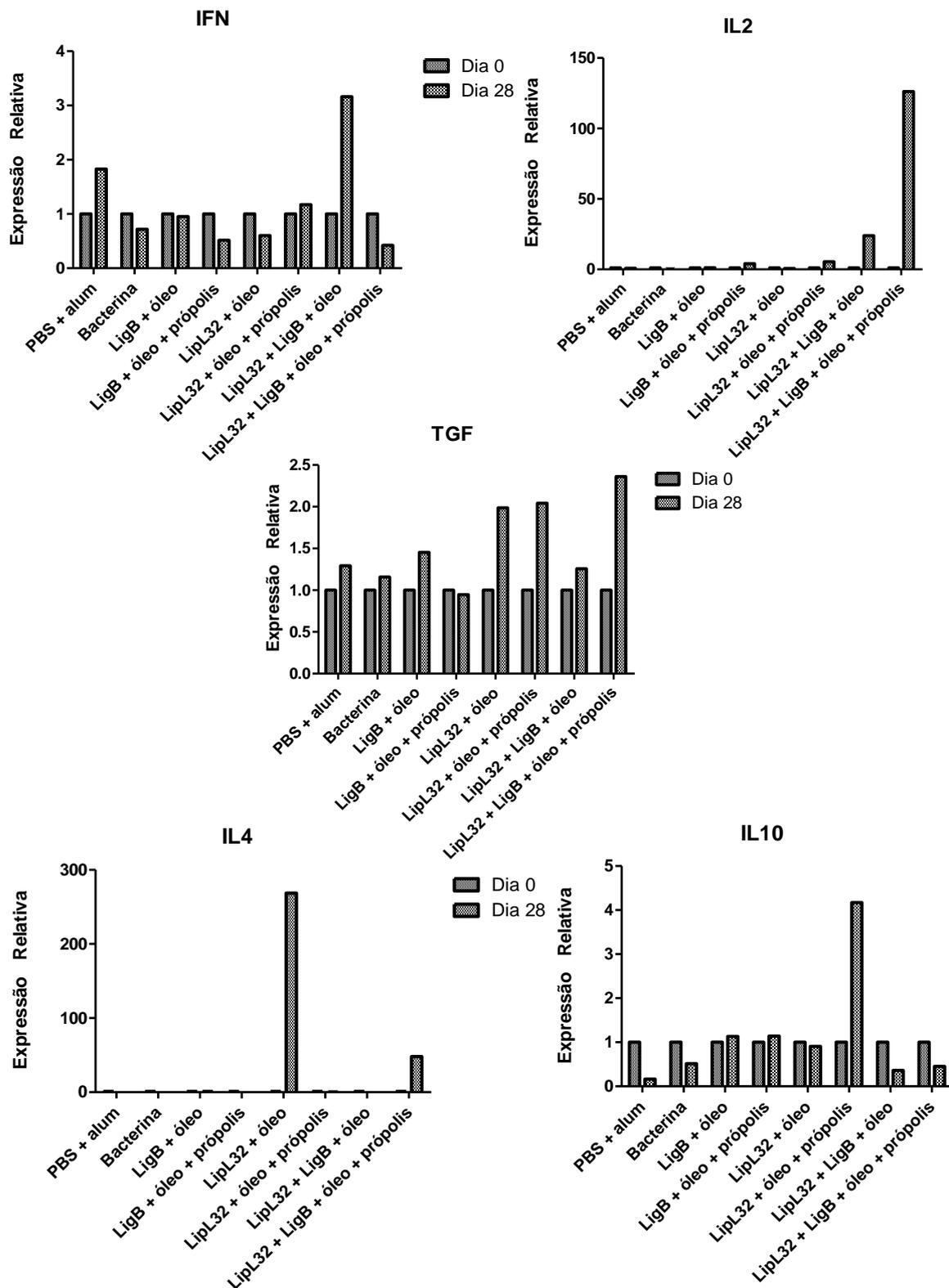


Figura 8 – Resposta individual das citocinas em relação as vacinas de subunidade testadas. A expressão diferencial relativa de mRNA do gene calibrador  $\beta$ -actina foi analisada em relação ao grupos estimulados com as vacinas e controle ( $p < 0,01$ )

#### 4.6 Avaliação da resposta imune humoral induzida pelas vacinas de subunidade e de DNA

Para a análise da resposta imune humoral dos animais imunizados com as vacinas de subunidade e vacinas de DNA, realizou-se um *checkerboard titration* onde obteve-se a melhor diluição dos antígenos para a sensibilização das placas, a melhor diluição do conjugado e dos soros a serem testados. Com isso, utilizou-se 50ng das proteínas rLigBNI e rLigANI e 100ng de rLipL32. Além disso, a melhor diluição do conjugado IgG anti-hamster foi de 1:6000. Para a diminuição da relação “sinal-barulho” optou-se pelas diluições de 1:3200 para rLipL32 e 1:6400 para rLigANI e rLigBNI (dados não mostrados). Estas diluições demonstram que as preparações foram capazes de induzir respostas de anticorpos em níveis elevados para os grupos vacinais.

Na análise dos resultados dos ELISA com rLigBNI como antígeno, os soros dos animais imunizados com as vacinas de subunidade mostrou diferença estatística significativa quando comparou-se as absorbâncias entre os grupos imunizados com rLigBNI/óleo ( $p=0,001$ ) e o grupo rLigBNI/óleo/própolis ( $p=0,045$ ) e o grupo controle negativo. Também observamos diferença estatística quando comparamos rLigBNI/óleo ( $p=0,007$ ) com o controle positivo (bacterina) (fig.9). Por outro lado, quando realizou-se a análise nos soros dos animais imunizados com as vacinas de subunidade no ELISA com a rLipL32 como antígeno nenhum grupo apresentou diferença estatística significativas entre os dias 0 e 28, e entre os grupos vacinais e o controle negativo (fig.9).

Em relação a análise dos ELISA realizados com os soros dos animais imunizados com as vacinas de DNA expressando LigA observou-se que nenhum grupo apresentou diferença estatística significativa entre os dias 0 e 42, e entre os grupos vacinais e os controles negativos (fig.10). Já o resultado dos ELISA realizados com os soros dos animais imunizados com as vacinas de DNA expressando LipL32 observou-se que existiu diferença estatística significativa quando comparou-se as absorbâncias entre os grupos imunizados com pVaxLipL32 ( $p<0,001$ ) e o grupo controle pVax. Observou-se diferença também, quando comparou-se pVaxLipL32 ( $p=0,006$ ) com pVaxLigA/rLigAfull +  $Al(OH)_3$  e pVaxLigA/rLigAfull +  $Al(OH)_3$  ( $p<0,001$ ) e  $Al(OH)_3$  (fig.10).

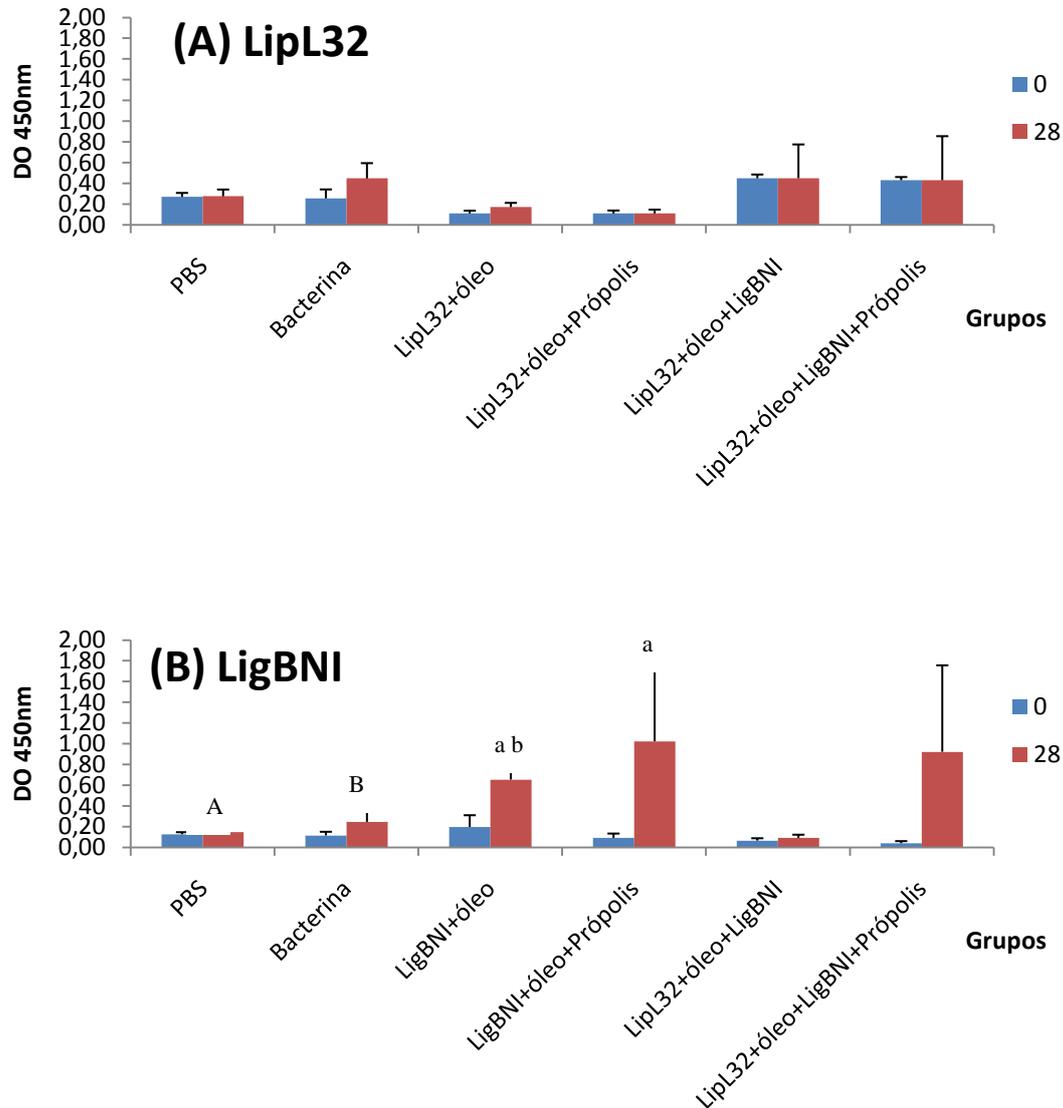


Figura 9 - Imunogenicidade das vacinas de subunidade em ELISA indireto. Valores das médias dos animais dos grupos imunizados nos dias 0 e 28. Resultados obtidos após 3 repetições. (A) LipL32, Concentração de Ag/cavidade= 100ng. Conjugado= Ig de coelho anti-IgG Hamster-peroxidase diluído 1:6000. (B) LigBNI, Concentração de Ag/cavidade= 50ng. Conjugado= Ig de coelho anti-IgG Hamster-peroxidase diluído 1:6000. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ )

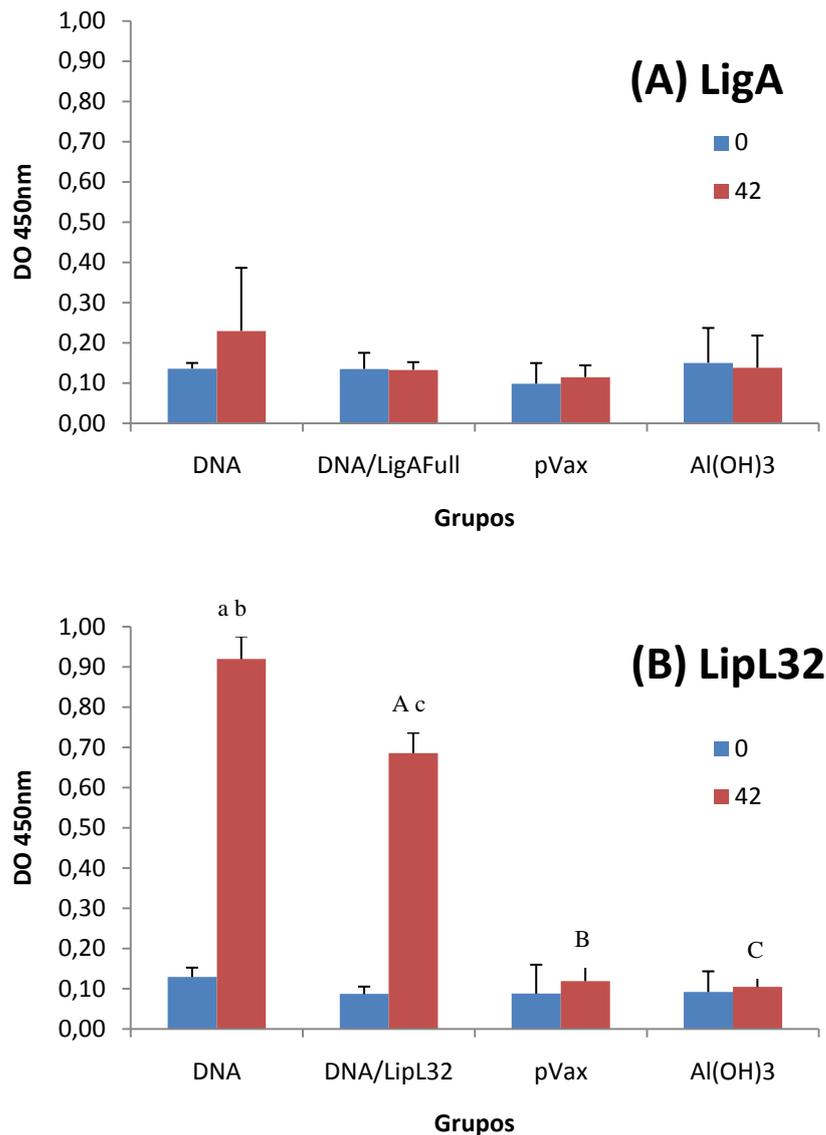


Figura 10 - Imunogenicidade das vacinas de DNA em ELISA indireto. Valores das médias dos animais dos grupos imunizados nos dias 0 e 42. Resultados obtidos após 3 repetições. (A) LigA, Concentração de Ag/cavidade= 50ng. Conjugado= Ig de coelho anti-IgG Hamster-peroxidase diluído 1:6000. (B) LipL32, Concentração de Ag/cavidade= 100ng. Conjugado= Ig de coelho anti-IgG Hamster-peroxidase diluído 1:6000. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,01$ )

## 5 Discussão

A leptospirose é uma antropozoonose de ampla distribuição mundial. As perdas sociais e econômicas causadas por essa zoonose justificam o emprego de novas estratégias e tecnologias para o desenvolvimento de vacinas mais eficazes contra leptospirose em populações humana e animais em locais de risco (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009).

Até o momento, 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 buscando 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 leptospirosas através da urina (DELLAGOSTIN et al., 2011).

Apesar dos avanços tecnológicos na biologia molecular e na engenharia genética, o que permitiu a identificação de antígenos potenciais, a maioria das vacinas necessita de uma associação com adjuvantes e co-adjuvantes capazes de aumentar o seu espectro, estimular uma resposta imune apropriada e/ou uma apresentação desta vacina que produza este efeito, além de minimizar os efeitos colaterais (LIU; ZHANG; ZHAO, 2010).

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. Análises do perfil protéico de leptospirosas indicam que LipL32 (MALMSTROM et al., 2009) é a proteína mais proeminente, sendo a principal proteína de membrana externa das leptospirosas. 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 duas

abordagens para avaliar o potencial imunogênico destes antígenos: LipL32 e LigA utilizando vacinas de DNA e *prime-boost* e vacina de subunidade recombinante de LigBNI e LipL32 utilizando uma emulsão de óleo e PBS como adjuvante, e a própolis como co-adjuvante.

Tanto para a medicina humana quanto a veterinária, as vacinas necessitam cumprir uma série de requisitos, como ensaios pré-clínicos e clínicos, além da estimativa do custo de produção, a facilidade de aplicação, a inocuidade e a segurança, antes de sua liberação para o comércio (ULMER; WAHREN; LIU, 2006). A vacinação com DNA, por possuir algumas destas vantagens, têm sido extensamente 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).

Dessa forma, o objetivo do trabalho utilizando as vacinas de DNA foi avaliar a proteção conferida pela estratégia de *prime-boost* comparada a vacina de DNA com os genes LipL32 e LigA de *L. interrogans* sorovar L1-130 em modelo hamsters, através de desafio homólogo. Foram construídos os vetores de expressão eucarióticos pVAX/LipL32 e pVAX/LigA, os quais transfectaram com sucesso em células HEK293, indicando que o antígeno pode ser apresentado para o sistema imune. Nossos experimentos mostraram que somente os hamsters imunizados com pVAX/LipL32 foram capazes de produzir níveis significativos de anticorpos, em ambas abordagens, com níveis de anticorpos detectados em diluições de 1:3.200. Assim, o aumento significativo nos níveis de anticorpos da vacina de DNA pVAX/LipL32 pode gerar anticorpos protetores para combater o patógeno. Por outro lado, no grupo de animais vacinados com LigA como imunógeno, não houve soroconversão de LigA, assim como não houve proteção dos animais vacinados com as duas estratégias.

O grupo vacinado com duas doses de vacina pVAX/LipL32 mostrou uma proteção total de 100% e a estratégia de *prime-boost* uma proteção parcial de 50%. Estes resultados são de grande importância se comparados com outros trabalhos de vacinas de DNA. Quando LipL32 foi clonada em uma construção com Adenovírus para expressão *in vivo*, 87% dos gerbils imunizados sobreviveram ao desafio

heterólogo, apesar da alta sobrevivência do grupo controle (51%) (BRANGER et al., 2001). Em outro trabalho, LipL32 foi clonada no vetor pcDNA e utilizada para vacinar gerbils, com uma proteção de 60% comparada com 35% de sobrevivência do grupo controle (BRANGER et al., 2005). Entretanto, há uma série de diferenças importantes nestes estudos, os vetores anteriormente utilizados foram pTARGET, o que poderia promover uma resposta diferente, os genes de LipL32 foram provenientes de outros sorovares, com possíveis mudanças na sequência do antígeno, as cepas utilizadas no desafio eram diferentes e de alta passagem e o principal, o modelo utilizado não era o hamster, o qual é o modelo animal recomendado para o estudo de vacinas contra a leptospirose (SILVA et al., 2007). Nosso estudo é o primeiro a mostrar que uma vacina de DNA com LipL32 protege os animais desafiados com cepa homóloga com 100% de sobrevivência e 0% de sobrevivência dos grupos controle em modelo hamster.

Apesar da proteção obtida de 50%, a estratégia de *prime-boost* pode ser melhor estudada. Este trabalho foi o primeiro a utilizar esta estratégia para o desenvolvimento de uma vacina contra a leptospirose. Mudanças na concentração da proteína utilizada para imunizar os animais, imunizações com antígenos que mostrem sinergia e uma terceira imunização podem ser consideradas para o refinamento desta metodologia que se mostrou promissora. Outros experimentos serão conduzidos para avaliar esta estratégia, assim como a mensuração da resposta celular. Outra observação importante foi que o fígado, pulmões e rins dos hamsters imunizados não mostraram lesões macroscópicas visíveis, contrastando com os animais dos grupos controle que apresentaram lesões como hemorragias e icterícia (dados não mostrados). Além disto, os hamsters imunizados não mostraram sinais clínicos óbvios e característicos da leptospirose como prostração, isolamento, desidratação e vocalizações. Estes resultados indicam que a vacina de DNA contendo LipL32 como imunógeno pode efetivamente proteger animais imunizados no formato utilizado.

A segunda abordagem utilizada no trabalho foi a avaliação do potencial da própolis como co-adjuvante em vacinas contra a leptospirose. Neste trabalho, os antígenos LipL32 e LigBNI foram avaliados individualmente e em sinergia, juntamente com a própolis e o óleo mineral. Foi verificado que as imunizações com LigBNI/óleo e LigBNI/óleo/própolis foram as únicas capazes de gerar uma resposta imune humoral significativamente maior que os grupos controle ( $p < 0,05$ ) assim

como uma imunoproteção de 80%. Nos grupos contendo os dois antígenos co-administrados, não houve diferença estatística no nível de anticorpos em relação ao controle, apesar da imunoproteção ter sido diferente, com uma proteção de 60% no grupo vacinal imunizado com LigBNI/LipL32/óleo/própolis e de 20% no tratamento sem a própolis. Apesar de observar diferenças estatísticas nos outros grupos entre o tratamento com e sem a própolis, possivelmente a metodologia utilizada não foi a ideal. Uma das alternativas é calcular a quantidade ideal de própolis a ser administrada no modelo hamster, já que a utilizada neste trabalho foi baseada em experimentos realizados em camundongos. Da mesma maneira, a proteção de 60% alcançada não foi estatisticamente significativa quando cinco animais foram utilizados no experimento. O aumento do número de animais em experimentos futuros pode mostrar a uma proteção significativa.

Quando os níveis de citocinas são analisados através de qPCR, não se percebe uma polarização clara da resposta imune em nenhum dos grupos. O grupo vacinado com LipL32/LigB/óleo foi o que apresentou uma expressão de citocinas com um perfil sugestivo de uma resposta Th1, mas não houve nenhuma relação com os resultados dos níveis de anticorpos e imunoproteção. Esse fato talvez tenha sido evidenciado pela metodologia utilizada em nosso estudo. Sabe-se que os níveis de citocinas circulantes não correspondem exatamente aos níveis de mRNA das citocinas, podendo haver controles pós-transcricionais ou modificações pós-traducionais importantes na expressão destas citocinas que só podem ser detectadas através da análise da presença da proteína na amostra, e não do seu mRNA. Atualmente não existe no mercado reagentes para a detecção direta de citocinas de hamsters, mas a metodologia utilizando a detecção do mRNA vêm sendo utilizada. Outro fator importante é a inexistência de um perfil definido de citocinas de uma resposta humoral ou celular em hamsters, assim como também não existe um perfil de citocinas de uma vacina protetora contra a leptospirose. Desta maneira, nosso trabalho apenas relata o padrão encontrado, o que poderá servir de comparação para os trabalhos futuros.

Devido à alta complexidade química da própolis, é difícil identificar quais substâncias são responsáveis por suas atividades biológicas. Alguns pesquisadores afirmam que é a composição heterogênea além da combinação com produtos naturais que confere à própolis suas propriedades bioativas. De acordo com Sforcin e colaboradores (2005), a ação da própolis no sistema imunológico resulta do

sinergismo de diversas substâncias. Os elementos detectados no extrato de própolis verde utilizado neste experimento, determinados pela análise de HPLC, mostrou que os níveis de compostos encontrados permitem classificar esta amostra utilizada como própolis brasileira (MARCUCCI et al., 2001), com uma predominância de compostos fenólicos e derivados do ácido cinâmico.

Em nossa amostra da própolis, os flavonóides corresponderam a 14,74% do extrato seco. Estas substâncias são conhecidas por estimularem a resposta imune humoral assim como a celular (HAVSTEEN, 2002). O artepelin C provavelmente age no sistema imune através do aumento no número de linfócitos T auxiliares (KIMOTO et al., 1998). O mecanismo exato de ação da própolis nas células do sistema imune continua desconhecido. Entretanto, é conhecido que o artepelin C, encontrada em grandes quantidades na amostra utilizada, age nos macrófagos estimulando a produção de IL-12 (SFORCIN et al., 2003), o que potencializa a produção de imunoglobulinas pelas células B. Outros compostos fenólicos, como o ácido cinâmico, também presente na amostra utilizada, também produz e estimula a liberação de citocinas como IL-1, IL-6 e IL-8 através dos macrófagos ativados, estimulando a produção de anticorpos (ORSOLIC et al., 2005).

Assim, estes mecanismos podem explicar o aumento na produção de anticorpos observado neste estudo. Outra hipótese sugere que a própolis pode reduzir a peroxidação dos lipídios e estimula o sistema imune através da ativação direta dos linfócitos (KIMOTO et al., 1998). Mesmo que não se conheça o mecanismo preciso de ação, é provável que os flavonóides estimulem a produção de citocinas, particularmente as interleucinas IL-1 e IL-2, as quais têm ação mitogênica em linfócitos B e T (HAVSTEEN, 2002). Realmente, nos grupos vacinados com LigB/própolis e LigB/LipL32/própolis, houve um aumento significativo na expressão de IL-2 em comparação aos controles.

Neste trabalho, nós descrevemos a avaliação de duas diferentes estratégias para o desenvolvimento de uma vacina contra a leptospirose. A vacina de DNA contendo o gene lipL32 e a vacina de subunidade utilizando o antígeno LigBNI em associação com o adjuvante oleoso e/ou adjuvante oleoso e própolis foram altamente imunogênicas e protegeram hamsters da leptospirose letal. Outros estudos serão planejados para identificar as doses ótimas, experimentos de desafio heterólogo e avaliação da resposta imune conferida pelas vacinas. Dessa forma, estas

abordagens podem resultar em uma formulação que pode substituir as tradicionais vacinas contra a leptospirose.

## 6 Conclusões

- Os grupos vacinais rLigBNI/óleo e rLigBNI/óleo/própolis são capazes de proteger os hamsters contra desafio letal homólogo.

- Embora o grupo vacinal contendo rLigBNI/óleo induza uma resposta imune humoral estatisticamente diferente e significativa dos grupos controle negativo e controle positivo, ele não induz uma imunidade esterilizante.

- Não é possível identificar uma polarização da resposta imune através da mensuração de mRNA de citocinas do experimento com vacinas de subunidade, não havendo diferença estatística entre os grupos tratados com e sem a própolis.

- As vacinas de DNA pVaxLipL32 e pVaxLigAFull expressam as proteínas recombinantes em células eucarióticas, comprovado a funcionalidade das construções.

- Os grupos vacinais contendo pVaxLipL32 e pVaxLipL32/rLipL32 induzem uma resposta imune humoral estatisticamente diferente e significativa dos grupos controle negativo.

- Os grupos vacinais pVaxLipL32 e pVaxLipL32/rLipL32 são capazes de proteger os hamsters contra desafio letal homólogo.

- As vacinas rLigBNI/óleo, rLigBNI/óleo/própolis e pVAX/LipL32 apresentam os resultados mais promissores e serão feitos mais estudos a fim de refinar estas composições para o desenvolvimento de uma vacina comercial contra leptospirose.

## Referências

- ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v.140, n.3, p.287-296, 2010.
- ANDRÉ-FONTAINE, G. Canine leptospirosis - do we have a problem? **Veterinary Microbiology**, v.117, n.1, p.19-24, 2006.
- ATZINGEN, M. V.; BARBOSA, A. S.; DE BRITO, T.; VASCONCELLOS, S.A.; DE MORAIS, Z. M.; LIMA, D. M.; ABREU, P. A.; NASCIMENTO, A. L. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. **BMC Microbiology**, v.8, n.70, 2008.
- BABIUK, L. A.; BABIUK, S. L.; LOEHR, B. I.; VAN DRUNNEN LITTEL-VAN DEN H. Nucleic acid vaccines: research tool or commercial reality. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.76, p.1-23, 2000.
- BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytotherapy Research**, v.15, n.7, p.561-71, 2001.
- 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.
- BHARADWAJ, R. Leptospirosis - a reemerging disease? **Indian Journal of Medical Research**, v.120, n.3, p.136-138, 2004.
- 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.
- BOLIN, C.A. Diagnosis of leptospirosis: a reemerging disease of companion animals. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small animal)**, v.11, n.3, p. 166-171, 1996.
- BRANGER, C.; CHATRENET, B.; GAUVRIT, A.; AVIAT, F.; AUBERT, A.; BACH, J. M. 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.
- BRANGER, C.; SONRIER, B.; CHATRENET, B.; KLONJKOWSKI, N.; RUVOEN-CLOUET, A.; AUBERT, G.; ANDRE-FONTAINE, G. Identification of the hemolysin-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. **Infection and Immunity**, v.69, p.6831-6838, 2001.

BULACH, D. M.; ZUERNER, R. L.; WILSON, P.; SEEMANN, T.; MCGRATH, A.; CULLEN, P. A.; DAVIS, J.; JOHNSON, M.; KUCZEK, E.; ALT, D. P.; PETERSON-BURCH, B.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; DAVIES, J. K.; ADLER, B. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential.

**Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 103, n. 39, 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.

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.

CHU, W.H. Adjuvant effect of propolis on immunization by inactivated *Aeromonas hydrophila* in carp (*Carassius auratus gibelio*). **Fish and Shellfish Immunology**, v.21, p.113–117, 2006.

CRODA, J.; RAMOS, J. G.; MATSUNAGA, J.; QUEIROZ, A.; HOMMA, A.; RILEY, L. W.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. *Leptospira* immunoglobulin-like proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 1528–1534, 2007.

CRODA, J.; FIGUEIRA, C.P.; WUNDER, E.A. JR.; SANTOS, C.S.; REIS, M.G.; KO, A.I.; PICARDEAU, M. Targeted mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species: disruption of the LigB gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. **Infection and Immunity**, v.76, n.12, p. 5826-5833, 2008.

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.; FÉLIX, S.R.; DA SILVA, E.F.; MCBRIDE, A.J. Recombinant vaccines against Leptospirosis. **Human Vaccines**, v. 7, n. 11, p. 1215-1224, 2011.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.A.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. Melbourne, Australia. 1999, p. 255.

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

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, n.3, p.378-87, 2009.

FIGUEIRA, C. P.; CRODA, J.; CHOY, H. A.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. Heterologous expression of pathogen specific genes *ligA* and *ligB* in the saprophyte *Leptospira biflexa* confers enhanced adhesion to cultured cells and fibronectin. **BMC Microbiology**, v.11, n.129, 2011.

FISCHER, G.; CONCEIÇÃO, F. R.; LEITE, F. P. L.; DUMMER, L. A.; VARGAS, G. D.; HÜBNER, S. O.; DELLAGOSTIN, O. A.; PAULINO, N.; PAULINO, A. S.; VIDOR, T. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. **Vaccine**, v.25, p.1250–1256, 2007.

HAAKE, D.A.; MAZEL, M.K.; MCCOY, A.M.; MILWARD, F.; CHAO, G.; MATSUNAGA, J.; WAGAR, E.A. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. **Infection and Immunity**, v.67, n.12, p.6572-6582, 1999.

HAAKE, D. A.; SUCHARD, M. A.; KELLEY, M. M.; DUNDOO, M.; ALT, D. P.; ZUERNER, R. L. Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. **Journal of Bacteriology**, v.186, p.2818–2828, 2004.

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.

HAUK, P.; MACEDO, F.; ROMERO, E. C.; VASCONCELLOS, S. A.; DE MORAIS, Z. M.; BARBOSA, A. S.; HO, P. L. In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. **Infection and Immunity**, v.76, p.2642–2650, 2008.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology Therapy**, v.96, n.2, p.67-202, 2002.

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.

HOKE, D. E.; EGAN, S.; CULLEN, P. A.; ADLER, B. LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata*. **Infection and Immunity**, v.76, p.2063–2069, 2008.

JOUGLARD, S. D.; MEDEIROS, M. A.; VAZ, E. K.; BASTOS, R. G.; DA CUNHA, C. W.; ARMOA, G. R. G.; DELLAGOSTIN, O. A. An ultra-Rapid and inexpensive plasmid preparation method for screening recombinant colonies. **Abstracts American Society for Microbiology**, v. 71, p. 231-234, 2002.

KIMOTO, T.; ARAI, S.; KOHGUCHI, M.; AGA, M.; NOMURA, Y.; MICALLEF, M.J.; KURIMOTO, M.; MITO, K. Apoptosis and suppression of tumor growth by artemisinin C

extracted from Brazilian propolis. **Cancer Detection and Prevention**, v.22, n.6, p.506-515, 1998.

KO, A. I.; GALVÃO REIS, M.; RIBEIRO DOURADO, C. M.; JOHNSON, W. D. JR.; RILEY, L. W. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil, Salvador. **Lancet**, v. 4, n.354, p.820-825, 1999.

KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 10, p. 736-747, 2009.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. **Vaccine**, v.22, n.11-12, p.1545-1552, 2004.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 235–240, 1999.

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

LIAO, S.; SUN, A.; OJCIUS, D. M.; WU, S.; ZHAO, J.; YAN, J. Inactivation of the *fliY* gene encoding a flagellar motor switch protein attenuates mobility and virulence of *Leptospira interrogans* strain Lai. **BMC Microbiology**, v.9, n.253, 2009.

LIN, Y. P.; CHANG, Y. F. A domain of the *Leptospira* LigB contributes to high affinity binding of fibronectin. **Biochemical and Biophysics Research Community**, v.362, p.443–448, 2007.

LIN, Y. P.; RAMAN, R.; SHARMA, Y.; CHANG, Y. F. Calcium binds to leptospiral immunoglobulin-like protein, LigB, and modulates fibronectin binding. **Journal of Biological Chemistry**, v.283, p.25140–24149, 2008.

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.

LIU, M. A.; ULMER, J. B. Human clinical trials of plasmid DNA vaccines. **Advanced Genetics**, v. 55, p.25-40, 2005.

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.

MALMSTRÖM, J.; BECK, M.; SCHMIDT, A.; LANGE, V.; DEUTSCH, E. W.; AEBERSOLD R. Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. **Nature**, v.6, n.460, p.762-765, 2009.

MANEEWATCH, S.; TAPCHAI SRI, P.; SAKOLVAREE, Y.; KLAYSING, B.; TONGTAWE, 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.
- MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V.S.; DE CASTRO, S.L.; DANTAS, A.P.; VALENTE, P.H.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v.74, n.2, p.105-12, 2001.
- 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.
- MATSUNAGA, J.; LO, M.; BULACH, D. M.; ZUERNER, R. L.; ADLER, B.; HAAKE, D. A. Response of *Leptospira interrogans* to physiologic osmolarity: relevance in signaling the environment-to-host transition. **Infection and Immunity**, v.75, p.2864–2874, 2007.
- McBRIDE, A.J.; CERQUEIRA, G.M.; SUCHARD, M.A.; MOREIRA, A.N.; ZUERNER, R.L.; REIS, M.G.; HAAKE, D.A.; KO, A.I.; DELLAGOSTIN, O.A. Genetic diversity of the Leptospiral immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic *Leptospira* spp. **Infection, Genetics and Evolution**, v.9, n.2, p.196-205, 2009.
- 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.
- 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 Microbiology Letters**, v.185, p.17–22, 2000.
- 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.
- MURRAY, G. L.; SRIKRAM, A.; HENRY, R.; HARTSKEERL, R. A.; SERMSWAN, R. W.; ADLER, B. Mutations affecting *Leptospira interrogans* lipopolysaccharide attenuate virulence. **Molecular Microbiology**, v.78, n.3, p.701-709, 2010.
- MURRAY, G. L.; SRIKRAM, A.; HOKE, D. E.; WUNDER, E. A.; HENRY, R.; LO, M.; ZHANG, K.; SERMSWAN, R. W.; KO, A. I.; ADLER, B. Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*. **Infection and Immunity**, v.77, p.952–958, 2009.
- NASCIMENTO, A. L.; KO, A. I.; MARTINS, E. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; HO, P. L.; HAAKE, D. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; HARTSKEERL, R. A.; MARQUES, M. V.; OLIVEIRA, M. C.; MENCK, C. F.; LEITE, L. C.; CARRER, H.;

COUTINHO, L. L.; DEGRAVE, W. M.; DELLAGOSTIN, O. A.; EL-DORRY, H.; FERRO, E. S.; FERRO, M. I.; FURLAN, L. R.; GAMBERINI, M.; GIGLIOTI, E. A.; GÓES-NETO, A.; GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. H.; HARAKAVA, R.; JERÔNIMO, S. M.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; KIMURA, E. T.; KURAMAE, E. E.; LEMOS, E. G.; LEMOS, M. V.; MARINO, C. L.; NUNES, L. R.; DE OLIVEIRA, R. C.; PEREIRA, G. G.; REIS, M. S.; SCHRIEFER, A.; SIQUEIRA, W. J.; SOMMER, P.; TSAI, S. M.; SIMPSON, A. J.; FERRO, J. A.; CAMARGO, L. E.; KITAJIMA, J. P.; SETUBAL, J. C.; VAN SLUYS, M. A. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **Journal of Bacteriology**, v.186, n.7, p.2164-2172, 2004.

ORSATTI, C. L.; MISSIMA, F.; PAGLIARONE, A.C.; BACHIEGA, T.F.; BÚFALO, M.C.; ARAÚJO JR.; J.P., SFORCIN. Propolis immunomodulatory action in vivo on Toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. **Phytotherapy Research**, v.24, p.1141–1146, 2010.

ORSI, R. O.; FUNARI, S. R. C.; SOARES, A. M. V. C.; CALVI, S. A.; OLIVEIRA, S. L.; SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. **The Journal of Venomous Animals and Toxins**, v.6, p.205–219, 2000.

ORSOLIC, N.; SVER, L.; TERZIĆ, S.; BASIĆ, I. Peroral application of water-soluble derivative of propolis (WSDP) and its related polyphenolic compounds and their influence on immunological and antitumour activity. **Veterinary Research**, v.29, n.7, p.575-593, 2005.

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.; CHANG, Y. F. Immunoprotection of recombinant leptospiral immunoglobulin-like protein A against *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection. **Infection and Immunity**, v.74, n.3, p.1745-1750, 2006.

PAULINO, N.; SCREMIN, F. M.; RAICHASKI, L. B.; MARCUCCI, M. C.; SCREMIN, A.; CALIXTO, J. B. Mechanisms involved in the relaxant action of the ethanolic extract of propolis in the guinea-pig trachea *in vitro*. **Journal of Pharmacology**, v.54, p.1–9, 2002.

RAMOS, C. R.; ABREU, P. A.; NASCIMENTO, A. L.; 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 Biology Research**, v.37, p.1103-1109, 2004.

REN, S. X.; FU, G.; JIANG, X. G.; ZENG, R.; MIAO, Y. G.; XU, H. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. **Nature**, v.422, n.6934, p.888-893, 2003.

- RISTOW, P.; BOURHY, P.; MCBRIDE, F. W.; FIGUEIRA, C. P.; HUERRE, M.; AVE, P. I. The OmpA-Like Protein Loa22 Is Essential for Leptospiral Virulence. **PLoS Pathogens**, v.3, n.97, 2007.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Molecular Cloning – **A laboratory Manual**. ed. Cold Spring Harbor, New York, 2001.
- SEHGAL, S. C.; MURHEKAR, M. V.; SUGUNAN, A. P. Outbreak of leptospirosis with pulmonary involvement in north Andaman. **Indian Journal of Medical Research**, v.102, p.9-12, 1995.
- SEIXAS, F. K.; FERNANDES, C. H.; HARTWIG, D. D.; CONCEIÇÃO, F. R.; ALEIXO, J. A.; DELLAGOSTIN, O. A. Evaluation of different ways of presenting LipL32 to the immune system with the aim of developing a recombinant vaccine against leptospirosis. **Canadian Journal of Microbiology**, v.53, n.4, p.472-479, 2007.
- SETUBAL, J. C.; REIS, M. G.; MATSUNAGA, J.; HAAKE, D. A. Lipoprotein computational prediction in spirochaetal genomes. **Microbiology**, v.152, p.113–121, 2006.
- SFORCIN, J. M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, p.1-14, 2007.
- SFORCIN, J. M.; BANKOVA, B. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v.133, p.253–260, 2011.
- SFORCIN, J. M.; ORSI, R. O.; BANKOVA, V. Effects of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. **Journal of Ethnopharmacology**, v.98, p.301–305, 2005.
- SILVA, E. F.; MEDEIROS, M. A.; MCBRIDE, A. J.; MATSUNAGA, J.; ESTEVES, G. S.; RAMOS, J. G.; SANTOS, C. S.; CRODA, J.; HOMMA, A.; DELLAGOSTIN, O. A.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, v.25, n.33, p.6277-6286, 2007.
- SILVA, E. F.; SANTOS, C. S.; ATHANAZIO, D. A.; SEYFFERT, N.; SEIXAS, F. K.; CERQUEIRA, G. M.; FAGUNDES, M. Q.; BROD, C. S.; REIS, M. G.; DELLAGOSTIN, O. A.; KO, A. I. Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in a hamster model. **Vaccine**, v.26, n.31, p.3892-3896, 2008.
- SRIMANOTE, P.; WONGDEETHAI, N.; JIEANAMPUNKUL, P.; SAMONKIERT, S.; LEEPIYASAKULCHAI, C.; KALAMBAHETI, T.; PRACHAYASITTIKUL, V. Recombinant LigA for leptospirosis diagnosis and LigA among the *Leptospira* spp. clinical isolates. **Journal of Microbiology Methods**, v.72, p.73–81, 2008.
- STEVENSON, B.; CHOY, H. A.; PINNE, M.; ROTONDI, M. L.; MILLER, M. C.; DEMOLL, E.; KRAICZY, P.; COOLEY, A. E.; CREAMER, T. P.; SUCHARD, M. A.; BRISSETTE, C. A.; VERMA, A.; HAAKE, D. A. *Leptospira interrogans* endostatinlike

outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. **PLoS ONE**, v.2, n.1188 ,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.

VERNEL-PAUILLAC F.; MERIEN, F. Proinflammatory and immunomodulatory cytokine mRNA time course profiles in hamsters infected with a virulent variant of *Leptospira interrogans*. **Infection and Immunity**, v.74, n.7, p. 4172-4179, 2006.

WANG, Z.; JIN, L.; WEGRZYN, A. Leptospirosis vaccines. **Microbial Cell Factories**, v.11, p.6:39, 2006.

WHO. Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. **World Health Organization**, 2003.

XUE, F.; YAN, J.; PICARDEAU, M. Evolution and pathogenesis of *Leptospira* spp.: lessons learned from the genomes. **Microbes and Infection**, v.11, p. 328-333, 2009.