

DENIZE MONARIS

**“Avaliação do potencial adjuvante da flagelina FliC*i*
de *Salmonella enterica* sorovar Thyphimurium no
desenvolvimento de uma vacina contra leptospirose”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interunidades em Biotecnologia USP
/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título
de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora:

Dra. Patrícia Antonia Estima Abreu de Aniz

Co-orientadora:

Dra. Ângela Silva Barbosa

**São Paulo
2011**

RESUMO

MONARIS, D. **Avaliação do potencial adjuvante da flagelina FliCi de *Salmonella enterica* sorovar Thyphimurium no desenvolvimento de uma vacina contra leptospirose.** 2011. 110 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A leptospirose é uma zoonose de importância global causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, que colonizam os túbulos renais e são liberadas ao ambiente externo pela urina. Algumas vacinas contra esta doença estão sendo usadas, porém promovem proteção apenas contra os sorovares presentes na preparação e falham em induzir imunidade de longa duração. A flagelina, proteína estrutural do flagelo bacteriano, liga-se ao receptor *Toll-like 5* (TLR-5) e promove a ativação da resposta imune inata com subsequente resposta imune adaptativa. Esta proteína é considerada um adjuvante promissor para o desenvolvimento de vacinas. Este trabalho avaliou o potencial adjuvante da flagelina FliCi de *Salmonella enterica* sorovar Thyphimurium na indução de resposta imunoprotetora em uma formulação vacinal acelular composta pela porção C-terminal da proteína LigA (LigAc) e por seis prováveis lipoproteínas de membrana externa recombinantes de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni como alternativa profilática para a leptospirose. As sequências codificantes de seis lipoproteínas e da LigAc foram clonadas no vetor de expressão pAE em *E. coli*. As proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade a metal a partir da fração solúvel (Lp25, Lp21, Lp22) ou do sedimento de corpúsculos de inclusão (Lp11, Lp30, Lp35 e LigAc). A flagelina FliCi foi obtida a partir do sobrenadante de cultura de *S. enterica* sorovar Thyphimurium precipitado com acetona. Os espectros de dicroísmo circular realizados com as proteínas purificadas e as análises feitas por gel SDS-PAGE mostraram que os protocolos de purificação estabelecidos foram adequados para a obtenção das proteínas com rendimento e pureza suficientes e estas mantiveram a conformação estrutural. Hamsters imunizados com LigAc ou LigAc co-administrada com o *pool* das proteínas acrescidas de FliCi ou Al(OH)₃ apresentaram altos títulos de anticorpos contra as proteínas recombinantes e foram protegidos do desafio letal (86-100%). Os animais imunizados com o *pool* + Al(OH)₃ foram parcialmente protegidos (50%) e os animais vacinados com o *pool* + FliCi morreram com sintomas de leptospirose. Animais controle negativos imunizados com PBS acrescido de FliCi ou Al(OH)₃ morreram e os animais imunizados com vacina comercial, bacterina com FliCi ou Al(OH)₃ sobreviveram ao desafio (90-100%). Somente os grupos imunizados com a vacina comercial, bacterina e *Pool* + LigAc + FliCi apresentaram redução na colonização renal (0-28%). Dados preliminares sugerem um aumento da expressão dos genes das citocinas Th1 e Th2 nos grupos que apresentaram proteção e diminuição do número de animais portadores. Em conjunto, estes resultados demonstram que o desenvolvimento de novas formulações vacinais contra a leptospirose, utilizando proteínas recombinantes purificadas como antígenos e a flagelina FliCi como adjuvante, é um caminho promissor.

Palavras-chave: *Leptospira interrogans*. Vacinas. Adjuvantes. Flagelina FliCi. Leptospirose.

ABSTRACT

MONARIS, D. **Adjuvant activity of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FliC_i flagellin in the development of a subunit vaccine against leptospirosis.** 2011. 110 p. Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Leptospirosis is a global zoonotic disease caused by pathogenic spirochetes of the genus *Leptospira* that colonize the renal tubules of wild and domestic animals and are excreted in the environment by their urine. The available vaccines against leptospirosis do not confer cross-protection against the leptospiral serovars not included in the preparation and induce short-term immunity. Flagellin is a structural protein of the bacterial flagellum that binds to *Toll-like* receptor 5 (TLR-5), eliciting the innate and subsequently the adaptative immune response. This protein is considered as a promising adjuvant in the development of vaccines. In the present study, we evaluated the adjuvant activity of *Salmonella enterica* FliC_i flagellin in the protective immunity induced by the C-terminal portion of LigA (LigAc) and also by six other novel recombinant leptospiral outer membrane lipoproteins (OMP) of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. The coding sequences of the above-mentioned proteins were cloned in pAE vector for expression in *E. coli*. The recombinant 6xHis-tagged proteins were purified by nickel affinity chromatography from the soluble (Lp25, Lp21, Lp22) or the insoluble (Lp11, Lp30, Lp35 e LigAc) fraction. Native FliC_i from *S. enterica* serovar Typhimurium was purified from culture supernatant and precipitated with acetone. Circular dichroism spectroscopy revealed that the recombinant proteins preserved their structural integrity, and high purity and yields were observed by SDS-PAGE analyses. Immunization of hamsters with LigAc or LigAc coadministered with OMPs cocktail, both with FliC_i or Al(OH)₃, induced robust antibody responses against recombinant proteins, and conferred protection after challenge (90-100%). Animals inoculated with OMPs cocktail with Al(OH)₃ were partially protected (50%) and those immunized with OMPs cocktail with FliC_i died with symptoms of leptospirosis after challenge. Control animals vaccinated with PBS with Al(OH)₃ or FliC_i died with symptoms of the disease, and hamsters vaccinated with a commercial vaccine, bacterin with FliC_i or Al(OH)₃ survived (90-100%) after challenge. Moreover, only groups inoculated with the commercial vaccine, bacterin or LigAc coadministered with OMPs cocktail and FliC_i as adjuvant showed reduced bacterial load in kidneys (0-28%) with significant enhancement of gene expression of both Th1 and Th2 cytokines. Taken together, our data pave the way for the development of novel vaccine formulations against leptospirosis, using recombinant proteins and FliC_i as adjuvant.

Key-words: *Leptospira interrogans*. Vaccines. Adjuvants. FliC_i flagellin. Leptospirosis.

INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de importância mundial. É causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, que colonizam os túbulos renais de animais silvestres ou domésticos e são liberadas no ambiente externo pela urina. A transmissão ocorre por meio de contato direto com animais infectados ou, mais frequentemente, pela exposição à água, alimentos e solo contaminados com sua urina (BHARTI et al., 2003; FARR, 1995).

Até 1989, o gênero *Leptospira* era dividido em duas espécies. A espécie *L. interrogans* (senso lato) que compreendia todas as estirpes patogênicas, e a *L. biflexa* (senso lato) com as cepas saprófitas (LEVETT, 2001). Posteriormente, o gênero foi reclassificado, com base em análises de hibridação DNA-DNA, constituindo diferentes espécies genômicas. São conhecidas oito espécies patogênicas: *L. interrogans* (senso estrito), *L. alexanderi*, *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. weilii* e *L. alstoni*; duas espécies saprófitas, como a *L. biflexa* (senso estrito) e a *L. wolbachii* e um grupo intermediário com cinco espécies, dentre as quais, a *L. inadai* e *L. fainei*, cuja patogenicidade não foi confirmada (YASUDA et al., 1987; BRENNER et al., 1999; FAINE et al., 1999; KO et al., 2009).

As leptospiras também são classificadas em sorovares definidos por reações de aglutinação após absorção dos soros com antígenos homólogos. Os sorovares antigenicamente relacionados são reunidos num mesmo sorogrupo. Existem cerca de 250 sorovares de leptospiras patogênicas e saprófitas descritos em 23 sorogrupos (FAINE et al., 1999). Esta variedade antigênica se deve à heterogeneidade da estrutura na composição do LPS (lipopolissacarídeo). A classificação fenotípica em sorovar é amplamente utilizada devido à sua importância epidemiológica e clínica, embora, não se correlacione com a classificação genética (LEVETT, 2001; ADLER e MOCTEZUMA, 2010).

Cada sorovar de leptospira está, geralmente, adaptado a uma espécie particular de hospedeiro, conhecido como hospedeiro de manutenção (reservatório). Neste, a doença manifesta-se de maneira subclínica e crônica com eliminação de leptospiras pela urina (leptospiúria) durante longo período ou por toda a vida, tornando-o a principal fonte de contaminação ambiental para as outras espécies animais, denominadas hospedeiros acidentais, que desenvolvem a forma clínica da doença (FAINE et al., 1999; KO et al., 2009).

Em áreas urbanas, os principais reservatórios de leptospiras são os roedores sinantrópicos das espécies *Rattus norvegicus* (rato de esgoto), *Rattus rattus* (rato de telhado) e *Mus musculus* (camundongo). Os seres humanos são hospedeiros acidentais e a transmissão

entre pessoas é rara, apesar das leptospirosas serem eliminadas por vários meses após a infecção. A *L. interrogans* prevalece como a espécie que mais causa leptospirose em seres humanos em todo o mundo (LEVETT, 2001).

As bactérias do gênero *Leptospira* são móveis, aeróbias estritas e diferenciam-se de outras espiroquetas por possuírem a célula terminada em gancho e dois flagelos periplasmáticos (LEVETT, 2001). Não se coram bem com corantes bacteriológicos convencionais e são visualizadas utilizando-se microscópio de campo escuro ou de contraste de fase. Podem ser demonstradas nos tecidos por impregnação pela prata ou pelo emprego de imunohistoquímica (ALEXANDER et al., 1986). As leptospirosas sobrevivem em solo úmido ou na água, que tenham pH neutro ou alcalino (LOMAR et al., 2000).

A incidência de leptospirose é significativamente mais alta em países tropicais do que em países de clima temperado, provavelmente porque o clima quente e úmido favorece a sobrevivência das leptospirosas. A infecção em humanos está principalmente relacionada à exposições ocupacionais, recreativas e esportivas em países desenvolvidos, já que profissionais como veterinários, agricultores e trabalhadores de serviços de água e esgoto, por exemplo, ou praticantes de esportes aquáticos, podem ter contato direto com a urina de mamíferos hospedeiros (LEVETT, 2001). Em países subdesenvolvidos, a doença está diretamente relacionada às condições inadequadas de moradia, ausência de saneamento básico e à alta infestação por roedores infectados (KO et al., 1999; LOMAR et al., 2000; BHARTI et al., 2003).

No Brasil, a leptospirose é considerada um problema de saúde pública. É bastante disseminada principalmente em épocas de chuvas, pois muitas áreas estão sujeitas a alagamentos e possuem saneamento básico deficiente. São relatados mais de 10.000 casos de leptospirose grave todo ano (REIS et al., 2008; SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE, 2009). Na pecuária, a leptospirose tem causado grandes perdas econômicas por influenciar o potencial reprodutivo do rebanho. Nos bovinos, por exemplo, provoca infertilidade, mastites, abortos, natimortalidade e decréscimo na produção de leite e de carne (FAINE et al., 1999).

As leptospirosas patogênicas invadem os tecidos do hospedeiro através da penetração pela pele lesada ou mucosas da boca, narina e olhos. Podem também penetrar pela pele íntegra quando imersa em água por longo tempo. Espalham-se no organismo pela corrente sanguínea e causam lesões, principalmente, no fígado e rins, onde produzem hemorragia e necrose tecidual, resultando na disfunção desses órgãos (VINETZ, 2001; FAINE et al., 1999).

As manifestações clínicas da leptospirose humana ocorrem em duas fases distintas. Na fase aguda ou septicêmica, o paciente apresenta febre alta, dores de cabeça, mialgias. A

seguir, pode ocorrer um período com aparente melhora. Posteriormente, a fase imune inicia-se com o retorno do estado febril, produção de anticorpos aglutinantes e excreção de leptospiras pela urina. A maioria dos casos de leptospirose apresenta-se sob a forma leve ou moderada, cujos sintomas são os descritos para as fases aguda e imune. A leptospirose grave raramente apresenta-se bifásica. Inicia-se com sintomas bastante intensos, como dor nas panturrilhas e febre e evolui para doença icterícia com insuficiência renal e hemorragia pulmonar, representando 5 a 10% do número total de casos, podendo chegar a 40% de letalidade (LEVETT, 2001; VINETZ, 2001).

Os animais domésticos e de criação mais comumente acometidos são cães, bovinos, suínos e equinos. As manifestações da leptospirose canina são septicemia e comprometimento hepático e renal. Em bovinos e suínos, a doença séptica é mais comum em jovens, enquanto o abortamento é a principal manifestação em adultos. A uveíte recidivante é a ocorrência mais comuns em equinos (FAINE et al., 1999).

O tratamento do paciente com leptospirose é feito com antibióticos (doxiciclina e penicilinas) que reduzem as chances de evolução para a forma grave. As pessoas com leptospirose sem icterícia podem ser tratadas em casa. As que desenvolvem as formas graves da doença necessitam de internação com tratamento intensivo (BHARTI et al., 2003; LEVETT, 2003).

O diagnóstico clínico da doença não é fácil, devido à variedade de sintomas e ao fato de serem semelhantes aos de outras doenças, como febre amarela, dengue, malária, hepatite e gripe. Pode ser confirmado por meio de testes sorológicos como a aglutinação microscópica (MAT), técnica de referência indicada pela Organização Mundial da Saúde para leptospirose humana ou animal, que emprega suspensões de leptospiras vivas como antígeno (LEVETT, 2001, 2003). Normalmente, o MAT demora até duas semanas para confirmar o diagnóstico clínico da doença. O diagnóstico errado pode levar à progressão para formas mais graves, inclusive com hemorragia pulmonar, que geralmente leva os pacientes ao óbito.

O controle da leptospirose envolve medidas difíceis de serem adotadas, como a eliminação de roedores e a melhoria das condições de moradia da população. Dadas as dificuldades em se implementar tais medidas, tem havido um aumento da incidência da doença em países tropicais, o que reforça a necessidade de desenvolvimento de uma vacina eficiente (FAINE et al., 1999).

As vacinas comerciais disponíveis até o momento consistem em preparações de culturas de leptospiras de diferentes sorovares de *L. interrogans* inativadas pela ação do calor e/ou formol (bacterinas). São amplamente usadas na pecuária e, licenciadas para uso humano

somente em Cuba, Rússia, China e Argentina. Todas apresentam baixa eficiência, pois promovem proteção, usualmente, contra os sorovares presentes na preparação e falham em induzir imunidade de longa duração, o que requer administração anual ou semestral (FAINE et al., 1999; BHARTI et al., 2003). Além disso, contêm uma série de contaminantes oriundos do processo de obtenção, como componentes do meio e lipopolissacarídeos (LPS), que têm sido associados aos efeitos adversos observados (LEVETT, 2001; ADLER e MOCTEZUMA, 2010).

Como alternativa, tem sido proposto o desenvolvimento de uma vacina multivalente com o emprego de proteínas de membrana de *Leptospira* que, além de estarem envolvidas na interação das bactérias com as células do hospedeiro, também são bastante conservadas entre as diferentes espécies e sorovares. Sonrier et al. (2000) demonstraram que extratos protéicos de *L. interrogans* foram capazes de induzir proteção contra diferentes sorovares, enquanto frações de lipopolissacarídeos conferiram proteção apenas contra sorovares presentes na preparação. Neste sentido, várias proteínas de membrana externa, lipoproteínas, toxinas e fatores de virulência de *Leptospira spp.* já foram identificadas e suas formas recombinantes têm sido avaliadas como candidatos vacinais em modelos animais (WANG et al., 2007).

Recentemente, foram sequenciados seis genomas de *Leptospira spp.*, sendo de dois sorovares de *L. interrogans* (Lai e Copenhageni) (REN et al., 2003; NASCIMENTO et al., 2004a, b), de duas estirpes de *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo-bovis (L550 e JB197), (BULACH et al., 2006) e de duas estirpes da espécie saprófita *L. biflexa* sorovar Patoc I (Paris e Ames) (PICARDEAU et al., 2008).

As análises computacionais destas sequências têm contribuído para a identificação de genes que codificam possíveis proteínas de membrana externa presentes nas espécies patogênicas, a maioria prováveis lipoproteínas que podem estar envolvidas na patogenicidade e constituem alvos potenciais para a indução de resposta imune (SETUBAL et al., 2006). As lipoproteínas bacterianas são um grupo de proteínas de membrana que possuem a cisteína amino-terminal covalentemente ligada a ácidos graxos. São sintetizadas com um peptídeo sinal, clivado por uma peptidase sinal antes da ligação covalente aos ácidos graxos. Várias lipoproteínas bacterianas já foram identificadas e caracterizadas como proteínas estruturais, enzimas, receptores, transportadores, adesinas, toxinas e com funções relacionadas com virulência (BABU e SANKARAN, 2002; SUTCLIFFE e HARRINGTON, 2004; SETUBAL et al., 2006; BARBOSA et al., 2006; VIEIRA et al., 2007; ATZINGEN et al., 2008; BARBOSA et al., 2010). Portanto, lipoproteínas bacterianas apresentam potencial para serem utilizadas como antígenos vacinais.

O hamster e o cobaio são os modelos utilizados para os estudos da patogenia e eficiência de vacinas, pois além de serem susceptíveis à infecção, potencialmente fatal por leptospirosas patogênicas, reproduzem as lesões de órgãos-alvo da leptospirose humana grave (DE BRITO et al., 1966; RANDALL e COOPER, 1944; ZEIGLER et al., 1976). Camundongos C3H/HeJ também têm sido utilizados na leptospirose experimental, mas não são considerados modelos ideais, pois necessitam ser inoculados com grandes quantidades de leptospirosas para reproduzirem a doença e as outras linhagens de camundongos geralmente apresentam resistência à infecção (KOIZUMI et al., 2004; MCBRIDE et al., 2005).

Entre as proteínas avaliadas nesses modelos experimentais, destacam-se: a OmpL1 e a lipoproteína LipL41 que, quando expressas como proteínas de membrana em *E. coli* conferiram imunoproteção parcial em hamsters (HAAKE et al., 1999). A lipoproteína LipL32 também chamada proteína 1 associada à hemolisina (Hap-1) foi capaz de induzir imunidade protetora parcial em experimentos de desafio que utilizaram diferentes construções, como vacina de DNA, vacina de adenovírus e *Mycobacterium bovis* BCG recombinante, mas quando testada como proteína recombinante purificada não foi eficiente (HAAKE et al., 1999; BRANGER et al., 2001, 2005).

As proteínas Lig (*Leptospiral immunoglobulin-like*) pertencentes à família de proteínas bacterianas que se caracterizam pela presença de domínios Big repetidos, também têm sido estudadas. Três genes *lig* (*ligA*, *ligB* e *ligC*) já foram descritos e só estão presentes em espécies patogênicas. O gene *ligB* é encontrado em várias espécies de leptospirosas enquanto *ligA* é restrito às espécies *L.interrogans* e *L.kirschneri* e *ligC* é um pseudogene. (KOIZUMI e WATANABE, 2004; MATSUNAGA et al., 2003; PALANIAPPAN et al., 2002; CERQUEIRA et al., 2009).

LigA e LigB estão localizadas na membrana externa da bactéria e participam dos processos de adesão das leptospirosas às células do tecido do hospedeiro (MATSUNAGA et al., 2003). Possuem as regiões amino-terminais idênticas, que correspondem a seis domínios Big (*bacterial-Ig-like*) repetidos, seguidas por uma região variável de, aproximadamente, sete domínios Big repetidos. LigB apresenta ainda uma região carboxi-terminal sem domínios Big repetidos (MATSUNAGA et al., 2003). São considerados os candidatos vacinais mais promissores testados até o momento. Resultados obtidos por vários grupos mostraram que estas proteínas foram capazes de induzir proteção contra leptospirose em camundongos C3H/HeJ e hamsters (KOIZUMI e WATANABE, 2004; PALANIAPPAN; RAMANUJAM; CHANG, 2007; SILVA et al., 2007; FAISAL et al., 2008; YAN et al., 2008).

O fragmento carboxi-terminal da LigA foi capaz de conferir imunoproteção contra desafio letal em hamsters em experimentos que utilizaram a proteína recombinante com adjuvante de Freund (67 a 100% de proteção), com hidróxido de alumínio (50% de proteção), em sistemas carreadores formados por lipossomos (87,5% de proteção) e microesferas (75% de proteção). Da mesma maneira, os fragmentos amino-terminal da LigB (71% de proteção) e carboxi-terminal da LigB (54% de proteção) recombinantes com hidróxido de alumínio como adjuvantes foram capazes de induzir proteção contra leptospirose em hamsters. Entretanto, em todos estes experimentos, os animais sobreviventes foram positivos no isolamento de leptospiras em amostras dos rins e fígado, embora, estudos histopatológicos revelem menor gravidade das lesões nestes órgãos e nos pulmões dos animais experimentais quando comparados com os controles não imunizados (SILVA et al., 2007; FAISAL et al., 2008; YAN et al., 2008).

Por outro lado, estudos utilizando bacterinas preparadas a partir de culturas de *L. interrogans* sorovar Autumnalis inativadas pela ação do calor ou formol em hamsters mostraram que estas vacinas também não foram eficientes na prevenção da colonização dos rins, embora tenham apresentado altas taxas de proteção (90-100%) e diminuição dos danos nos órgãos-alvo (SRIKRAM et al., 2008).

Todos os resultados, com base na literatura, indicam que tanto as bacterinas quanto as proteínas recombinantes testadas não foram capazes de induzir uma resposta imune adequada. Apesar de induzirem proteção, não preveniram a leptospiúria.

Os mecanismos de imunidade contra a leptospirose ainda não são completamente compreendidos. Sempre se acreditou que a resposta humoral fosse o principal mecanismo de defesa contra a leptospirose, pois as leptospiras são patógenos extracelulares e a proteção passiva já foi demonstrada em hamsters (FAINE, 1999; JOST et al., 1986). Entretanto, há relatos na literatura que indicam uma importante participação da resposta celular na imunidade adquirida contra a leptospirose.

Uma vacina comercial monovalente, contra a *Leptospira borgpetersenni* sorovar Hardjo testada em bovinos induziu imunidade protetora associada à resposta Th1 caracterizada por linfócitos T CD4⁺ e altos níveis de IFN- γ . Esta vacina foi capaz de prevenir a colonização renal e a leptospiúria (NAIMAN et al., 2001).

Além disso, tem sido especulado que as leptospiras poderiam ter uma fase intracelular rápida, durante a translocação através das monocamadas celulares, o que poderia ser um mecanismo de evasão do sistema imune e também facilitaria a entrada e saída da corrente sanguínea para infectar órgãos-alvo. A presença de leptospiras no citoplasma de macrófagos,

monócitos e células Vero foi observada *in vitro*. Apesar disso, não existem evidências que estas bactérias sejam capazes de se multiplicarem no interior das células hospedeiras, o que sugere que as leptospiros sejam bactérias invasivas, mas não intracelulares facultativas (MERIEN et al., 1997; BAROCCHI et al., 2002).

Talvez a combinação de vários antígenos protéicos purificados com novas abordagens vacinais seja um caminho mais promissor para o desenvolvimento de uma vacina contra leptospirose capaz de induzir mecanismos imunológicos (humoral e celular) envolvidos na proteção e prevenção da colonização dos órgãos-alvo. Entretanto, antígenos constituídos por subunidades e proteínas recombinantes purificadas possuem baixa imunogenicidade e requerem a adição de adjuvantes para melhorar a resposta imune (RAPPUOLI, 2010).

O conhecimento dos mecanismos de imunidade Th1 e Th2 é de grande importância para a obtenção de uma vacina eficaz contra leptospirose, assim como para a compreensão da patogênese da infecção natural ou induzida.

Segundo Vernel-Pauillac (2006) a imunidade mediada por células, na defesa do hospedeiro contra a leptospirose ainda é pouco compreendida, mas estudos *in vitro* tem apontado a importância das citocinas no mecanismo pelo qual as leptospiros ativam o sistema imune, como por exemplo que a *Leptospira* induz *in vitro* citocinas de resposta Th1 através de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), e estas, apresentam vantagens em relação à células cultivadas, pois são mais representativas em relação à resposta imune *in vivo*. A adversidade é que a lise celular gera grandes quantidades de proteínas, necessitando assim etapas de purificação do material antes da extração do RNA total. Um método eficiente para analisar a produção de citocinas é quantificar o seu mRNA através da técnica de PCR em tempo real (RTq-PCR) (VERNEL-PAUILLAC, 2006).

A identificação e desenvolvimento de novos adjuvantes são necessários porque há poucos licenciados para uso humano, entre eles o hidróxido de alumínio que tem sido utilizado por mais de 70 anos e tem comprovada segurança. Este adjuvante induz o aumento na migração macrofágica e neutrofílica para o sítio de inoculação, explicando o fato que dentre os efeitos colaterais do seu uso temos o eritema, nódulos subcutâneos, hipersensibilidade de contato e inflamação granulomatosa. Sabe-se, também, que o hidróxido de alumínio também induz um aumento da permeabilidade vascular associado a efeito tóxico sobre macrófagos que, além de não ser eficaz com todos os antígenos porque estimula, principalmente, a imunidade humoral tornando-se deficiente na indução de resposta imune celular (RESENDE et al., 2004; RAPPUOLI, 2010).

O sistema imune dos mamíferos é formado pela imunidade inata e adaptativa. O desenvolvimento adequado dos mecanismos efetores da resposta imune adaptativa (mediados por células B, linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺) depende da ativação inicial de componentes da imunidade inata. O sistema imune inato é filogeneticamente conservado e é o primeiro a ser ativado na defesa contra a infecção (JANEWAY e MEDZHITOV, 2002).

Os receptores *Toll-like* (TLRs) constituem uma importante família de receptores do sistema imune inato que reconhecem padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs). A ativação desses receptores por PAMPs induz a fagocitose e a liberação de citocinas e mediadores químicos. Estes eventos são fundamentais no desenvolvimento da resposta imune adaptativa subsequente (TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003; AKIRA e TAKEDA, 2004).

As proteínas que formam o filamento do flagelo bacteriano, denominadas genericamente de flagelinas, são potentes indutores da resposta imune inata. O reconhecimento da flagelina ocorre, principalmente, através de sua ligação ao receptor *Toll-like 5* (TLR5) encontrado na superfície de células apresentadoras de antígenos (APCs), como macrófagos e células dendríticas (ANDERSEN-NISSEN et al., 2007; STEINER, 2007).

A ligação da flagelina ao TLR5 inicia uma cascata de sinalização que resulta no recrutamento de proteínas adaptadoras, como o fator de diferenciação mielóide (MyD88), e na ativação do fator nuclear de transcrição (NF-κB) (AKIRA e TAKEDA, 2004). Estes eventos levam à ativação e maturação das APCs, incluindo o processamento e apresentação dos antígenos, aumento da expressão do complexo principal de histocompatibilidade e de moléculas reguladoras, bem como secreção de quimiocinas pro-inflamatórias e citocinas. Estas etapas são importantes para a ativação de respostas de células B, linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (IWASAKI e MEDZHITOV, 2004; MEDZHITOV e JANEWAY, 1999; TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003).

Esse conhecimento tem sido utilizado no desenvolvimento de novas estratégias vacinais, que, coordenadamente, ligam a resposta imune inata e adaptativa, através da incorporação da flagelina nas formulações antigênicas. Resultados obtidos por vários grupos têm demonstrado que a flagelina é um adjuvante promissor capaz de aumentar a imunogenicidade e capacidade protetora do antígeno (NEWTON et al., 1989, 1991; SBROGIO-ALMEIDA et al., 2004; LEE et al., 2006; MACDONALD et al., 2007; HULEATT et al., 2008; BRAGA et al., 2008; BARGIERI et al., 2008)

Em *Salmonella spp.*, existem três diferentes flagelinas (FliC_d, FliC_i e FljB) que possuem as regiões amino e carboxi-terminais conservadas e a região central variável tanto na

sequência de aminoácidos quanto no tamanho. As regiões conservadas das flagelinas são as responsáveis pela interação com TLR5 (NEWTON et al., 1989; RAMOS; RUMBO; SIRARD, 2004b). Smith et al. (2003) demonstraram que monômeros de flagelina são muito mais potentes na indução da atividade do TLR5 do que polímeros, provavelmente porque o sítio de reconhecimento deste receptor é inacessível dentro do filamento intacto.

CONCLUSÕES

- Os espectros de dicroísmo circular realizados, com as proteínas purificadas e as análises feitas por gel SDS-PAGE, mostraram que os protocolos de purificação estabelecidos foram adequados, para a obtenção das proteínas com bom rendimento, bandas majoritárias sem contaminantes e conformação estrutural das proteínas recombinantes preservada.
- As análises de dicroísmo circular também demonstraram a presença de estruturas α -hélice e randômica nas proteínas recombinantes Lp25, Lp11, Lp21, Lp22 e LigAc, e uma predominância de estrutura randômica e folha β -pregueada nas proteínas Lp35 e Lp30.
- A imunização dos animais, com a vacina comercial, bacterina +Al(OH)₃ ou FliCi, foi capaz de induzir uma resposta imune humoral específica contra a bacterina do sorovar Copenhageni e contra três das sete proteínas recombinantes avaliadas. As proteínas Lp25, Lp11, Lp30 e Lp35 não foram reconhecidas por este soro e as proteínas Lp25, Lp22 e a LigAc foram as mais imunogênicas
- A imunização dos animais, com o *pool* de proteínas, foi capaz de induzir uma resposta imune humoral específica contra cada proteína recombinante. As proteínas mais imunogênicas foram Lp21, Lp22, Lp35 e Lp30, seguidas pelas proteínas Lp11 e Lp25 nos grupos imunizados com o *pool* + FliCi. Nos grupos imunizados com *pool* + Al(OH)₃ a proteína que apresentou maior título foi a Lp21.
- Os resultados, obtidos por *ELISA*, indicam que os soros dos animais imunizados com as diferentes preparações vacinais, na presença de FliCi, apresentam títulos de anticorpos maiores contra as proteínas recombinantes ou bacterina do que quando o hidróxido de alumínio administrado como adjuvante.
- A especificidade do reconhecimento das proteínas recombinantes, pelos soros dos animais imunizados com o *pool* de proteínas, foi confirmada por western-blotting.
- Hamsters imunizados com LigAc, ou LigAc co-administrada com o *pool* das proteínas, acrescido de FliCi ou Al(OH)₃, foram protegidos do desafio letal (86-100%).

- Os animais imunizados, com o *pool* + Al(OH)₃, foram parcialmente protegidos (50%) e os animais vacinados, com o *pool* + Fli*Ci*, morreram com sintomas de leptospirose.

- Animais controle negativos, imunizados com PBS acrescido de Fli*Ci* ou Al(OH)₃, morreram e os animais imunizados com vacina comercial, bacterina com Fli*Ci* ou Al(OH)₃, sobreviveram ao desafio (97-100%).

- Somente os grupos imunizados com a vacina comercial, bacterina e *Pool* + LigAc + Fli*Ci* apresentaram redução na colonização renal (0-28%).

- Os resultados do teste de SAM e inibição do crescimento bacteriano revelaram que somente os soros dos animais imunizados com a vacina comercial, bacterina + Al(OH)₃, bacterina + Fli*Ci* apresentaram aglutinação e neutralização de leptospirosas.

- Dados preliminares sugerem um aumento da expressão dos genes das citocinas de resposta Th1 e Th2 nos grupos que apresentaram proteção e diminuição do número de animais portadores.

REFERÊNCIAS¹

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Vet. Microbiol.**, v. 27, n. 140, p. 287-296, 2010.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, n. 7, p. 499-511, 2004.

AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll Like receptor: Critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nat. Immunol.**, v. 2, n. 8, p. 675-680, 2001.

ALEXANDER, A. D. Leptospira. In: BRAUDE, A.I.; DAVIS, C.E.; FIERER. **J. Infectious Diseases and Medical Microbiology**. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986.

ANDERSEN-NISSEN, E.; SMITH, K. D.; BONNEAU, R.; STRONG, R. K.; ADEREM, A. A conserved surface on Toll-like receptor 5 recognizes bacterial flagellin. **JEM**, v. 204, n. 2, p. 393-403, 2007.

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 Microbiol.**, v. 29, n. 8, p. 70, 2008.

BABU, M. M.; SANKARAN, K. DOLOP- Database of bacterial lipoprotein. **Bioinformatics**, v. 18, p. 641-643, 2002.

BARBOSA, A. S.; ABREU, P. A.; NEVES, F. O.; ATZINGEN, M. V.; WATANABE, M. M.; VIEIRA, M. L.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO A. L. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 11, p. 6356-6364, 2006.

BARBOSA, A. S.; MONARIS, D.; SILVA, L. B.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S.A.; CIANCIARULLO, A. M.; ISAAC, L.; ABREU, P. A. Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of *Leptospira* spp. that binds the human complement regulator C4BP. **Infect. Immun.**, v. 78, n. 7, p. 3207-3216, 2010.

¹De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospiriosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, p. 757-771, 2003.

BRAGA, C. J. M.; MASSIS, L. M.; ALENCAR, B. C. G.; RODRIGUES, M. M.; SBROGIO-ALMEIDA; FERREIRA, L. C. S. Cytotoxic T cell adjuvant effects of three *Salmonella enterica* flagellins. **Braz. J. Microbio.**, v. 39, p. 44-49, 2008.

BRANGER, C.; CHATRENET, B.; GAUVRIT, A.; AVIAT, F.; AUBERT, A.; BACH, J. M.; ANDRÉ-FONTAINE, G. Protection against *Leptospira interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. **Infection. Immun.**, v. 73, n. 7, p. 4062-4069, 2005.

BRANGER, C.; SONRIER, C.; CHATRENET, B.; KLONJKOWSKI, B.; RUVOEN-CLOUET, N.; AUBERT, A.; ANDRÉ-FONTAINE, G.; ELOIT, M. Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. **Infection. Immun.**, v. 69, n. 11, p. 6831-6838, 2001.

BRENNER, D. J.; KAUFMANN, A. F.; SULZER, K. R.; STEIGERWALT, A. G.; ROGER, F.; WEYANT, R. S. Further determination of DNA relatedness between serogroups and sorovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 49, p. 839-858, 1999.

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. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 103, n. 39, p. 14560-14565, 2006.

BURNETTE, W. N. Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Anal. Biochem.**, v. 112, n. 2, p. 195-203, 1981.

CERQUEIRA, G. M. **Caracterização de *Leptospira spp* quanto à presença e conservação dos genes da família *lig*: importantes alvos para utilização em vacina e testes de diagnóstico.** 2006. 53 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa Biotecnologia Agrícola, Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, 2006.

CERQUEIRA, G. M.; MCBRIDE, A. J.; PICARDEAU, M.; RIBEIRO, S. G.; MOREIRA, A. N.; MOREL, V.; REIS, M. G.; KO, A. I.; DELLAGOSTIN, O. A. Distribution of the leptospiral immunoglobulin-like (lig) genes in pathogenic *Leptospira* species and application of ligB to typing leptospiral isolates. **J. Med. Microbiol.**, v. 58, p. 1173-1181, 2009.

CHANG, Y. F.; CHEN, C. S.; PALANIAPPAN, R. U.; HE, H.; MCDONOUGH, S. P.; BARR, S. C.; YAN, W.; FAISAL, S. M.; PAN, M. J.; CHANG, C. F. Immunogenicity of the recombinant leptospiral putative outer membrane proteins as vaccine candidates. **Vaccine**, v. 23, n. 48, p. 8190-8197, 2007.

COMBET, C.; BLANCHET, C.; GEOURJON, C.; DELÉAGE, G. NPS@: network protein sequence analysis. **Trends Biochem. Sci.**, v. 25, n. 3, p. 147-150, 2000.

DE BRITO, T.; FREYMÜLLER, E.; HOSHINO, S.; PENNA, D. O. Pathology of the kidney and liver in the experimental leptospirosis of the guinea-pig. A light and electron microscopy study. **Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.**, v. 13, n. 341, p. 64-78, 1966.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis**. 2nd ed. Melbourne, Australia: MediSci., 1999.

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. 10, n. 2, p. 277-287, 2008.

FAISAL, S. M.; YAN, W.; MCDONOUGH, S. P.; CHANG, C. F.; PAN, M. J.; CHANG, Y. F. Leptosome-entrapped leptospiral antigens conferred significant higher levels of protection than those entrapped with PC-liposomes in a hamster model. **Vaccine**, v. 27, n. 47, p. 6537-6545, 2009.

FARR, R. W. Leptospirosis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 21, p. 1-8, 1995.

GAMBERINI, M.; GÓMEZ, R. M.; ATZINGEN, M. V.; MARTINS E. A. L.; VASCONCELLOS, S. A.; ROMERO, E. C.; LEITE, L. C. C.; HO, P. L.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. **Fems. Microbiology Letters**, v. 244, p. 305-313, 2005.

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, p. 6572-6582, 1999.

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. 6572-6582, 1999.

HOTEZ, P. J.; FERRIS, M. T. The antipoverty vaccines. **Vaccine**, v. 24, p. 5787-5799, 2006.

HULEATT, J. W.; NAKAAR, V.; DESAI, P.; HUANG, Y.; HEWITT, D.; JACOBS, A.; TANG, J.; MCDONALD, W.; SONG, L.; EVANS, R. K.; UMLAUF, S.; TUSSEY, L.; POWELL, T. J. Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin. **Vaccine**, v. 26, p. 201-214, 2008.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptative immune responses. **Nat. Immunol.**, v. 5, n. 10, p. 987-995, 2004.

JANEWAY, J. R. C. A.; MEDZHITOV, R. Innate Immune induction of the adaptative immune response. Cold Spring Harb. Symp. **Quant. Biol.**, v. 64, p. 429-435, 1999.

JOST, B. H.; ADLER, B.; VINH, T.; FAINE, S. A monoclonal antibody reacting with a determinant on leptospiral lipopolysaccharide protects guinea pigs against leptospirosis. **J. Med Microbiol.**, v. 22, n. 3, p. 269-275, 1986.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1751, p. 119-139, 2005.

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

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

LEE, S. E.; KIM, S. Y.; JEONG, B. C.; KIM, Y. R.; BAE, S. J.; AHN, O. S.; LEE, J. J.; SONG, H. C.; KIM, J. M.; CHOY, H. E.; CHUNG, S. S.; KWEON, M. N.; RHEE, J. H. A bacterial flagellin, *Vibrio vulnificus* FlaB, has a strong mucosal adjuvant activity to induce protective immunity. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 1, p. 694-702, 2006.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 296-326, 2001.

LEVETT, P. N. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 36, p. 447-452, 2003.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOMAR, A. V.; DIAMENT, D.; TORRES, J. R. Leptospirosis in Latina America. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 14, n. 1, p. 23-39, 2000.

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. **Mol. Microbiol.**, v. 49, n. 4, p. 929-945, 2003.

MCBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. Leptospirosis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 18, p. 376-386, 2005.

MCDONALD, W. F.; HULEATT, J. W.; FOELLMER, H. G.; HEWITT, D.; TANG, J.; DESAI, P.; PRICE, A.; JACOBS, A.; TAKAHASHI, V. N.; HUANG, Y.; NAKAAR, V.; ALEXOPOULOU, L.; FIKRIG, E.; POWELL, T. J. A West Nile virus recombinant protein vaccine that coactivates innate and adaptive immunity. **J. Infect. Dis.**, v. 195, n. 11, p. 1607-1617, 2007.

MIROUX, B.; WALKER, J. E. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. **J. Mol. Biol.**, v. 260, n. 3, p. 289-298, 1996.

NAIMAN, B. M.; ALT, D.; BOLIN, C. A.; ZUERNER, R.; BALDWIN, C. L. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and gamma delta T lymphocytes. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 12, p. 7550-7558, 2001.

NASCIMENTO, A. L.; KO, A. I.; MARTINS, E. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; et al. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 7, p. 2164-2172, 2004b.

NASCIMENTO, A. L.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; VAN SLUYS, M. A.; MONTEIRO-VITORELLO C. B.; CAMARGO L. E. A.; DIGIAMPIETRI, L. A.; HARSTKEERL, R. A.; HO, P. L.; MARQUES, M. V.; OLIVEIRA, M. C.; SETUBAL, J. C.; HAAKE D. A.; MARTINS, E. A. L. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, n. 4, p. 459-477, 2004a.

NEWTON, S. M.; JACOB, C. O.; STOCKER, B. A. Immune response to cholera toxin epitope inserted in Salmonella flagellin. **Science**, v. 244, n. 4900, p. 70-72, 1989.

NEWTON, S. M.; KOTB, M.; POIRIER, T. P.; STOCKER, B. A.; BEACHEY, E. H. Expression and immunogenicity of a streptococcal M protein epitope inserted in Salmonella flagellin. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 6, p. 2158-2165, 1991.

NISHI, S. M.; VIERO, L. M.; SOARES, M. S.; MAIORKA, P. C.; GENNARIL, S. M. Emprego da RT-PCR em tempo real para a quantificação da expressão de genes associados à resposta imune em bezerros bovinos experimentalmente infectados por *Neospora caninum*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 18, n. 1, p. 8-14, 2009.

PALANIAPPAN, R. U.; RAMANUJAM, S.; CHANG, Y. F. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 20, n. 3, p. 284-292, 2007.

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*. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 11, p. 5924-5930, 2002.

PICARDEAU, M.; BULACH, D. M.; BOUCHIER, C.; ZUERNER, R. L.; ZIDANE, N.; WILSON, P. J.; CRENO, S.; KUCZEK, E. S.; BOMMEZZADRI, S.; DAVIS, J. C.; MCGRATH, A.; JOHNSON, M. J.; BOURSAUX-EUDE, C.; SEEMANN, T.; ROUY, Z.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; LAJUS, A.; DAVIES, J. K.; MÉDIGUE, C.; ADLER, B. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. **PLoS One**, v. 3, n. 2, p. 1607, 2008.

RAMOS, C. R.; ABREU, P. A. E.; 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. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, p. 1103-1109, 2004a.

RAMOS, H. C.; RUMBO, M.; SIRARD, J. C. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. **Trends Microbiol.**, v.12, n. 11, p. 509-517, 2004b.

RANDALL, R.; COOPER, H. K. The golden hamster (*Cricetus auratus*) as test animal for diagnosis the leptospirosis. **Science**, v. 100, p. 133-134, 1944.

RAPPUOLI, R.; MEDINI, D.; SIENA, E.; BUDRONI, S.; DORMITZER, P. R.; DEL GIUDICE, G. Building an insurance against modern pandemics. **Curr. Opin. Investig. Drugs.**, v. 11, n. 2, p. 126-130, 2010.

REED, L. J.; MUENCH, H. a simple method of estimating fifty percent endpoints. **Am. J. Hyg.**, v. 27, p. 493-497, 1938.

REIS, R. B.; RIBEIRO, G. S.; FELZEMBURGH, R. D.; SANTANA, F. S.; MOHR, S.; MELENDEZ, A. X.; QUEIROZ, A.; SANTOS, A. C.; RAVINES, R. R.; TASSINARI, W. S.; CARVALHO, M. S.; REIS, M. G.; KO, A.I. Impact of environment and social gradient on leptospira infection in urban slums. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 23, n. 4, p. 228, 2008.

REN, S. X.; FU, G.; JIANG, X. G.; ZENG, R.; MIAO, Y. G.; XU, H.; ZHANG, Y. X.; XIONG, H.; LU, G.; LU, L. F.; JIANG, H. Q.; JIA, J.; TU, Y. F.; JIANG, J. X.; GU, W. Y.; ZHANG, Y. Q.; CAI, Z.; SHENG, H. H.; YIN, H. F.; ZHANG, Y.; ZHU, G. F.; WAN, M.; HUANG, H. L.; QIAN, Z.; WANG, S. Y.; MA, W.; YAO, Z. J.; SHEN, Y.; QIANG, B. Q.; XIA, Q. C.; GUO, X. K.; DANCHIN, A.; SAINT GIRONS, I.; SOMERVILLE, R. L.; WEN, Y. M.; SHI, M. H.; CHEN, Z.; XU, J. G.; ZHAO, G. P. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. **Nature**, v. 422, n. 6934, p. 888-893, 2003.

RESENDE, F. C. B.; PASSOLD, J.; FERREIRA, S. I. A. C.; ZANETTI C. R.; LIMA, H. C. Vacine adjuvants: possibilities for use in humans or animals,. **Rev. Bras. Alerg. Immunopatol.**, v. 27, n. 3, p. 116-124, 2004.

RODRIGUES, R. O. **Imunogenicidade de bacterinas anti-leptospiras para bovinos produzidas no Brasil, 2006/7.** 2008. 145 f. (Doutorado em Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning a laboratory manual.** 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; MOSCA, T.; MASSIS, L. M.; ABRAHAMSOHN, I. A.; FERREIRA, L. C. Host and bacterial factors affecting induction of immune responses to flagellin expressed by attenuated *Salmonella* vaccine strains. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 5, p. 2546-2555, 2004.

SETUBAL, J. C.; REIS, M.; MATSUNAGA, J. HAAKE, D. A. Lipoprotein computational prediction in spirochaetal genomes. **Microbiology**, v. 152, p. 113-121, 2006.

SILVA, E. F.; MEDEIROS, M. A.; MCBRIDE, A. J. A.; MATSUNAGA, J.; ESTEVES, G. S.; RAMOS, J. G. R.; SANTOS, C. S.; CRODA, J.; HOMMA, A.; DELLAGOSTIN, O. A.; HAAKE, D. A.; MITERMAYER, G. R.; 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, p. 6277-6286, 2007.

SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS). Leptospirose. 2009. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br>>. Acesso em: 14 nov. 2009.

SMITH, K. D.; ANDERSEN-NISSEN, E.; HAYASHI, F.; STROBE, K.; BERGMAN, M. A.; BARRETT, S. L.; COOKSON, B. T.; ADEREM, A. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. **Nat. Immunol.**, v. 4, n. 12, p. 1247-1253, 2003.

SONRIER, C.; BRANGER, C.; MICHEL, V.; RUVOËN-CLOUET, N.; GANIÈRE, J. P.; ANDRÉ-FONTAINE, G. Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. **Vaccine**, v. 19, n. 1, p. 86-94, 2000.

SORENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *E. Coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 115, p. 113-128, 2005.

SOTO, F. R. M. **Imunidade ativa e passiva em suínos vacinados contra leptospirose. Emprego de vacina experimental de subunidade e duas bacterinas comerciais de bactérias completas.** 2006. 114 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental aplicado as zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

SRIKRAM, A.; WONGRATANACHEWIN, S.; PUAPAIROJ, A.; WUTHIEKANUN, V.; SERMSWAN, R. W. Analyses of vaccination protocols for *Leptospira interrogans* serovar autumnalis in hamsters. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, n. 5, p. 779-786, 2008.

STEINER, T. S. How flagellin and Toll-like receptor 5 contribute to enteric infection. **Infec. Immun.**, v. 75, n. 2, p. 545-552, 2007.

SUTCLIFFE, I. C.; HARRINGTON, D. J. Lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis*: an abundant and functionally diverse class of cell envelope components. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, p. 645-659, 2004.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu. Ver. Immunol.**, v. 21, p. 335-376, 2003.

VERNEL-PAULLAC, 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.

VIEIRA, M. L.; D'ATRI, L. P.; SCHATTNER, M.; HABARTA, A. M.; BARBOSA, A. S.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; ABREU, P. A. E.; GÓMEZ, R. M.; NASCIMENTO, A. L. A novel leptospiral protein increases ICAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 276, n. 2, p. 172-180, 2007.

VINETZ, J. M. Leptospirosis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 14, n. 5, p. 527-538, 2001.

WANG, Z.; JIN, L.; WEGRZYN, A. Leptospirosis vaccines. **Microb. Cell. Fact.**, v. 6, n. 39, 2007.

YAN, W.; FAISAL, S. M.; MCDONOUGH, S. P.; DIVERS, T. J.; BARR, S. C.; CHANG, C. F.; PAN, M. J.; CHANG, Y. F. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Leptospira* immunoglobulin-like protein B (rLigB) in a hamster challenge model. **Microbes Infect.**, v. 11, n. 2, p. 230-237, 2009.

YASUDA, P. H.; STEIGERWALT, A. G; SULZER, K. R.; KAUFMANN, A. F; ROGER, F; BRENNER, D. J. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and sorovars for seven new *Leptospira* species. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 37, p. 407-415, 1987.

ZEIGLER, J. A.; JONES, R. H.; KUBIC, K. Immunization against leptospirosis: vaccine trials with heat-killed whole cell and outer envelope antigens in hamsters. **Bull. Pan. Am. Health Org.**, v. 10, p. 126-130, 1976.