

PAMELA SIUMEY LIU

**Resposta imune induzida em camundongos por
imunização transcutânea com proteína recombinante
LipL32 de leptospira**

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

**São Paulo
2015**

PAMELA SIUMEY LIU

**Resposta imune induzida em camundongos por
imunização transcutânea com proteína recombinante
LipL32 de leptospira**

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Profa. Dra. Waldely de Oliveira
Dias

Versão original

**São Paulo
2015**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Liu, Pamela Siumey.

Resposta imune induzida em camundongos por imunização transcutânea com proteína recombinante LipL32 de leptospira / Pamela Siumey Liu. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Waldely de Oliveira Dias.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Imunobiotecnologia.

Versão do título para o inglês: Immune response induced in mice by transcutaneous immunization with recombinant protein LipL32 of leptospira.

1. Leptospira 2. Vacinas 3. LipL32 4. Surfactante pulmonar 5. Polietilenoglicol 6. Monofosforil lipídeo A I. Dias, Prof. Dr. Waldely de Oliveira II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0182/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Pamela Siumey Liu.

Título da Dissertação: Resposta imune induzida em camundongos por imunização transcutânea com proteína recombinante LipL32 de leptospira.

Orientador(a): Prof. Dr. Waldely de Oliveira Dias.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Resposta imune induzida em camundongos por imunização transcutânea com proteína recombinante de leptospira", protocolo nº 998/13, sob a responsabilidade de Waldely de Oliveira Dias e Pamela Siumey Liu – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 4/10/2013.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
04/2013 - 02/2015 Centro de Biotecnologia	145 camundongos Balb/c, 5-7 sem, 18-22g(F)

São Paulo, 16 de abril de 2013


Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

AGRADECIMENTOS

À Dra. Waldely de Oliveira Dias pela oportunidade, orientação e insights esclarecedores.

Às minhas amigas: Ana Fabíola, Eliane, Luciana, Luciene, Míriam e Priscila pela amizade, cumplicidade, apoio nos momentos difíceis e risadas nos momentos felizes.

Ao Dr. José Gregório Cabrera Gomes, do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), USP, pelo fornecimento dos biossurfactantes.

À Dra. Ana Lúcia Nascimento e à Dra. Mônica Vieira pela disponibilização do laboratório e ensinamento da técnica para obtenção da proteína recombinante LipL32.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia: André, Marisa, Sueli, Fátima, Vera e Toninho.

Aos pesquisadores doutores: Dúnia Rodriguez, Ivan Nascimento, Luciana Leite pelo apoio técnico na citometria de fluxo e disponibilização do laboratório de Biologia Molecular II.

Aos funcionários da Fermentação: Lorivaldo, Hélio, Máximo e Ana pelo seu trabalho técnico de apoio aos alunos.

Aos funcionários do Biotério: Marisa e Rosa pelo cuidado com os camundongos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de Mestrado, bem como à Fundação Butantan, pelo financiamento desta pesquisa.

Um agradecimento especial aos meus familiares e namorado pelo conforto, apoio, compreensão e estímulo: meu pai Roberto e mãe Paula, meus irmãos Hendrik e Kevin, e meu namorado Ka Yen.

Muito obrigada!

RESUMO

LIU, P. S. **Resposta imune induzida em camundongos por imunização transcutânea com proteína recombinante LipL32 de leptospira.** 2015. 100 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A imunização transcutânea oferece uma via atrativa para o desenvolvimento de vacinação livre de agulhas. Atuando nas células apresentadoras de antígenos da pele, células de Langerhans e células dendríticas da derme, tem potencial para substituir algumas das imunizações convencionais pela via intramuscular e subcutânea, em termos de facilidade, segurança e eficácia. O presente estudo focalizou diferentes estratégias na indução, por via transcutânea, de resposta imune à LipL32, uma proteína altamente conservada entre cepas patogênicas de *Leptospira*, considerada potencialmente relevante como candidata vacinal. A imunização pela via Tc em *Leptospira*, é interessante no sentido de priorizar as vias de acesso do antígeno selvagem ao hospedeiro. Neste trabalho a imunização Tc com proteína recombinante LipL32 de *Leptospira* na região abdominal de camundongos C57BL-6, foi capaz de primar o sistema imune contra a proteína, suscitando resposta sistêmica com altos níveis de anticorpos contra o antígeno, após reforços subimunizantes, intradérmico e transcutâneo. O padrão de citocinas em cultivo de células do sangue periférico dos animais imunizados indicou que o esquema de imunização por via Tc foi capaz de primar o sistema imune, conferindo resposta mediada por células, tanto no sistema inato quanto adaptativo. O tratamento do local de aplicação do antígeno com surfactantes, PEG ou MPL-A não evidenciou sua ação emoliente, uma vez que os grupos imunizados apenas com a LipL32 apresentaram níveis de anticorpos semelhantes. Também não foi evidenciada ação adjuvante dos surfactantes ou PEG, que em alguns casos levaram a aparente diminuição da resposta imune. A coadministração Tc da LipL32 com MPL-A levou a efeito moderador da reação pró-inflamatória, redirecionando a resposta adaptativa, tanto humoral quanto celular. Pudemos demonstrar que a via Tc de imunização foi efetiva na entrada do antígeno e indução de resposta imune humoral, celular e inata, podendo ser considerada na imunização contra a bactéria.

Palavras-chave: *Leptospira*. Vacinas. LipL32. Surfactante pulmonar. Polietilenoglicol. Monofosforil lipídeo A

ABSTRACT

LIU, P. S. Immune response induced in mice by transcutaneous immunization with recombinant protein LipL32 of leptospira. 2015. 100 p. [Masters thesis (Biotechnology)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Transcutaneous immunization (Tc) offers an attractive pathway for the development of needle-free vaccination protocols. Acting on antigen presenting cells of the skin, Langerhans cells and dendritic cells of the dermis, these vaccination methods have some potential to eventually replace conventional immunization by intramuscular and subcutaneous route, in terms of safety and efficacy. This study focused on different strategies to induce an effective immune response to LipL32 by Tc immunization. LipL32 is a highly conserved protein among pathogenic strains of *Leptospira*, considered potentially relevant as a vaccine candidate. The Tc immunization with *Leptospira* antigens is interesting, by keeping the same input of the wild antigen. In this work Tc immunization with recombinant LipL32 of *Leptospira* was evaluated in C57BL-6 mice abdominal region, and was able to confer systemic response with high levels of antibodies to the antigen after subimmunizing intradermal and transcutaneous boosters. The pattern of cytokines in cell cultures from peripheral blood of immunized animals indicated that the immunization scheme was able to efficiently prime the murine immune system for subsequent boosting immunizations, conferring cell-mediated response, as both the innate and adaptive system. Local treatment of the skin with surfactants, PEG or MPL-A did not show an emollient action, since the groups immunized with LipL32 showed similar antibodies levels. It was also not observed adjuvant action of surfactants or PEG, which in some cases lead to apparent reduction in the immune response. Co-administration of LipL32 with MPL-A, influenced the magnitude of the antibody response as well as showed a moderating effect of the pro-inflammatory reaction, redirecting the adaptive response, both humoral and cellular. The present study indicates that the Tc immunization with LipL32 was able to safely prime the immune system to induce humoral, cellular and innate immune response in mice and can be considered in the immunization schedules against the bacteria.

Keywords: *Leptospira*. Vaccines. LipL32. Pulmonary surfactant. Polyethylene glycol. Monophosphoryl lipid A

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da pele	13
Figura 2 - Estrutura da epiderme.....	14
Figura 3 - Representação esquemática das vias de penetração, mostrando as diferenças entre as principais vias.	15
Figura 4 - Sistema imune da pele.....	16
Figura 5 - Micrografias eletrônicas de leptospiros	24
Figura 6 - Representação esquemática da arquitetura da <i>Leptospira</i>	25
Figura 7 - Exp I: Protocolo de imunização e sangria	42
Figura 8 - Exp II: Protocolo de imunização e sangria	43
Figura 9 - Exp III: Protocolo de imunização e sangria	44
Figura 10 - Exp IV: Protocolo de imunização e sangria.....	45
Figura 11 - Exp V: Protocolo de imunização, sangria e resposta imune celular.....	46
Figura 12 - Exp VI: Protocolo de imunização, sangria e resposta imune celular e resposta inata.....	48
Figura 13 - Gel de SDS-PAGE das frações de purificação da proteína LipL32.....	58
Figura 14 - Avaliação de IgG anti-LipL32 em camundongos Balb/c imunizados por via subcutânea com LipL32 (10 µg/ 200 µl).....	59
Figura 15 - Exp I: Avaliação de IgG anti-LipL32 em camundongos Balb/c imunizados por via Tc com LipL32.	60
Figura 16 - Exp II: Avaliação de IgG anti-LipL32 em camundongos Balb/c após a terceira, quarta e quinta doses Tc de LipL32, com uso de surfactantes coadministrados com o antígeno.....	61
Figura 17 - Exp III: Avaliação de IgG anti-LipL32 em camundongos após a segunda e terceira doses Tc de LipL32, com uso de Surf But (1% e 2%) ou PEG (0,5% e 1%) como pré-tratamento	62
Figura 18 - Exp IV: Avaliação de IgG anti-LipL32 em camundongos Balb/c imunizados com LipL32 coadministrada com emolientes/adjuvantes. Resposta de memória induzida por doses de reforço subimunizantes de LipL32 por via ID e Tc, após 3 doses por via Tc.	64
Figura 19 - Exp IV: Avaliação de IgG anti-LipL32 em camundongos Balb/c imunizados com LipL32 após pré-tratamento com emolientes/adjuvantes. Resposta	

de memória induzida por doses de reforço subimunizantes de LipL32 por via ID e Tc, após 3 doses por via Tc.	65
Figura 20 - Exp IV: Avaliação de IgG anti-LipL32 em camundongos Balb/c imunizados com LipL32 e surfactantes, como pré-tratamento local (LipL32/Surf But; LipL32/Surf USP; LipL32/Surf Com) ou coadministrados (LipL32+Surf But; LipL32+Surf USP; LipL32+Surf Com).	66
Figura 21 - Exp V: Avaliação de IgG anti-LipL32 em camundongos Balb/c: resposta de memória induzida por doses de reforço subimunizantes de LipL32 por via ID e Tc, após 3 doses por via Tc.	68
Figura 22 – Exp V: Avaliação de IgA anti-LipL32 nas fezes de camundongos Balb/c imunizados com LipL32, 29 dias após dose de reforço Tc de 1 µg.	69
Figura 23 - Exp VI A: Avaliação de IgG anti-LipL32 em camundongos C57BL-6, utilizando LipL32 coadministrada com Surf But 1% e MPL-A (20 µg/dose): efeito de reforço induzido por dose subimunizante de LipL32	72
Figura 24 - Exp VI B: Avaliação de IgG anti-LipL32 em camundongos C57BL-6, utilizando LipL32 coadministrada com Surf But 1% e MPL-A (20 µg/dose): efeito de reforço induzido por doses subimunizantes de LipL32.....	73
Figura 25 - Exp VI: Avaliação de citocinas Th1/ Th2 em sobrenadantes de cultura de células do sangue total de camundongos C57BL-6	76
Figura 26 - Exp VI: Avaliação de citocinas pró e anti-inflamatórias em sobrenadantes de cultura de células do sangue total de camundongos C57BL-6	80
Figura 27 - Exp VI: Avaliação de citocinas pró e anti-inflamatórias em sobrenadantes de cultura de células do sangue total de camundongos C57BL-6 com LipL32 (1 µg/dose) por via ID (Controle ID).....	81

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Imunização transcutânea	12
1.2 Extratos da pele	12
1.3 Resposta imune da pele	16
1.4 A pele e a TCI	17
1.4.1 <i>Métodos físicos</i>	17
1.4.2 <i>Emolientes e Adjuvantes</i>	18
1.4.2.1 <i>Emolientes</i>	18
1.4.2.2 <i>Adjuvantes</i>	21
1.5 Estudos clínicos com imunização transcutânea	22
1.6 Leptospirose	24
1.7 Transmissão da doença, sinais e sintomas	25
1.8 Diagnóstico da leptospirose	26
1.9 Epidemiologia	27
1.10 Mecanismos de patogenicidade e fatores de virulência	27
1.11 Vacinas contra leptospirose	31
1.12 LipL32	33
1.13 Resposta imune do hospedeiro contra a leptospirose	34
2 JUSTIFICATIVA	36
3 OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo geral	37
3.2 Objetivos específicos	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 Produção e purificação de proteína recombinante LipL32 de leptospira	38
4.1.1 <i>Transformação de bactérias E. coli</i>	38
4.1.2 <i>Indução da expressão de LipL32</i>	38
4.1.3 <i>Purificação da proteína recombinante LipL32 de leptospira</i>	39
4.1.4 <i>Diálise e dosagem da proteína LipL32 purificada</i>	39
4.2 Antígeno e adjuvantes/emolientes	39
4.3 Preparação dos animais, protocolos e vias de imunização	40
4.4 Avaliação da resposta humoral ao antígeno, por via subcutânea	41

4.5	Protocolos de imunização e sangria	41
4.6	Avaliação de resposta imune humoral e secretória	49
4.6.1	<i>Ensaio imunoenzimático – ELISA</i>	49
4.7	Avaliação da resposta imune celular em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) dos animais imunizados e controles	50
4.8	Avaliação da resposta imune celular em amostras de sangue total de camundongos imunizados e controles	51
4.8.1	<i>Ensaio de citometria de fluxo</i>	51
4.9	Avaliação da imunidade celular em cultivo de esplenócitos de camundongos imunizados e controles	52
4.10	Avaliação da resposta inata em células de sangue total de camundongos C57BL-6 imunizados com LipL32 por via transcutânea	53
4.11	Análise estatística dos resultados	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1	Produção de LipL32 recombinante	57
5.2	Avaliação da resposta humoral à proteína recombinante LipL32, em camundongos imunizados por via subcutânea	58
5.3	Resposta imune humoral induzida em camundongos após imunização transcutânea com LipL32	59
5.4	Avaliação da resposta imune celular	74
5.5	Avaliação da resposta imune inata	78
6	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	83
	REFERÊNCIAS	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 Imunização transcutânea

O desenvolvimento de vacinas mais seguras e eficazes é uma prioridade global. A imunização transcutânea (*Transcutaneous immunization* - TCI), através da pele, é uma tecnologia em desenvolvimento para a administração de vacinas de forma indolor, em área de superfície maior do que a utilizada por uma agulha (GLENN et al., 1998). É uma alternativa à administração vacinal tópica, apresentando algumas vantagens em relação a ela: é menos invasiva, elimina-se o risco de disseminação de doenças infecciosas transmitidas pelo contato de fluidos corporais contaminados com agulhas (hepatite B e AIDS, por exemplo), proporciona maior facilidade na administração (por meio de *patches* ou cremes) e não necessita de pessoal treinado para sua aplicação (LI et al., 2011; PRAUSNITZ et al., 2008). Além disso, com a TCI não há contato direto do antígeno com o sistema circulatório, a distribuição do composto vacinal ocorre rapidamente e há o favorecimento da indução de resposta de IgG e secreção de IgA, tanto em camundongos quanto em humanos, uma vez que as células de Langerhans (*Langerhans Cells* - LCs) da epiderme e as células dendríticas da derme (*dermal Dendritic Cells* – dDCs), importantes células apresentadoras de antígenos (*Antigen Presenting Cells* - APCs), são facilmente alcançadas neste tipo de imunização (BELYAKOV et al., 2004; LI et al., 2011).

1.2 Extratos da pele

A pele é responsável por 15% do peso total de um adulto e possui uma área de superfície de aproximadamente 2 m² (LAI-CHEONG; McGRATH, 2009). Uma das principais funções da pele é agir como barreira de defesa contra ameaças do ambiente externo. Para isso, a pele possui mecanismos de defesa, físicos e imunológicos, para inibir ataques de microrganismos, reagentes tóxicos, radiação UV, entre outros (ROBERTS; WALTERS, 2008). Além disso, a pele pode ser usada como porta de entrada para substâncias terapêuticas, como drogas e vacinas (MONTEIRO-RIVIERE, 2010).

A pele é um órgão composto por duas principais camadas: a epiderme e a derme, além da hipoderme (Figura 1) (LAI-CHEONG; McGRATH, 2009).

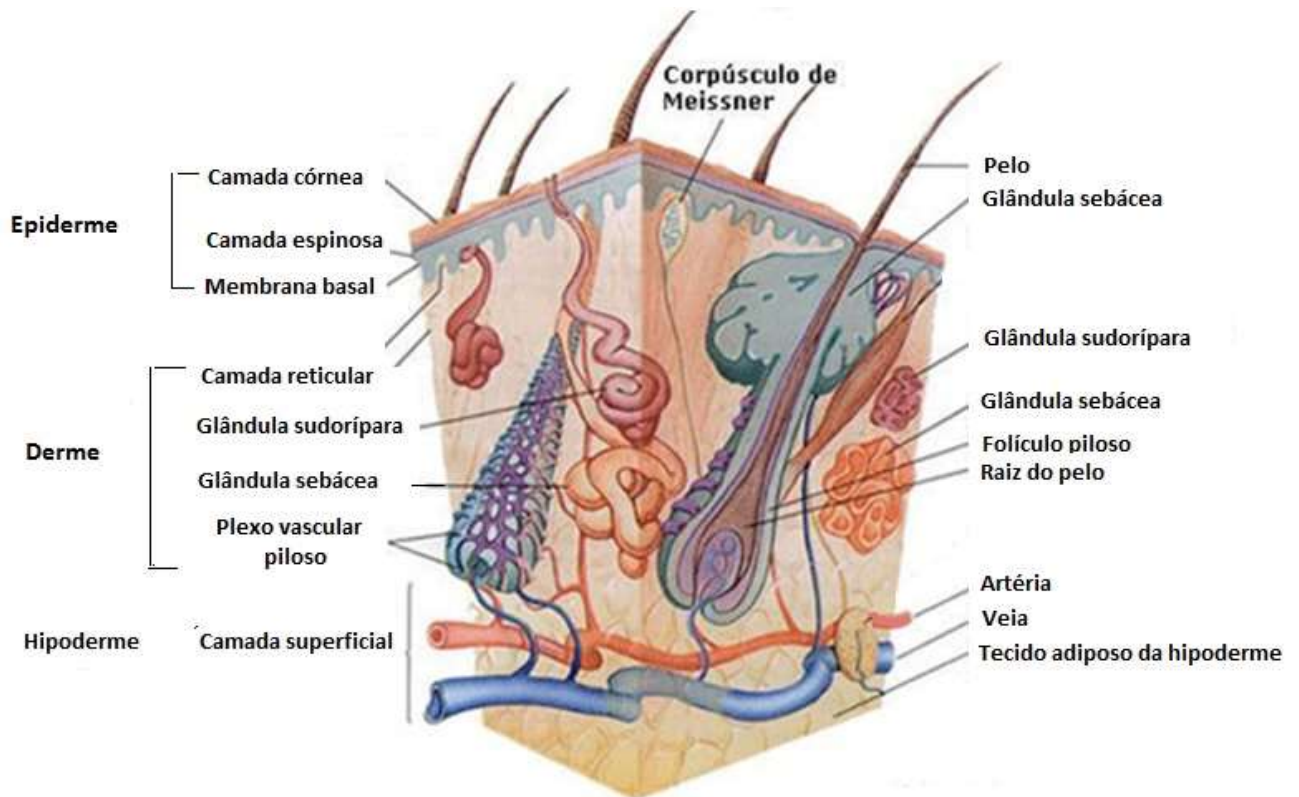


Figura 1 - Estrutura da pele. A pele é composta por duas principais camadas: epiderme e derme. A hipoderme é a camada mais inferior, subjacente à derme. A função de barreira da pele é localizada na camada mais superficial, o estrato córneo.

Fonte: <http://lct.nutes.ufrj.br/toxicologia/ml.pele.htm>

A hipoderme, camada subjacente à derme, contém uma variedade de tipos celulares, nervos, vasos sanguíneos e vasos linfáticos, incorporados em uma rede densa de tecido conjuntivo (MONTEIRO-RIVIERE, 2010).

A derme, camada localizada abaixo da epiderme, é muito mais espessa (1-4 mm). Os principais componentes da derme são o colágeno e as fibras elásticas (IGARASHI; NISHIRO; NAYAR, 2007).

A epiderme, camada situada acima da derme, é composta principalmente por camadas de queratinócitos estratificados, constituindo cerca de 95% das células dessa camada (CANDI; SCHMIDT; MELINO, 2005; MONTEIRO-RIVIERE, 2010). Os queratinócitos passam por um processo de queratinização, em que a célula diferencia-se e locomove-se da camada basal, passa pelo estrato espinhoso e granuloso, chegando à camada mais externa da epiderme, o estrato córneo (EC)

(Figura 2), onde se tornam anucleados e achatados, formando a barreira física do estrato córneo, denominando-se corneócitos. Na epiderme viável, juntamente com os queratinócitos, há outras células com diversas funções, tais como a produção de melanina (melanócitos), percepção sensorial (células de Merkel) e função imunológica (células de Langerhans e outras células). Há também unidades pilossebáceas (folículos pilosos e glândulas sebáceas associadas) e glândulas apócrinas e sudoríparas (Figura 1) (BOUWSTRA; HONEYWELL-NGUYEN, 2002).

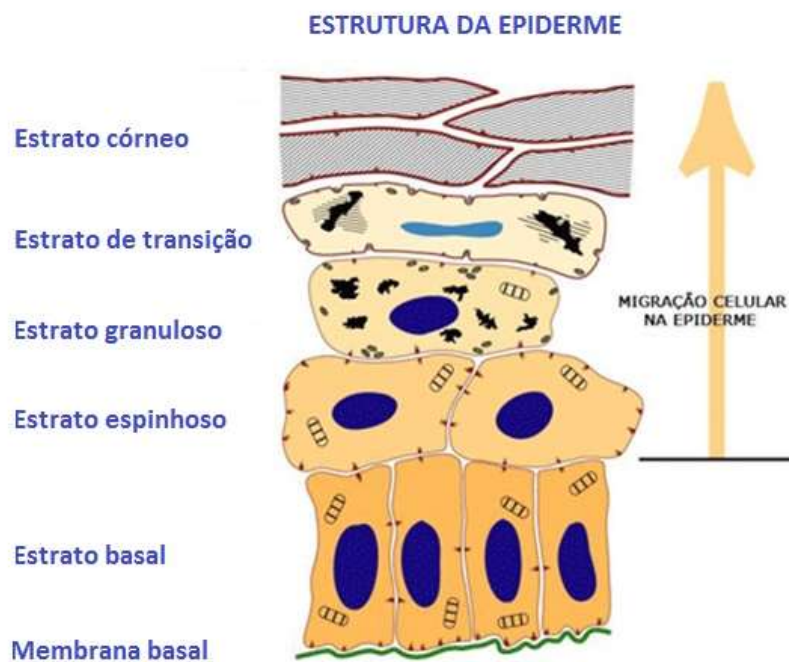


Figura 2 - Estrutura da epiderme. A epiderme é composta por cinco estratos, sendo o estrato basal o mais profundo, seguido dos estratos espinhoso, granuloso e de transição, até a camada mais externa da epiderme, o estrato córneo.

Fonte: <http://lct.nutes.ufrj.br/toxicologia/ml.pele.htm>

O estrato córneo, a camada mais externa da epiderme, mesmo apresentando apenas 10-20 μm de espessura, representa a principal barreira física da pele. Essa camada é uma etapa limitante para a penetração de substâncias através da pele (PRAUSNITZ; MITRAGOTRI; LANGER, 2004; ROBERTS; CROSS; PELLETT, 2002), embora seja também a principal barreira para difusão da água para fora da pele (ELIAS; FRIEND, 1975). Geralmente as moléculas penetram através do estrato córneo por difusão passiva e pelas vias intercelular, transcelular e folicular (Figura 3) (BOLZINGER et al., 2012; TREGGAR, 1966).

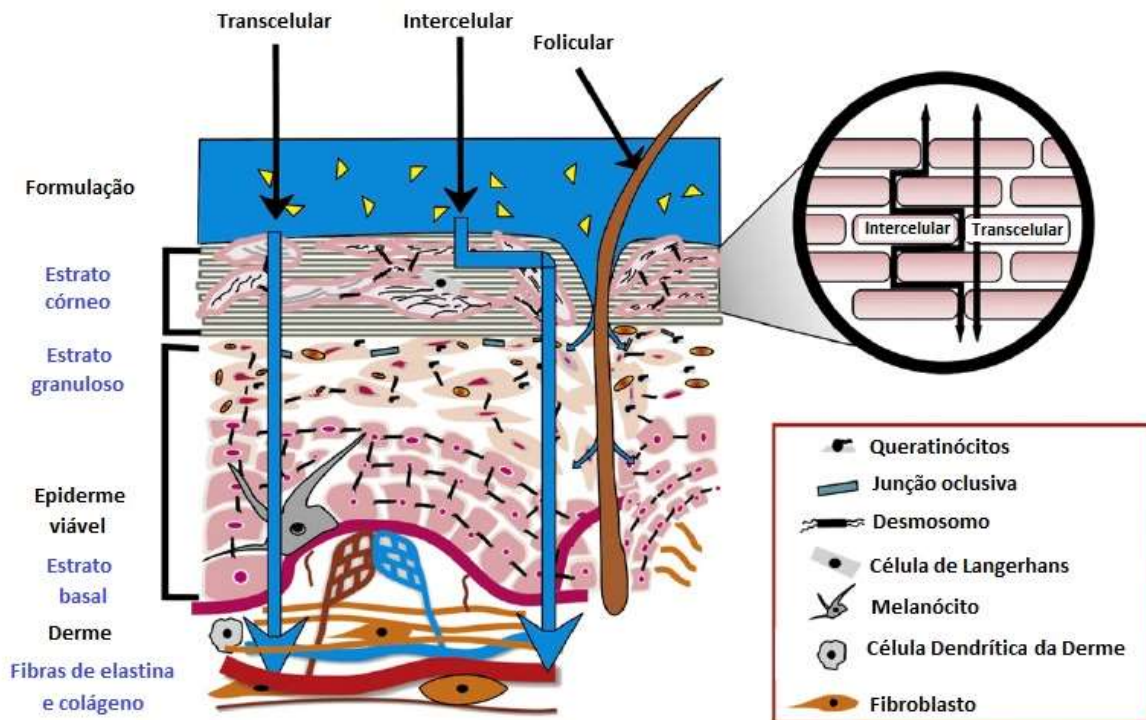


Figura 3 - Representação esquemática das vias de penetração, mostrando as diferenças entre as principais vias. As vias transcelular e intercelular estão representadas no canto superior direito.
Fonte: ALEXANDER et al., 2012

O maior obstáculo da TCI é a passagem de grandes moléculas hidrofóbicas e da grande maioria das moléculas hidrofílicas, incluindo proteínas e peptídeos, pela epiderme. Isso se deve às diversas camadas de queratinócitos mortos incorporadas na bicamada lipídica, o que resulta em uma barreira fortemente hidrofóbica que impede a passagem dessas moléculas (ELIAS, 1983; KALIA; MERINO; GUY, 1998). O rompimento das barreiras da pele, com uso de agentes químicos, tratamentos físicos ou estratégias mecânicas, facilita a penetração e conseqüentemente, a apresentação de antígenos na sua forma íntegra (CHEN et al., 2012; LI et al., 2011).

1.3 Resposta imune da pele

A pele, como um órgão pró-inflamatório, tem funções imunológicas importantes (MATHERS; LARREGINA, 2006; SEN et al., 2010; SUGITA et al., 2007). A epiderme e a derme possuem alta quantidade de células dendríticas que são APCs potentes, com atividades imunoestimulatórias e migratórias importantes (Figura 4). As células de Langerhans na epiderme e as células dendríticas da derme são importantes para a indução de respostas imunes específicas no sistema TCI. Assim, se o antígeno for eficientemente entregue às LCs ou dDCs residentes das camadas epidérmica ou dérmica, a TCI é capaz de induzir resposta imune eficaz (BARRY, 2004; BOS; MEINARDI, 2000). Após ativação, ocorre a maturação das DCs, o processamento do antígeno vacinal e a migração das DCs para os órgãos linfoides, onde apresentam os epítopos via MHC I e II para linfócitos T $CD8^+$ (citotóxico) e T $CD4^+$ (auxiliar), respectivamente (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998).

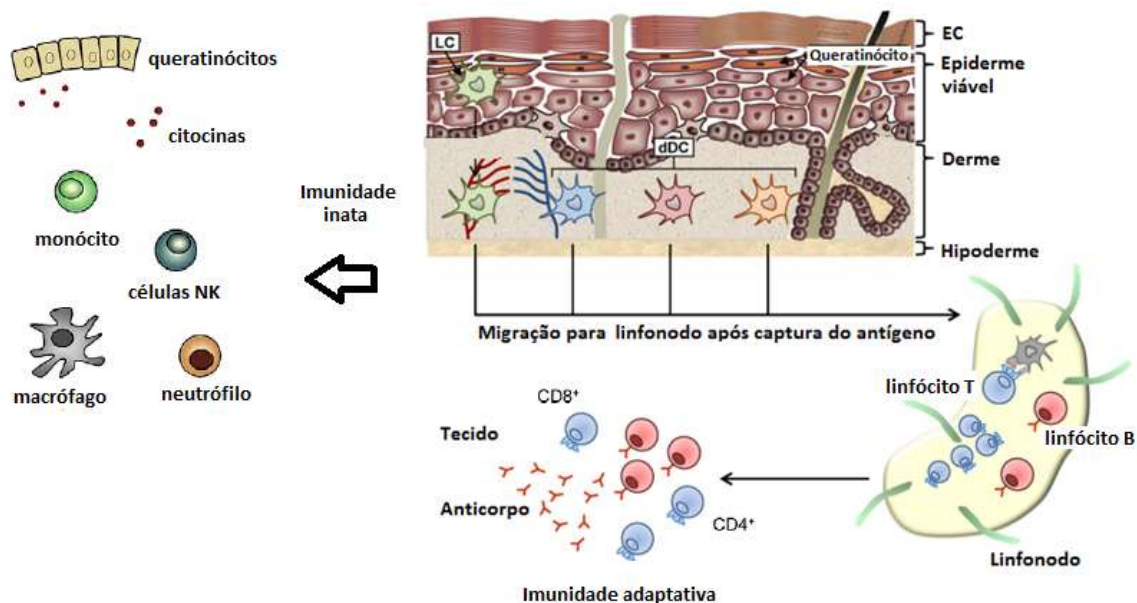


Figura 4 - Sistema imune da pele. A pele possui várias células imunocompetentes, tais como Células de Langerhans (LCs), queratinócitos, e várias células dendríticas da derme (dDCs). Os queratinócitos estão envolvidos principalmente na indução da imunidade inata. LCs e dDCs capturam o antígeno externo, migram para os linfonodos, apresentam o antígeno para os linfócitos T e ativam linfócitos T e B antígeno específicos. Os linfócitos T e B ativados migram para os tecidos e induzem respostas imunes antígeno específicas.

Fonte: MATSUO et al., 2013

Os queratinócitos também estão envolvidos na indução de resposta imune antígeno específica, ao ativar o sistema imune inato (SUGITA et al., 2007; WU et al., 2008). Eles expressam numerosos receptores *toll-like* na sua superfície ou em endossomos (KAWAI, 2003), que permitem o reconhecimento de componentes bacterianos, os padrões moleculares associados a patógeno (*Pathogen-associated molecular pattern* - PAMPs). Ao reconhecer um antígeno exógeno, os queratinócitos produzem citocinas e quimiocinas, tais como TNF- α e IL-1 β , que sinalizam para as LCs ou dDCs a necessidade de migração para o linfonodo (SAALBACH et al., 2010). Como os queratinócitos, as LCs e dDCs também expressam esses receptores que contribuem para a manutenção de um microambiente inflamatório, que após contato primário com um componente de vacina, induz a resposta imune inata, produzindo uma grande variedade de moléculas pró-inflamatórias que contribuem na ativação de APCs residentes da pele, estimulando a resposta imune adaptativa. Quando a vacina é administrada na pele, as respostas imunes antígeno específicas são induzidas por estes mecanismos, fazendo com que a imunização transcutânea seja uma via atraente para entrega de antígenos (FLACHER et al., 2006; RENN et al., 2006).

1.4 A pele e a TCI

A administração tópica de vacinas na pele é limitada pela baixa permeabilidade do estrato córneo, a camada mais externa da pele (BOUWSTRA et al., 2001). Várias abordagens farmacêuticas e dispositivos têm sido desenvolvidos para tornar a imunização transcutânea eficaz e viável ao superar a barreira de penetração do estrato córneo da pele (MITRAGOTRI, 2005).

1.4.1 Métodos físicos

O rompimento da barreira da pele aumenta a permeação transcutânea do antígeno e torna-o mais prontamente disponível para apresentação às APCs. Além disso, leva à ativação do sistema imune, induzindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias pelos queratinócitos e ativando as DCs (CUMBERBATCH; DEARMAN; KIMBER, 1997; WOOD et al., 1992), o que torna importante o desenvolvimento de

métodos físicos capazes de ultrapassar a barreira da pele (BAL et al., 2010). São alguns exemplos desses sistemas: *patch*, sonoforese, eletroporação, *Jet injector* e microagulhas.

O *patch* baseia-se na concentração de antígenos vacinais na superfície do adesivo, dependendo da oclusão parcial da pele, que mantém a sua hidratação. A hidratação constante resulta no aumento da permeabilidade ao antígeno devido ao inchaço dos corneócitos, do extravasamento de fluidos no espaço intercelular e de alterações microscópicas na estrutura do estrato córneo (BOUWSTRA et al., 2003).

A sonoforese utiliza ultrassom de baixa frequência à penetração de substâncias através do estrato córneo (POLAT; BLANKSCHTEIN; LANGER, 2010; TEZEL et al., 2005).

A eletroporação aumenta transientemente a permeabilidade da bicamada lipídica e do estrato córneo por aplicação de um único ou múltiplos pulsos elétricos, controlados, de curta duração (CHIARELLA; FAZIO; SIGNORI, 2010; LADDY et al., 2009; PRAUSNITZ et al, 1993).

O *Jet injector*, baseia-se em um método mecânico para transportar partículas recobertas por moléculas de pDNA através do estrato córneo da epiderme, utilizando gás comprimido, resultando na transfecção direta dos queratinócitos e de LCs, distribuídos amplamente na epiderme (BARRY; JOHNSTON, 1997; LIN et al., 2010; SANFORD et al., 1987; UCHIDA et al., 2009).

As microagulhas são agulhas quase imperceptíveis, menores de 1 mm, necessitando ultrapassar apenas 15 a 20 mm da espessura do estrato córneo antes de atingir a epiderme viável para entregar o antígeno vacinal (HAUT, 2002; REIHSNER; BALOGH; MENZEL, 1995).

1.4.2 Emolientes e Adjuvantes

1.4.2.1 Emolientes

Vários produtos químicos são conhecidos por interagir com a pele e modificar a estrutura altamente ordenada da bicamada lipídica do estrato córneo, principal barreira à difusão das moléculas exógenas. Mais de 300 produtos químicos, chamados emolientes ou potenciadores de permeação, têm sido estudados por sua

capacidade de facilitar o transporte de moléculas através da pele (KARANDE; MITRAGOTRI, 2009). Os emolientes são relativamente baratos, oferecem flexibilidade no seu *design*, não necessitam de pessoal altamente treinado para a manipulação, e o mais importante, podem ser formulados com o agente terapêutico na forma de creme tópico ou gel, ou incorporados no *patch*, um adesivo que pode ser aplicado em qualquer parte do corpo para liberação prolongada do antígeno (KARANDE; MITRAGOTRI, 2009).

Os potenciadores de permeação são incorporados nas formulações para melhorar o grau de difusão e solubilidade do antígeno (SHIN et al., 2005). Em geral, podem abranger ampla variedade de grupos químicos funcionais e podem apresentar diferentes mecanismos de ação no melhoramento do transporte de moléculas (KARANDE; MITRAGOTRI, 2009).

Os emolientes podem exercer seu efeito diretamente sobre a estrutura da pele, agindo sobre os lipídeos intercelulares da pele ou dos corneócitos, as células mortas do estrato córneo. A sua ação sobre os lipídios intercelulares da pele deve-se à sua extração, originando vias de difusão para a passagem do antígeno, ou podem dividir-se nas bicamadas lipídicas, destruindo assim as lamelas de lipídeo altamente ordenadas, causando a sua fluidificação (BARRY, 2004; KARANDE et al., 2005; KIM et al., 2008).

Nesse sentido, vem sendo avaliados o polietilenoglicol (PEG) e os surfactantes, capazes de modificar a estrutura do estrato córneo da epiderme, favorecendo a penetração de um antígeno através da derme (KAUSHIK et al., 2008).

Polietilenoglicol (PEG)

O PEG apresenta uma diversidade de pesos moleculares e formas. À temperatura ambiente, o polímero com peso molecular até 400 é solúvel em água e higroscópico, e apresenta-se como líquido viscoso incolor; com peso molecular acima de 400, com aspecto de uma cera, um sólido branco (FRUIJTIER-PÖLLOTH, 2005). Consta na lista GRAS (*Compounds Generally Recognized as Safe* - Compostos Geralmente Reconhecidos como Seguros) do FDA, ou seja, apresenta baixa toxicidade, tendo sido aprovado pelo FDA para o consumo (HARRIS, 1992; HEROLD; KEIL; BRUNS, 1989). O PEG apresenta baixa imunogenicidade, o que permitiu o desenvolvimento de drogas a partir de conjugados PEG-proteína

(BHADRA et al., 2002; FRANCIS et al., 1998; VERONESE et al., 2002), é biodegradável, estável, não volátil, não sofre hidrólise nem deteriora durante o armazenamento na ausência de oxigênio (CHEN et al., 2005; FRUIJTIER-PÖLLOTH, 2005).

A magnitude do efeito potencializador da permeabilidade de outras moléculas associadas ao PEG através da pele depende principalmente da sua estrutura e de seu peso molecular. PEGs de peso molecular pequeno são minimamente absorvidos, já os de peso molecular igual ou maior a 4000, não são absorvidos (BARANY; LINDBERG; LODÉN, 2000; PRINCIPE, 1968; SMYTH et al., 1942).

Surfactantes

Os surfactantes são classificados em quatro tipos: aniônicos, catiônicos, não iônicos e anfóteros, que apresentam, respectivamente, cargas negativas, positivas, sem carga e carga positiva ou negativa, dependendo da solução em que se encontram (KIRSNER; FROELICH, 1998).

O surfactante pulmonar é composto por fosfolipídeos que são essenciais para reduzir a tensão superficial na interface ar-líquido do pulmão. Cerca de 10% do surfactante é constituído por proteína, sendo que foram definidas quatro até o momento: SP-A, SP-B, SP-C e SP-D. SP-B e SP-C são proteínas extremamente hidrofóbicas e pequenas (NOGEE, 2004).

Os surfactantes interagem com os lipídios presentes no estrato córneo, resultando na desorganização da sua estrutura e aumento dos espaços intracelulares, auxiliando na imunização transcutânea de antígenos vacinais. Além disso, também promovem o aumento da perda de água pela via transepidérmica e possuem ação irritante (FARTASCH, 1997; HUANG et al., 2006).

Experimentos de Huang et al. (2006) demonstraram que pré-tratamento por 10 minutos com surfactante aniônico, anteriormente à imunização com antígeno HEL (lisozima de ovo de galinha) em camundongos, foi eficiente em aumentar a resposta IgG específica contra HEL em 1,6 a 4,8 vezes, em comparação com o grupo imunizado sem o pré-tratamento. Houve também a elevação da expressão de CD86+, indicando a indução da maturação de células de Langerhans, mas não a sua migração da epiderme.

Experimentos de Karande et al. (2009) demonstraram que o uso de PEG em combinação com outras substâncias induziu maior resposta imune contra o antígeno OVA (ovalbumina), ao facilitar sua permeabilidade através da derme e elevar a capacidade adjuvante do agente químico, em testes *in vitro* com derme de suínos. Além disso, em testes *in vivo* com camundongos Balb/c, foi observado que os soros dos grupos pré-tratados com PEG por 10 minutos apresentaram títulos de IgG anti-OVA 1,5 a 2,5 vezes maiores do que o grupo controle (PBS).

O PEG e os surfactantes são utilizados usualmente como emolientes (FARTASCH, 1997; HUANG et al., 2006; KAUSHIK et al., 2008), enquanto o MPL-A apresenta função adjuvante bem estabelecida (BEUTLER; RIETSCHHEL, 2003; THOELLEN et al., 1998).

1.4.2.2 Adjuvantes

Adjuvantes têm como principais mecanismos de ação: (i) promover a liberação gradual do antígeno, (ii) direcionar o antígeno para as APCs e (iii) modular, potencializar e prolongar a duração da resposta imune induzida pelo antígeno (SINGH; O'HAGAN, 2003). O adjuvante ideal deve ser seguro, estável, promover resposta imune mais rápida, preferencialmente com menor dose de vacina, possuir toxicidade mínima, ter baixo custo e facilitar a administração da vacina por diferentes vias (AZAD; ROJANASAKUL, 2006; LAVELLE, 2005).

O monofosforil lipídeo A (MPL-A), derivado do lipopolissacarídeo da parede celular de bactérias gram-negativas, como *Salmonella minnesota* e *Bordetella pertussis*, vem sendo avaliado como adjuvante nas formulações vacinais, devido à sua baixa toxicidade, segurança e função imunomodulatória, tanto para resposta imune celular como humoral (BEUTLER; RIETSCHHEL, 2003; THOELLEN et al., 1998).

Chopra e Cevc (2014) verificaram em camundongos que a coadministração pela via transcutânea do MPL-A com o toxóide tetânico elevou a resposta imune, em média quatro vezes, quando comparado com o grupo imunizado com a formulação sem o adjuvante. Além disso, nos animais imunizados com vesículas deformáveis contendo 80 µg de toxóide tetânico e MPL-A, pela via transcutânea, foi conferida

proteção contra toxina tetânica por pelo menos seis meses. Em contraste, camundongos imunizados com o toxóide em vesículas deformáveis, mas sem MPL-A, permaneceram paralisados por 96 horas após desafio com LD₅₀ da toxina tetânica. Os camundongos recuperaram-se cinco dias depois.

1.5 Estudos clínicos com imunização transcutânea

Vários grupos de pesquisas têm realizado, nos últimos anos, estudos clínicos com TCI utilizando formulações com *patches* ou sistemas de microagulhas, devido à sua facilidade de utilização e eficácia (ETCHART et al., 2007; GLENN et al., 2000, 2007; HIROBE et al., 2012; VAN DAMME et al., 2009).

Glenn et al. (2000) relataram pela primeira vez os resultados da TCI em seres humanos, onde utilizaram *patches* contendo a toxina termolábil (LT) de *E.coli* e observaram resposta robusta de anticorpos anti-LT específicos. Além disso, utilizaram *patches* com LT como vacinação contra a diarreia do viajante em estudo clínico de fase II e observaram efeito protetor de 75% para a forma moderada e 84%, para a forma severa da doença (FRECH et al., 2008). Pacientes que ficaram doentes apresentaram episódios mais curtos de diarreia (0,5 dia contra 2,1 dias) do que o grupo placebo (GLENN et al., 2000, 2007). Esse estudo entrou recentemente na fase III de desenvolvimento (BAL et al., 2010) e essa poderá ser a primeira vacina entregue por *patch* no mercado.

Yagi et al. (2006) utilizaram *patches* contendo antígenos de HIV em pacientes com melanoma avançado e observaram resposta de linfócitos T CD8+ citotóxicos e regressão de algumas lesões em 4 dos 7 pacientes, o que confirmou a utilização de DCs da pele como abordagem viável para imunoterapia contra o câncer.

Etchart et al. (2007) realizaram um estudo clínico de fase I/II utilizando TCI com vacina viva atenuada de sarampo ROUVAX® em adultos voluntários. Foi verificado que a vacina é segura e pouco reatogênica. Foi observado indução de anticorpos salivares IgA específicos contra sarampo e uma tendência de aumento na produção de IFN- γ pelos linfócitos T.

Van Damme et al. (2009) realizaram um estudo clínico utilizando TCI com microagulhas ocas (MicronJet) para vacinação contra influenza e observaram aumento da resposta imune dos pacientes após a imunização. Reações adversas

locais foram significativamente mais frequentes do que aquelas com vacinação pela via intramuscular, mas foram leves e transitórias.

Hirobe et al. (2012) realizaram um estudo clínico com *patch* hidrogel contendo TT (toxóide tetânico) e DT (toxóide diftérico) combinados. Na avaliação de segurança, nas respostas adversas locais no período entre 0 h e 24 horas após a remoção do *patch*, foi verificado que a formulação contendo TT e DT não induziu eventos adversos locais graves. Após a primeira imunização, foi observada elevação dos títulos de anticorpos IgG anti-TT e anti-DT, indicando que uma única aplicação da formulação TCI pode induzir resposta imune em seres humanos. Além disso, o *patch* hidrogel não necessitou de pré-tratamento do local para remover ou alterar o estrato córneo, a penetração do antígeno na pele foi eficaz e induziu anticorpos específicos após uma única aplicação em alguns indivíduos do estudo, o que representa eficácia e segurança.

Esses estudos clínicos sugerem que o TCI pode ser aplicável para aplicação em larga escala nos casos de surtos e aumentar as taxas de vacinação nos países em desenvolvimento (MATSUO et al., 2013).

1.6 Leptospirose

A leptospirose é uma zoonose difundida mundialmente, causada por espiroquetas pertencentes ao gênero *Leptospira*, que abrange tanto espécies saprofíticas e não patogênicas, as *L. biflexa* (6 espécies, mais de 60 sorovares) quanto patogênicas, as *L. interrogans* (13 espécies, mais de 260 sorovares) (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; FAINE; STALLMAN, 1982; GUERRA, 2009; JOHNSON; FAINE, 1984).

As leptospiros são bactérias gram-negativas filamentosas, móveis, com ganchos nas suas extremidades, aeróbias obrigatórias, classificadas em diferentes sorovares de acordo com seus determinantes antigênicos (FAINE et al., 1999) (Figura 5).

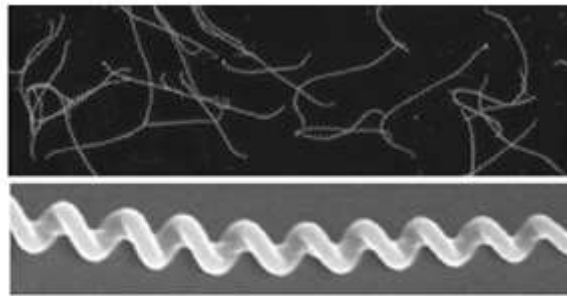


Figura 5 - Micrografias eletrônicas de leptospiros. *Leptospiras* são bactérias finas e em forma de hélice, com diâmetro de 0,15 a 0,3 μm e comprimento de 6 a 20 μm .

Fonte: PICARDEAU, 2013

As leptospiros possuem uma membrana interna (MI) e uma membrana externa (OM). A parede celular de peptídeoglicano está intimamente ligada à membrana interna, na qual se localizam os transportadores de ferro FeoA-FeoB (FeoAB), proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) e a lipoproteína LipL31. Já a membrana externa, é composta por lipopolissacarídeos (LPS), proteína de membrana externa (OMP) L1 (OmpL1) e lipoproteínas, LipL32, LipL36 (presente na superfície interna da OM) (CULLEN; HAAKE; ADLER, 2004; FAINE et al., 1999; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009) (Figura 6).

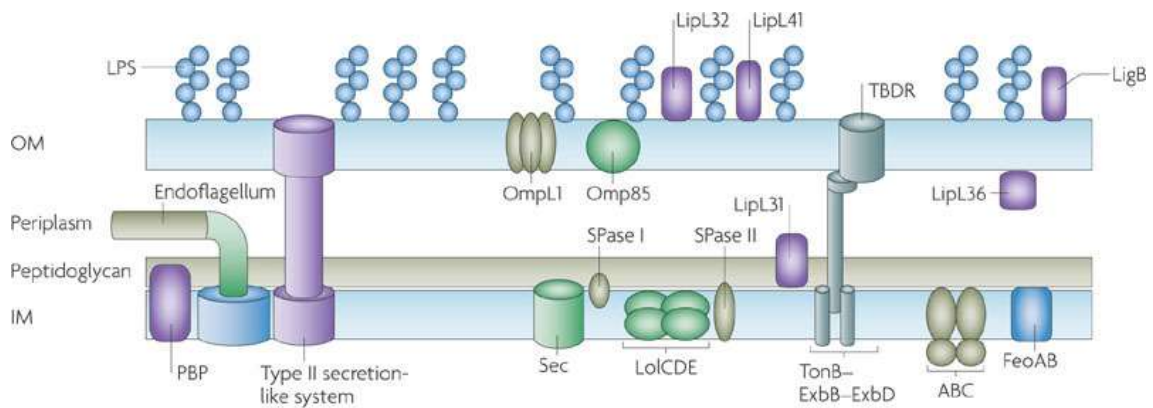


Figura 6 - Representação esquemática da arquitetura da leptospira.
Fonte: KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009

O LPS de leptospira apresenta menor endotoxicidade em células e animais, em comparação com o de outras bactérias gram-negativas, o que pode estar vinculado à composição incomum do Lipídeo A, que possui um dissacarídeo de glucosamina modificado, fosforilado e metilado. Além disso, suspeita-se que a heterogeneidade estrutural do LPS esteja vinculada à diversidade antigênica presente nos diferentes sorovares de leptospira (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

1.7 Transmissão da doença, sinais e sintomas

Os humanos são hospedeiros acidentais e terminais da *Leptospira*, sendo contaminados durante atividades ocupacionais, recreacionais ou domésticas, em que haja contato com urina de animais portadores, sendo infectados diretamente, por meio de lesões na derme e contato com mucosas dos olhos, boca ou nasofaringe; ou indiretamente, através da ingestão de água e alimentos contaminados ou contato com solo contaminado (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; BOLIN; KOELLNER, 1988; GUERRA, 2009; HARRISON; FITZGERALD, 1988; THIERMANN, 1984).

A sintomatologia da leptospirose pode variar de sinais subclínicos a graves, apresentando duas fases características. Na fase inicial, com duração de 3 a 10 dias, assemelha-se a um resfriado, havendo febre, dor de cabeça, tremores,

mialgias, com duração de 4 a 30 dias, podendo ser confundida com outras doenças, como gripe, dengue e outras doenças virais. Pode evoluir para uma forma mais grave de leptospirose, denominada Doença de Weil ou Síndrome hemorrágica pulmonar, que corresponde a aproximadamente 5 a 15% dos casos, com quadro de icterícia e acometimento de órgãos específicos, como fígado, rins, coração e pulmão, podendo levar a hemorragias e falência renal aguda (ABDULKADER, 1997; BHARTI et al., 2003; FAINE et al., 1999; GUERRA, 2009; TURNER, 1969).

1.8 Diagnóstico da leptospirose

A maioria dos casos de leptospirose é diagnosticada por testes sorológicos, mas os anticorpos só são detectados no sangue depois de mais de uma semana do início dos sintomas (AGAMPODI et al., 2012). O diagnóstico bacteriológico é difícil, pois requer meio de cultura específico e o tempo para cultivo de leptospira é bastante longo (em torno de um mês), gerando um resultado final tardio (VIJAYACHARI et al., 2001).

O MAT (teste de aglutinação microscópica), ELISA e PCR são as técnicas que permitem confirmar o diagnóstico de leptospirose (AHMED et al., 2009; FAINE et al., 1999).

Entre os testes sorológicos, o MAT é o mais utilizado. Baseia-se no reconhecimento de anticorpos de soros dos pacientes a antígenos de superfície dos lipopolissacarídeos dos diferentes sorovares de leptospira cultivados. (FAINE et al., 1999; KUSUM et al., 2005; SMYTHE et al., 2009).

Ensaio imunoenzimático (ELISA) têm se mostrado sensíveis e reprodutíveis, porém ainda não há um antígeno altamente específico da fase aguda para detecção da doença em sua fase inicial (AHMED et al., 2009; FAINE et al., 1999).

Entre as técnicas moleculares, o PCR (reação de polimerase em cadeia – *polymerase chain reaction*) pode ser utilizado para detecção de DNA de leptospiros, mas essa técnica só é eficaz quando a amostra de sangue foi coletada após 7 dias do início dos sintomas da leptospirose (AHMED et al., 2009; VILLUMSEN et al., 2012).

Portanto, existe uma necessidade urgente de desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico fácil e rápido, com uso de anticorpos ou antígenos presentes na fase aguda da doença (PICARDEAU, 2013).

1.9 Epidemiologia

A leptospirose é uma importante questão de saúde pública em muitos países, especialmente na América Latina e no Sudeste da Ásia. O número estimado de casos de leptospirose grave é de mais de um milhão por ano, com taxa de letalidade em torno de 10% (ABELA-RIDDER; SIKKEMA; HARTSKEERL, 2010).

A incidência anual relatada, geralmente varia de 0,1 a 1 por 100.000 habitantes em climas temperados e é maior do que 10 por 100.000 habitantes em regiões tropicais (ABELA-RIDDER; SIKKEMA; HARTSKEERL, 2010).

Os surtos de leptospirose ocorrem regularmente durante a estação chuvosa em favelas de megalópoles brasileiras. Atualmente, um bilhão de pessoas vivem em favelas em todo o mundo e essa população deve dobrar nos próximos 20 anos (LAU et al., 2010). As condições de vida nessas favelas, especialmente em regiões tropicais, são favoráveis para a transmissão da leptospirose por ratos (REIS et al., 2008; RILEY et al., 2007).

1.10 Mecanismos de patogenicidade e fatores de virulência

Os mecanismos de patogenicidade da leptospira ainda não foram totalmente elucidados. Em estudos com animais, leptospiras patogênicas puderam ser detectadas no sangue e tecidos após 10 minutos da inoculação intraperitoneal, intradérmica ou intraocular. A adesão aos tecidos do hospedeiro parece ser um pré-requisito para uma infecção bem sucedida e tanto leptospiras intactas quanto suas proteínas têm demonstrado *in vitro* a capacidade de adesão a uma variedade de componentes da matriz extracelular (MEC) do hospedeiro (Tabela 1) (ADLER, 2014). Com o auxílio de estudos genômicos funcionais com base na sequência do genoma de *L. interrogans Copenhageni* (NASCIMENTO et al., 2004), mais de 200 proteínas de membrana externa foram previstas, como proteínas provavelmente relacionadas à patogênese da leptospirose.

Tabela 1 - Adesão a componentes do hospedeiro e adesinas putativas de *Leptospiras* patogênicas

Sorovar de Leptospira	Componentes de leptospira	Componentes do hospedeiro	Referência
<i>Copenhageni</i>	Leptospiras viáveis	Fibroblastos L929 da MEC	Ito and Yanagawa (1987)
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	Leptospiras viáveis	Fibroblastos Vero Macrófagos J774A.1	Merien et al. (1997)
<i>Copenhageni</i>	Lsa24 recombinante	Laminina	Barbosa et al. (2006)
<i>Copenhageni</i>	LigA, LigB recombinante	MEC, fibronectina	Choy et al. (2007)
<i>Copenhageni</i>	LenA (LfhA, Lsa24), LenBCDEF recombinantes	Laminina, fibronectina	Stevenson et al. (2007)
<i>Copenhageni</i>	Lsa21 recombinante	Laminina, colágeno IV, fibronectina	Atzingen et al. (2008)
<i>Manilae</i>	LipL32 recombinante	Laminina, colágeno I, fibronectina	Hoke et al. (2008)
<i>Copenhageni</i>	LipL32 recombinante	Fibronectina, colágeno IV	Hauk et al. (2008)
<i>Copenhageni</i>	Lsa27 recombinante	Laminina	Longhi et al. (2009)
<i>Copenhageni</i>	Lp95 recombinante	Laminina, fibronectina	Atzingen et al. (2009)
<i>Copenhageni</i>	Lsa63 recombinante	Laminina	Vieira et al. (2010b)
<i>Copenhageni</i>	OmpL37 recombinante	Elastina, fibronectina, fibrinogênio, laminina	Pinne et al. (2010)
<i>Copenhageni</i>	LipL32, LIC12730, LIC10494, Lp29, Lp49, LipL40, MPL36, LIC12238 recombinantes	Plasminogênio	Vieira et al. (2010a)
<i>Copenhageni</i>	LigA e LigB	Células MDCJ, fibronectina, laminina	Figueira et al. (2011)
<i>Copenhageni</i>	Lsa66 recombinante	Fibronectina, laminina, plasminogênio	Oliveira et al. (2011)
<i>Copenhageni</i>	Lsa20 recombinante	Laminina, plasminogênio	Mendes et al. (2011)
<i>Copenhageni</i>	Lsa 25, Lsa33 recombinantes	Laminina	Domingos et al. (2012)
<i>Copenhageni</i>	Lsa30 recombinante	Plasminogênio	Souza et al. (2012)
<i>Copenhageni</i>	OmpL1	Fibronectina, laminina, plasminogênio	Fernandes et al. (2012)
<i>Copenhageni</i>	Fator de elongação Tu LIC12875 recombinante	Colágeno, fibronectina, laminina, elastina, fibrinogênio	Wolff et al. (2013)
<i>Copenhageni</i>	LIC12238, Lsa33, Lsa30, OmpL1, LIC11360, LIC11975 recombinantes	Fibrinogênio	Oliveira et al. (2013)
<i>Copenhageni</i>	Leptospiras viáveis	Caderina	Evangelista et al. (2014)
<i>Copenhageni</i>	Lsa44, Lsa45 recombinantes	Laminina	Fernandes et al. (2014)
<i>Manilae</i>	LMB216 expresso em <i>L. biflexa</i>	Fibronectina	Toma et al. (2014)

Fonte: ADLER, 2014

A primeira proteína de leptospira a ser identificada como essencial para a virulência foi Loa22, proteína de membrana externa contendo um domínio C-terminal OmpA, que supostamente faz a ligação entre a membrana externa e a camada de peptidoglicano. Foi observado que a Loa22 induz resposta imune em pacientes infectados, é regulada durante a infecção aguda (NALLY et al., 2007) e liga-se fracamente à matriz extracelular do hospedeiro. Além disso, um mutante *loa22* mostrou-se totalmente avirulento em *hamsters* e em porquinhos da Índia, sugerindo um papel dessa proteína na virulência da leptospirose. A presença de um homólogo de Loa22 em *L. biflexa* sugere um papel indireto na virulência (RISTOW et al., 2007).

O LPS é um fator de virulência importante para todas as bactérias Gram-negativas. Dois mutantes da bactéria com alterações no LPS tiveram a sua virulência atenuada em *hamsters* (MURRAY et al., 2010) e sua capacidade reduzida em colonizar rins de ratos (MARCSISIN et al., 2013). Não se sabe o motivo preciso da perda da virulência de ambos os mutantes, mas não foi devido ao aumento de suscetibilidade ao complemento (MARCSISIN et al., 2013; MURRAY et al., 2010).

A motilidade também é um fator de virulência, e em *Leptospira* estudos anularam a motilidade por inativação dos genes envolvidos na biossíntese ou na estrutura flagelar. A inativação de *fliY*, que codifica uma proteína flagelar motora, resultou na atenuação da virulência em porquinhos da Índia (LIAO et al., 2009). Já a mutação de *flaA2*, mas não *flaA1*, levou a virulência atenuada em *hamsters* (LAMBERT et al., 2012), possivelmente porque os mutantes *flaA1* mantiveram alguma mobilidade de translação. A mutação do gene LB139, que codifica uma proteína sensora, resultou na redução da motilidade, bem como a regulação negativa de uma variedade de genes de quimiotaxia, gerando um mutante atenuado para *hamsters* (ESHGHI et al., 2014).

O ferro é essencial para a viabilidade da maioria das bactérias e a capacidade de adquirir ferro *in vivo* é um fator de virulência importante. Leptospiras patogênicas possuem a enzima heme oxigenase, também conhecida como HemO, que facilita a aquisição de ferro presente no heme, principal fonte de ferro nas células do hospedeiro mamífero (MURRAY et al., 2008, 2009). Uma cepa hemO mutante não causou leptospirose em *hamsters*, mas reteve a capacidade de colonizar o rim.

A transição do ambiente para o hospedeiro induz o *up-regulation* de vários genes de resposta ao estresse (LO et al., 2006, 2010; MATSUNAGA et al., 2007).

Portanto, é compreensível que alguns mutantes para esses genes apresentem virulência atenuada. Proteínas de virulência identificadas nesta categoria incluem a catalase de leptospira, KatE (ESHGHI et al., 2012) e da chaperona molecular ClpB (LOURDAULT et al., 2011). A mutação de qualquer um desses genes resultou em aumento da susceptibilidade ao estresse oxidativo.

Genomas de *Leptospira* spp patogênicas contêm até 5 genes que codificam enzimas do tipo esfingomielinase (NARAYANAVARI et al., 2012). A ausência desses genes em *L. biflexa* saprofítica (PICARDEAU et al., 2008) sugere fortemente um papel dessas enzimas na sobrevivência das leptospiros patogênicas em mamíferos e não apenas na aquisição de nutrientes. Estudos com esfingomielinases de leptospira têm demonstrado algumas atividades relacionadas com a virulência, como a formação de poros (LEE et al., 2002) e citotoxicidade (ZHANG et al., 2008).

A *Leptospira* não é um patógeno intracelular clássico. Em experimentos *in vitro*, foram capazes de entrar efetivamente nas células hospedeiras (MERIEN; BARANTON; PEROLAT, 1997) e rapidamente translocar através de monocamadas de células polarizadas, sem alterar a resistência elétrica transepitelial, residindo apenas temporariamente dentro de células não fagocíticas (BAROCCHIM et al., 2002; THOMAS; HIGHBLE, 1990). As leptospiros parecem utilizar um novo mecanismo de entrada na célula, que permite uma rápida translocação e disseminação para órgãos alvo, evadindo da resposta imune do hospedeiro (CINCO, 2010).

As *Leptospiros* patogênicas resistem à fagocitose por macrófagos e neutrófilos, exceto quando há anticorpos específicos contra a bactéria (BANFI et al., 1982; McGRATH et al., 1984; VINH; ADLER; FAINE, 1982). No entanto, estudos sugerem que essas bactérias sejam capazes de sobreviver dentro de macrófagos, e subsequentemente escapar, ao induzir a apoptose dessas células (JIN et al., 2009; MERIEN; BARANTON; PEROLAT, 1997). Além disso, foi observado nos tecidos de pacientes infectados ou de animais experimentais que a maioria das leptospiros é encontrada no meio extracelular (ZHANG et al., 2012).

Foi proposto que os diferentes resultados da interação da *Leptospira* com macrófagos humanos e de ratos possam ser a base para a diferente evolução da infecção aguda em humanos (susceptíveis) e camundongos (resistentes) (LI et al.,

2010). Antígenos de *Leptospiras* patogênicas são capazes de ativar o TLR-2 e TLR-4 em macrófagos e o TLR-2 em monócitos murinos, havendo a expressão de diversas citocinas inflamatórias (NAHORI et al., 2005; WERTS et al., 2001).

Matsui et al. (2011) sugerem que o dano tecidual observado nas espécies animais susceptíveis à leptospirose aguda, tais como *hamsters*, e por inferência, os seres humanos, é mediada em parte pelo aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Camundongos apresentaram mais rapidamente e em menor quantidade a citocina anti-inflamatória IL-10.

1.11 Vacinas contra leptospirose

A principal resposta imune induzida contra leptospira é humoral, com produção de anticorpos específicos contra um determinado sorovar. Portanto, a formulação vacinal deve ser composta por sorovares prevalentes entre a população a ser imunizada (LEVETT, 2001).

As vacinas disponíveis contra leptospirose de uso veterinário são vacinas celulares, obtidas a partir de leptospiras inativadas ou atenuadas (HUHN et al., 1975; TRIPATHY et al., 1976; YORK, 1966). São utilizadas nos países desenvolvidos para a vacinação do gado, suínos e cães domésticos; já nos países em desenvolvimento, não há produção de vacinas contra leptospirose com os sorovares regionais (LEVETT, 2001). Tais preparações conferem resposta imune protetora, principalmente através da produção de anticorpos anti-LPS de leptospira. Porém, a proteção é transitória, não há indução de resposta imunológica celular nem de proteção cruzada para sorovares de leptospira não incluídos na formulação, sendo necessária a reimunização anual e a produção de novas vacinas após o surgimento de um novo sorovar. A maior limitação para o desenvolvimento de uma vacina polivalente celular é o grande número de sorovares patogênicos (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; ATZINGEN et al., 2010; DE LA PEÑA MOCTEZUMA et al., 1999).

Atualmente, estão em estudos diferentes abordagens vacinais contra leptospirose para uso humano, baseadas em subunidades antigênicas, como proteínas recombinantes da membrana externa de leptospira (OMPs) (GONZÁLEZ et al., 2004), preparações a partir do LPS (BHARTI et al., 2003; OPS, 1999),

lipoproteínas (HAAKE, 2000; MINSAP, 1998) ou vacinas de DNA (WANG; JIN; WEGRZYN, 2007). As vacinas de subunidades estão substituindo o uso das vacinas inativadas contra leptospirose, apesar de sua ampla distribuição em países como a China, Japão, Israel, Rússia, devido à ausência de resposta protetora cruzada para sorovares não inclusos na formulação vacinal (MARTÍNEZ et al., 2004; ROSARIO et al., 2012). Além disso, os efeitos adversos vinculados às vacinas celulares de leptospira limitaram o seu uso em humanos. Por esses motivos, atualmente a comunidade científica busca encontrar uma proteína imunogênica de leptospira codificada por uma região conservada (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; WANG; JIN; WEGRZYN, 2007).

Com o sequenciamento genético de duas cepas saprofitas e quatro cepas patogênicas de *Leptospira*, foram identificados alguns potenciais alvos para desenvolvimento de vacinas e tratamento terapêutico (ATZINGEN et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2004). A grande maioria dos estudos está voltada às vacinas de subunidade, compostas por OMPs recombinantes, como a OmpL1 (HAAKE et al., 1999), LipL32 (ATZINGEN et al., 2010; HOKE et al., 2008), LipL41 (HAAKE et al., 1999), LigA (SILVA et al., 2007), Lp0607, Lp118, Lp1454 (CHANG et al., 2007; KOIZUMI; WATANABE; 2004).

Palaniappan et al. (2006) em estudos de desafio em *hamsters*, verificaram efeito protetor de proteínas LigA recombinantes. (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; WANG; JIN; WEGRZYN, 2007). Branger et al. (2005) observaram proteção cruzada para cepas patogênicas de *Leptospira* em chinchila ao utilizar uma vacina de DNA expressando a LipL32, uma proteína expressa pelas cepas patogênicas mas não pelas saprofitas. Haake et al. (1999) verificaram que a combinação de OmpL1 e LipL41 conferiram proteção em *hamsters*, o que é promissor no desenvolvimento de vacinas de subunidades com maior efeito protetor e menos reações adversas. YAN et al. (2009) observaram imunidade protetora em *hamsters* após a imunização com regiões conservadas e variáveis de LigB, seguido por desafio com *L. interrogans* sorovar *Pomona*.

1.12 LipL32

A LipL32 constitui mais de 50% da membrana externa da *Leptospira* (HAAKE et al., 2000). É uma proteína altamente imunogênica, mais de 95% dos pacientes com leptospirose produzem anticorpos anti-LipL32 (GUERREIRO et al., 2001), é altamente conservada em espécies patogênicas, ausente em espécies saprofitas, expressa durante a infecção letal aguda e induz resposta imune humoral (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; HOKE et al., 2008; NALLY et al., 2007).

Experimentos de HOKE et al. (2008) e HAUK et al. (2008) demonstraram que a LipL32 se liga a proteínas da matriz extracelular do hospedeiro, como laminina, colágeno I, IV e V, e fibronectina do plasma, sendo importante para a adesão bacteriana na matriz extracelular do hospedeiro.

A proteína LipL32 é capaz de se ligar ao TLR-2 nas células dos túbulos proximais levando à ativação do fator nuclear NF- κ B, que estimula a produção de CCL2/MCP-1 e CXCL2/MIP-2 para recrutamento de células inflamatórias, gerando a resposta inflamatória inicial (BLASI et al., 2007; YANG et al., 2006).

Múltiplos estudos foram realizados utilizando a LipL32 como candidata vacinal e foi demonstrado que a proteína promove proteção contra *L. interrogans* sorovares *Canicola* (BRANGER et al., 2005) e *Copenhageni* (GRASSMANN et al., 2012; SEIXAS et al., 2007a), mas não contra *L. interrogans* sorovares *Pomona* (CAO et al., 2011) e *Manilae* (LUCAS et al., 2011) em *hamsters*.

Branger et al. (2005) observaram que uma vacina de DNA codificando LipL32 conferiu imunidade protetora contra *L. interrogans* serovar *Canicola* em chinchila. Humphries et al. (2014) realizaram experimentos com *hamsters* e verificaram que o grupo imunizado com LipL32 recombinante não apresentou aumento significativo na taxa de sobrevivência dos animais após desafio com *L. interrogans* serovar *Canicola*, mas verificaram diminuição significativa na quantidade de leptospiros presentes nos rins e na taxa de lesões nesse órgão, indicando que apesar da proteína recombinante não ter conferido completa proteção após desafio, ela foi capaz de reduzir a severidade da infecção nos animais. Estudos de Grassmann et al. (2012) demonstraram que a LipL32 conferiu imunidade protetora contra *L. interrogans* serovar *Copenhageni* em *hamsters* quando a proteína foi coadministrada com a subunidade B da enterotoxina termolábil (LTB) de *E. coli*.

1.13 Resposta imune do hospedeiro contra leptospirose

A principal resposta imune induzida contra leptospira é humoral, com produção de anticorpos específicos contra um determinado sorovar. Anticorpos IgM e IgG são sorologicamente detectados em pacientes que se recuperaram de leptospirose grave até seis anos após a infecção inicial por leptospira (CUMBERLAND et al., 2001).

Os anticorpos produzidos são principalmente dirigidos contra o LPS da bactéria. No entanto, a imunidade mediada por anticorpos anti-LPS é limitado a sorotipos homólogos, ao contrário de preparações contendo proteínas inteiras de leptospira, que demonstraram proteção após desafio com sorotipos homólogos e heterólogos (PALANIAPPAN; RAMANUJAM; CHANG, 2007).

A presença de ambos TLR-2 e TLR-4 é necessária para a defesa imunológica inata eficaz contra *Leptospira* (CHASSIN et al., 2009; VIRIYAKOSOL et al., 2006; WERTS et al., 2001). Camundongos *knockout* para TLR-2 e TLR-4 são altamente suscetíveis à infecção por leptospira em comparação com camundongos com um único nocaute (CHASSIN et al., 2009).

A ausência de TLR4 leva à leptospirose grave, com manifestações clínicas de icterícia e hemorragia pulmonar, bem como ao acúmulo de leptospiros nos rins e pulmões de camundongos infectados com *L. interrogans* sorovar *Icterohaemorrhagiae* (VIRIYAKOSOL et al., 2006). Foi demonstrado que a presença de TLR-4 é necessária para a produção precoce de IgM pelos linfócitos B em resposta ao LPS de leptospira (CHASSIN et al., 2009). O LPS, que normalmente ativa a via TLR-4 em resposta às bactérias Gram-negativas, foi capaz de ativar a via de TLR-2 em células monocíticas humanas (WERTS et al., 2001). Camundongos deficientes em TLR-2 não responderam à injeção intraperitoneal de LPS de leptospira e não foram capazes de produzir TNF- α e IL-6. Esses resultados sugerem que pode haver diferenças fundamentais em como as diferentes espécies reagem a leptospirosas (CHASSIN et al., 2009).

Pacientes com leptospirose severa apresentam níveis elevados tanto de citocinas pró-inflamatórias quanto anti-inflamatórias. Altos níveis de IL-6, IL-10 e TNF- α estão associados com maior severidade da doença (KYRIAKIDIS; SAMARA; PAPA, 2011; REIS et al., 2013). Fujita et al. (2015) realizaram um estudo com

hamsters infectados com duas cepas de *L. interrogans*, sorovares *Manilae* (altamente virulenta) e *Hebdomadis* (menos virulenta) e avaliaram a expressão gênica de citocinas e danos teciduais nesses animais. Foi observada a expressão das citocinas inflamatórias, tais como IL-6 nos pulmões, IL-10 no fígado, TNF- α no sangue, fígado e pulmão, e COX2 no fígado e pulmões, consideradas relevantes para a gravidade da leptospirose.

A leptospira possui vários fatores capazes de induzir a resposta inata do hospedeiro: o LPS, que ativa monócitos através do TLR-2, ativando a liberação de citocinas inflamatórias (WERTS et al., 2001); a LipL32 e hemolisinas, capazes de induzir a expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), de proteína quimiotática de monócitos-1 (CCL2/MCP-1) e de TNF- α em cultivos de células do túbulo proximal renal de ratos, além de induzir a produção de IL-6, IL-1 β e TNF- α em cultivos de macrófagos murinos e humanos (WANG et al., 2012; YANG et al., 2002, 2006).

2 JUSTIFICATIVA

A imunização transcutânea oferece diversas vantagens sobre outras vias de vacinação, tendo-se em vista o procedimento indolor e o custo adicional dos métodos convencionais, que utilizam seringas e agulhas.

No caso da *Leptospira*, a imunização transcutânea, priorizando a porta de entrada do patógeno, pode ser uma proposta de interesse como via de introdução do antígeno vacinal. Nesse sentido, neste estudo foi utilizada uma proteína recombinante, LipL32, que é a principal proteína de membrana externa das espécies patogênicas de *Leptospira*, altamente conservada e expressa durante a infecção e antigenicamente dominante na resposta imune humoral contra a leptospirose em humanos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a resposta imune humoral, celular e secretória em camundongos imunizados com proteína recombinante LipL32 de *Leptospira*, pela via transcutânea.

3.2 Objetivos específicos

1. Imunização transcutânea de camundongos com proteína recombinante LipL32 de *Leptospira*.
2. Imunização transcutânea de camundongos com proteína recombinante LipL32 de *Leptospira*, coadministrada com adjuvantes: surfactante pulmonar (surf) de três diferentes procedências; polietilenoglicol (PEG) e monofosforil-lipídeo A (MPL-A).
3. Avaliação da atividade emoliente ou adjuvante de: surfactante pulmonar (surf) de três diferentes procedências; polietilenoglicol (PEG) e monofosforil-lipídeo A (MPL-A), na imunização transcutânea de camundongos com LipL32.
4. Avaliação da imunidade humoral, celular e secretória induzidas pela proteína recombinante LipL32 de *Leptospira*, por via transcutânea, em camundongos Balb/c e C57BL-6.
5. Avaliação da resposta inata ao BCG, em camundongos previamente imunizados por via transcutânea com LipL32, em diferentes formulações com emolientes/adjuvantes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Produção e purificação de proteína recombinante LipL32 de leptospira (desenvolvido segundo protocolo descrito pelo laboratório da Dra. Ana Lucia T. O. Nascimento) (NEVES et al., 2007)

4.1.1 Transformação de bactérias *E. coli*

E. coli BL21-SI foram incubadas por 30 minutos em gelo com 1 µl da construção pDEST-LipL32 e levadas ao banho seco a 42 °C, por 1 minuto, seguido de 2 minutos em gelo. Foram adicionados 340 µl de meio SOC (2% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glicose a 20 mM, pH 7,0), seguido de incubação a 37 °C, por 1 hora, sob leve agitação.

As bactérias transformadas foram semeadas em meio 2YT-ON (16 g/L de triptona, 10 g/L de extrato de levedura, pH 7,0) suplementado com 100 µg/µl de ampicilina e incubadas a 30 °C, por 16 horas.

4.1.2 Indução da expressão de LipL32

Uma alíquota do cultivo bacteriano obtido na etapa anterior (pré-inóculo) foi diluída na proporção de 1 : 20 em 800 ml de meio 2YT-ON suplementado com 100 µg/ µl de ampicilina, incubando-se a 30 °C, sob agitação. A densidade ótica a 600 nm (DO_{600nm}) foi medida até ser atingido o valor de 0,6, quando foram adicionados 300 mM NaCl para a indução da expressão da proteína LipL32. A cultura foi incubada a 30 °C, por 16 horas.

A cultura induzida foi centrifugada (10.000 rpm, 20 minutos, 4 °C) e os sedimentos bacterianos ressuspendidos em 50 ml de solução de lise: 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 2 mM PMSF, Triton X-100 a 1%. A lise celular foi feita em sonicador por 5 minutos a 60 Hz em banho de gelo. Os lisados bacterianos foram centrifugados (10.000 rpm, 20 minutos, 4 °C) para separar a fração solúvel da insolúvel. As frações foram analisadas em gel SDS-PAGE 12% para verificação da expressão da proteína LipL32.

4.1.3 Purificação da proteína recombinante LipL32 de leptospira

A proteína LipL32, expressa de forma solúvel, foi purificada por cromatografia de afinidade ao metal, em coluna Hi-Trap de 1 mL (GE Healthcare) carregada com níquel. Foi utilizado o sistema AktaPrime (GE Healthcare), com eluição em gradiente de imidazol. As frações eluídas contendo a proteína recombinante foram analisadas em gel SDS-PAGE 12%.

4.1.4 Diálise e dosagem da proteína LipL32 purificada

A proteína recombinante purificada foi dialisada contra tampão PBS contendo 1 g/L glicina, utilizando-se membrana de 6-8 kDa (Sigma Aldrich). A concentração da proteína LipL32 purificada e dialisada foi avaliada por reagente de Bradford, utilizando-se curva de BSA.

4.2 Antígeno e adjuvantes/emolientes

- ✓ **Proteína recombinante LipL32 de leptospira** - estoque: 1500 µg/ml; Uso: 10 µg/dose ou 1 µg/dose (dose subimunizante).
- ✓ **Hidróxido de alumínio (Al)** – usado como adjuvante (1,2 mg/ml) nas imunizações subcutâneas.
- ✓ **Surfactante pulmonar (suíno) (Surf But)** (KUBRUSLY et al., 2000) - produzido pelo Instituto Butantan, composto de fosfolipídeos e polilipídeos hidrofóbicos, SP-B e SP-C – usado como emoliente/adjuvante, nas imunizações transcutâneas. Utilizado na diluição 0,25%, 1% ou 2% em PBS estéril.
- ✓ **Surfactante comercial (Surf Com)** (gentilmente cedido pelo Dr. José Gregório Cabrera Gomes, do ICB, USP) - Biosurfactante Ramnolipídio composto por duas moléculas de 3-hidroxicanoatos e uma (monoramnolipídio) ou duas (diramnolipídio) moléculas de ramnose. Usado

como emoliente/adjuvante, nas imunizações transcutâneas. Utilizado a 1% em PBS estéril.

- ✓ **Surfactante sintético (Surf USP)** (gentilmente cedido pelo Dr. José Gregório Cabrera Gomes, do ICB, USP) - Biossurfactante Ramnolipídio composto por duas moléculas de 3-hidroxicanoatos e uma (monoramnolipídio) ou duas (diramnolipídio) moléculas de ramnose. Usado como emoliente/adjuvante, nas imunizações transcutâneas. Utilizado a 1% em PBS estéril.
- ✓ **Monofosforil lipídeo A (MPL-A)** de *Bordetella pertussis* (QUINTILIO et al., 2009) - Produzido pelo Instituto Butantan, usado como emoliente/adjuvante, nas imunizações transcutâneas. Utilizado a 20 µg/dose em PBS estéril.
- ✓ **Polietilenoglicol (PEG)** (Sigma-Aldrich) – Usado como emoliente/ adjuvante, nas imunizações transcutâneas. Utilizado a 0,5% ou 1% em PBS estéril.

4.3 Preparação dos animais, protocolos e vias de imunização

O Projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais do Instituto Butantan (CEUAIB), protocolo 998/13.

Foram realizados seis experimentos (Exps I a VI), tendo sido utilizados camundongos Balb/c (Exps I a V) ou C57BL-6 (Exp VI), fêmeas, com 6-8 semanas de idade, procedentes do Biotério Central do Instituto Butantan.

A preparação dos animais para a imunização transcutânea foi realizada como descrito por Belyakov et al. (2004) e Huang et al. (2006). As formulações vacinais foram administradas na face interna da orelha ou na região abdominal.

Nos grupos imunizados na região abdominal, os animais foram depilados com aparelho de barbear descartável, um dia antes da imunização. No dia da imunização, a superfície ventral da orelha ou a região abdominal depilada dos camundongos foram hidratadas com gaze umedecida em solução fisiológica por 5-10 minutos e a seguir lixadas levemente com uma lixa de unha, para ruptura do estrato córneo da epiderme, a fim de facilitar a passagem do antígeno (LipL32).

O antígeno foi aplicado com uma micropipeta, sozinho ou em combinação com emolientes/adjuvantes: surfactantes (Surf), polietilenoglicol (PEG) e monofosforil-lipídeo A (MPL-A), coadministrados com a LipL32 ou como pré-tratamento epidérmico local. Após a aplicação foram aguardados 10 a 15 minutos para a secagem completa das soluções. Quando os emolientes/adjuvantes foram utilizados como pré-tratamento local, foram realizadas diversas lavagens antes da aplicação do antígeno.

Foram utilizados de 3 a 6 animais por grupo teste e cinco nos grupos controle (administrados com PBS, por via Tc ou LipL32 (1 µg), por via intradérmica - ID).

4.4 Avaliação da resposta humoral ao antígeno, por via subcutânea

Cinco camundongos Balb/c foram imunizados com LipL32 pela via subcutânea (Sc), em duas doses de 10 µg/ 200 µl, com intervalo semanal. O soro desses animais foi avaliado por ELISA contra a LipL32 e utilizado como controle positivo nos ensaios de imunização transcutânea.

4.5 Protocolos de imunização e sangria

Nos diferentes experimentos foram administradas pelo menos três doses da proteína recombinante LipL32 (10 µg/ dose de 20 µl), pela via Tc. Após os diferentes protocolos de imunização foi feita a sangria dos animais imunizados e controles por punção retroorbital e o soros estocados a - 20 °C até o uso.

Exp I

Foram utilizados dois protocolos de imunização (Exp IA e IB) (Figura 7). Um grupo de animais recebeu três doses semanais da proteína recombinante LipL32 (10 µg/dose), pela via Tc, nos dias 0, 7 e 15 (Exp IA) e outro nos dias 0, 25 e 39 (Exp IB). No grupo controle, em cada protocolo, foi administrado PBS, seguindo o mesmo esquema. Em cada um dos protocolos também foram avaliados diferentes locais de aplicação, região abdominal (ab) ou face interna da orelha (or), ficando assim distribuídos os diferentes grupos: Exp IAab (Protocolo A, região abdominal) e Exp

IAor (Protocolo A, orelha) e Exp IBab (Protocolo B, região abdominal) e Exp IBor (Protocolo B, orelha). No Exp IA, a sangria foi realizada uma semana após a segunda dose (Sg 1) e 14 dias após a terceira (Sg 2); o outro grupo (Exp IB), 13 dias após a segunda dose (Sg 1) e 14 dias após a terceira (Sg 2).

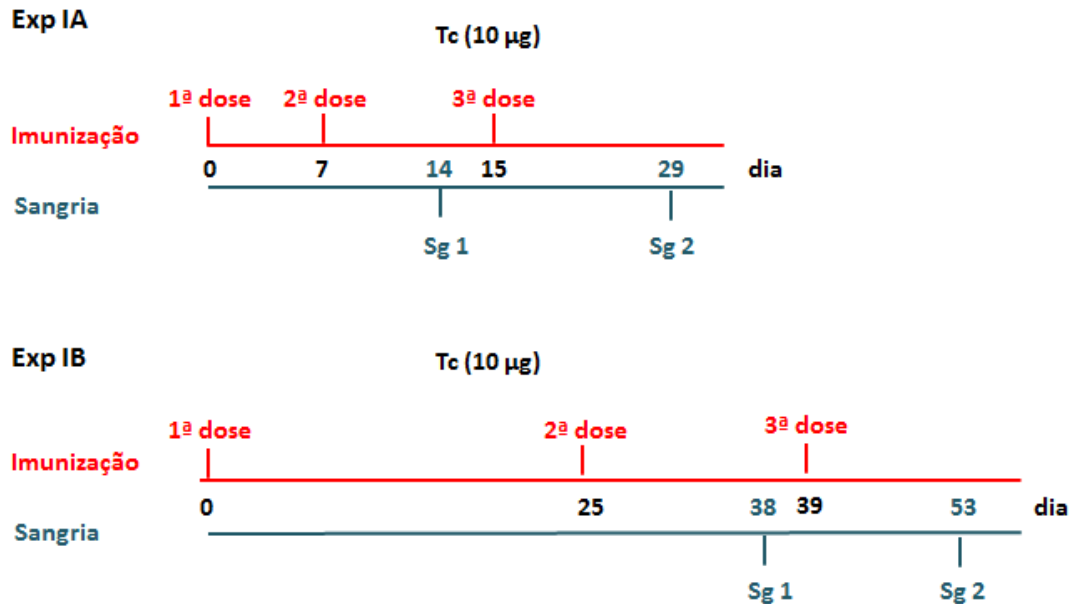


Figura 7 – Exp I: Protocolo de imunização e sangria. Um grupo de animais (Exp IA) recebeu três doses semanais da LipL32 (10 µg/dose) pela via Tc, nos dias 0, 7 e 15, com sangria uma semana após a segunda dose (Sg 1) e 14 dias após a terceira (Sg 2); o outro grupo (Exp IB) foi imunizado nos dias 0, 25 e 39, com sangria 13 dias após a segunda dose (Sg 1) e 14 dias após a terceira (Sg 2).

Exp II

Foram administradas cinco doses Tc da LipL32, as três primeiras com intervalo de uma semana e a quarta e quinta com intervalo de duas semanas (Figura 8). O antígeno (LipL32 – 10 µg/dose) foi coadministrado com três diferentes surfactantes: Surf But (0,25% em PBS); Surf USP (1% em PBS) e Surf Com (1% em PBS). Os animais foram sangrados 14 dias após a terceira (Sg 1), quarta (Sg 2) e quinta (Sg 3) doses.

Grupos:

PBS

LipL32 + Surf But

LipL32 + Surf USP

LipL32 + Surf Com

Exp II

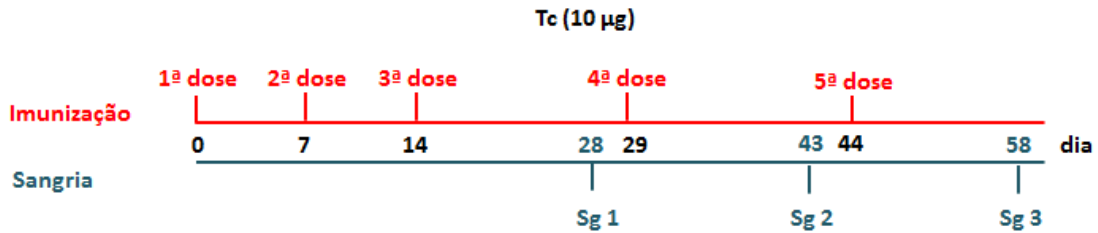


Figura 8 – Exp II: Protocolo de imunização e sangria. Os animais receberam cinco doses Tc da LipL32, as três primeiras com intervalo de uma semana e a quarta e quinta com intervalo de duas semanas. O antígeno foi coadministrado com três diferentes surfactantes: Surf But 0,25%; Surf USP 1% e Surf Com 1%. Os animais foram sangrados 14 dias após a terceira (Sg 1), quarta (Sg 2) e quinta (Sg 3) doses.

Exp III

Foram administradas três doses Tc de LipL32, as duas primeiras em intervalo semanal e a última em intervalo quinzenal (Figura 9), tendo sido utilizados como emolientes/adjuvantes o Surf But (1% ou 2% em PBS) e PEG (0,5% ou 1% em PBS), em pré-tratamento por 10 minutos antes da aplicação do antígeno. Os animais foram sangrados uma semana após a segunda dose (Sg 1) e 14 dias após a terceira (Sg 2).

Grupos:

PBS

LipL32/Surf But 1%

LipL32/Surf But 2%

LipL32/PEG 0,5%

LipL32/PEG 1%

Exp III

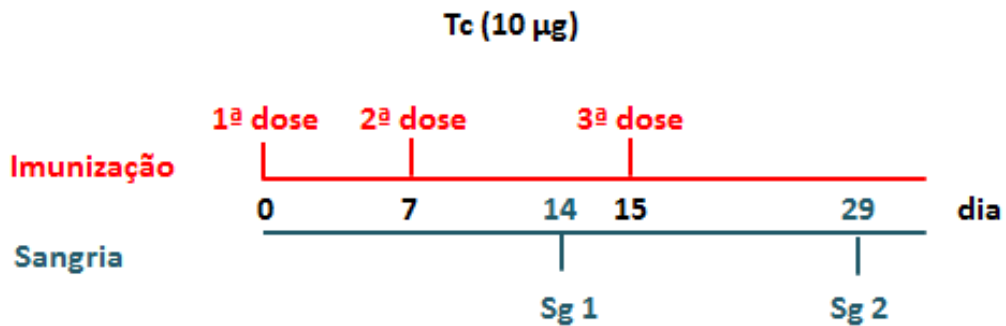


Figura 9 – Exp III: Protocolo de imunização e sangria. Os animais receberam três doses Tc da LipL32, as duas primeiras em intervalo semanal e a última em intervalo quinzenal, tendo sido utilizados como emolientes/adjuvantes o Surf But 1 % ou 2% e PEG 0,5% ou 1%, em pré-tratamento por 10 minutos antes da aplicação do antígeno. Os animais foram sangrados uma semana após a segunda dose (Sg 1) e 14 dias após a terceira (Sg 2).

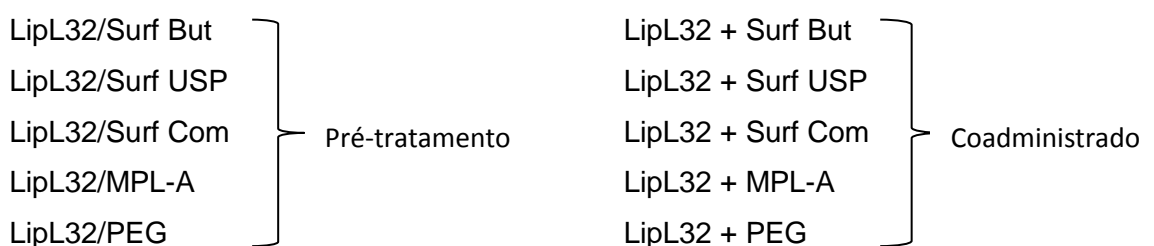
Exp IV

Foram administradas três doses Tc da LipL32 em intervalos semanais, com os diferentes emolientes/adjuvantes, coadministrada com o antígeno ou em pré-tratamento local: Surf But 1%, PEG 0,5%, MPL-A (20 µg/dose). 48 dias após a última dose Tc foi administrada uma dose subimunizante de LipL32 por via intradérmica (ID) (1 µg/200 µl) e 36 dias após, foi aplicado um reforço subimunizante Tc de LipL32 (1 µg/20 µl) (Figura 10). Foi feito um controle da dose subimunizante ID, com um grupo imunizado apenas com uma dose ID de LipL32 (1 µg). Os animais foram sangrados 14 dias após a terceira dose Tc (Sg 1), 22 dias após a dose ID (Sg 2) e 14 dias após o reforço Tc (Sg 3).

Grupos:

Controle intradérmico: LipL32 1 µg (Controle ID)

PBS



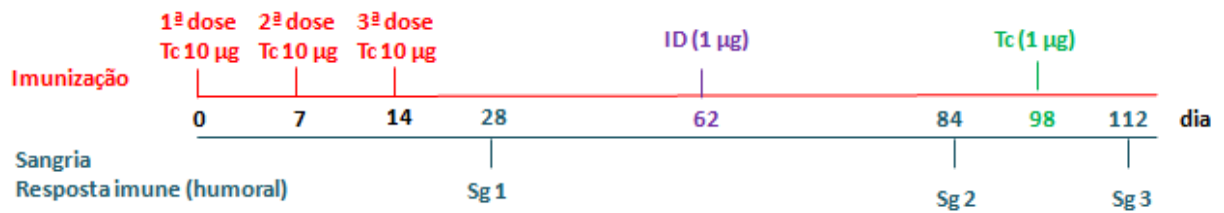
Exp IV

Figura 10 – Exp IV: Protocolo de imunização e sangria. Os animais receberam três doses Tc da LipL32 em intervalo semanal. Foram utilizados Surf But 1%, PEG 0,5% e MPL-A (20 µg/dose) coadministrado com o antígeno ou em pré-tratamento local por 15 minutos, antes da aplicação do antígeno. 48 dias após a última dose Tc foi administrada uma dose subimunizante de LipL32 por via ID (1 µg/ 200 µl) e 36 dias após essa dose foi aplicada uma dose Tc de LipL32 (1 µg/ 20 µl). Os animais foram sangrados 14 dias após a terceira dose Tc (Sg 1), 22 (Sg 2) dias após o reforço ID e 14 dias após o reforço Tc (Sg 3).

Exp V

Foram administradas três doses Tc de LipL32 (10 µg/dose), com intervalos semanais. Uma dose subimunizante ID (1 µg/ 200 µl) foi administrada 56 dias após a última dose Tc, e após mais 36 dias foi administrada uma dose subimunizante Tc (1 µg/ 20 µl) de LipL32 (Figura 11). Foram testados os diferentes emolientes/adjuvantes, formulados individualmente com o antígeno: Surf But 1%, PEG 0,5%, MPL-A (20 µg/dose); ou associados: Surf But 1% + PEG 0,5%; MPL-A (20 µg/dose) + PEG 0,5%. Foi feito um controle da imunização subimunizante ID, com um grupo imunizado apenas com uma dose ID de LipL32 (1 µg). Os animais foram sangrados 14 dias após a terceira dose Tc (Sg 1), 19 dias após o reforço ID (Sg 2) e 14 dias após o reforço Tc (Sg 3).

Em cada grupo foram colhidas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) para avaliação da resposta imune celular, 54 dias após a terceira dose Tc, 14 dias após o reforço ID e 19 dias após o reforço Tc.

Grupos:

Controle intradérmico LipL32 1 µg (Controle ID)

PBS

LipL32 + Surf But

LipL32 + MPL-A

LipL32 + PEG

LipL32 + PEG + Surf But

LipL32 + PEG + MPL-A

Exp V

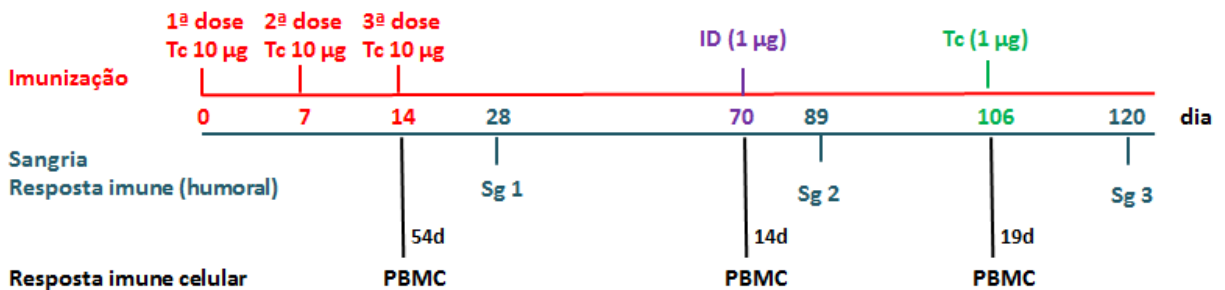


Figura 11 – Exp V: Protocolo de imunização, sangria e resposta imune celular. Os animais receberam três doses Tc com 10 µg de LipL32, com intervalos semanais. Uma dose subimunizante (1 µg de LipL32) ID foi administrada 56 dias após a última dose Tc, e 36 dias após a ID foi administrada uma dose subimunizante Tc. Os animais foram sangrados 14 dias após a terceira dose Tc (Sg 1), 19 dias após o reforço ID (Sg 2) e 14 dias após o reforço Tc (Sg 3), para avaliação de IgG sérica. Foram colhidas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) para avaliação da resposta imune celular, 54 dias após a terceira dose Tc, 14 dias após o reforço ID e 19 dias após o reforço Tc.

Exp VI

Foram utilizados camundongos C57BL-6, em dois protocolos de imunização (Exp VI A e B). Inicialmente foram administradas três doses Tc com 10 µg de LipL32, em intervalo semanal. Após o esquema Tc os animais foram divididos em dois grupos: no primeiro (Figura 12 - Exp VI A) as três doses Tc foram seguidas de uma dose ID subimunizante de LipL32 (1 µg/dose), 94 dias após a terceira dose Tc. No segundo (Figura 12 - Exp VI B), a dose ID subimunizante foi dada 15 dias após a última Tc e um reforço Tc subimunizante (1 µg/dose) foi administrado 78 dias após a dose ID. Foi feito um controle da dose subimunizante ID, com um grupo imunizado apenas com uma dose ID de LipL32 (1 µg).

A LipL32 foi coadministrada com Surf But (1% em PBS) ou MPL-A (20 µg/dose).

Para avaliação da resposta imune humoral, no Exp VI A os animais foram sangrados 14 dias após a terceira dose Tc (Sg 1) e 18 dias após a dose ID (Sg 2); e no Exp VI B, 14 dias após a terceira dose Tc (Sg 1), 14 dias após a dose ID (Sg 2) e 18 dias após o reforço Tc (Sg 3).

Para avaliação da resposta imune celular no Exp VI A (Figura 12), após a terceira dose Tc foram colhidas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) depois de 56 dias; sangue total depois de 77 dias e esplenócitos, 18 dias após o reforço intradérmico.

No Exp VI B, a resposta imune celular foi avaliada após a dose subimunizante ID, em PBMC depois de 48 dias e em sangue total depois de 77 dias; e 18 dias depois do reforço subimunizante transcutâneo, em esplenócitos.

Para avaliação da resposta inata foram colhidas amostras de sangue total, 96 dias após a terceira dose Tc (Exp VI A) e 84 dias após a dose subimunizante ID (Exp VI B).

Grupos:

Controle intradérmico LipL32 1 µg (Controle ID)

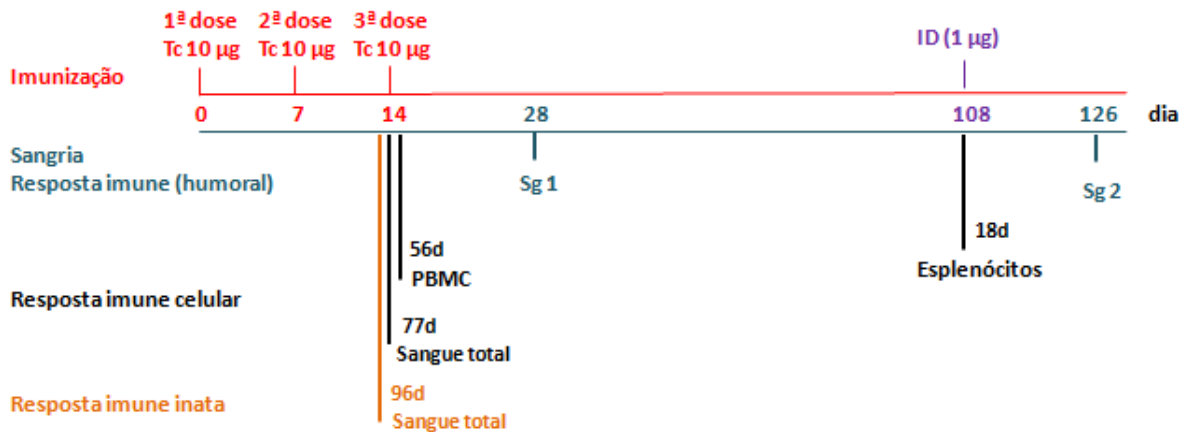
PBS

LipL32

LipL32 + Surf But

LipL32 + MPL-A

Exp VI A



Exp VI B

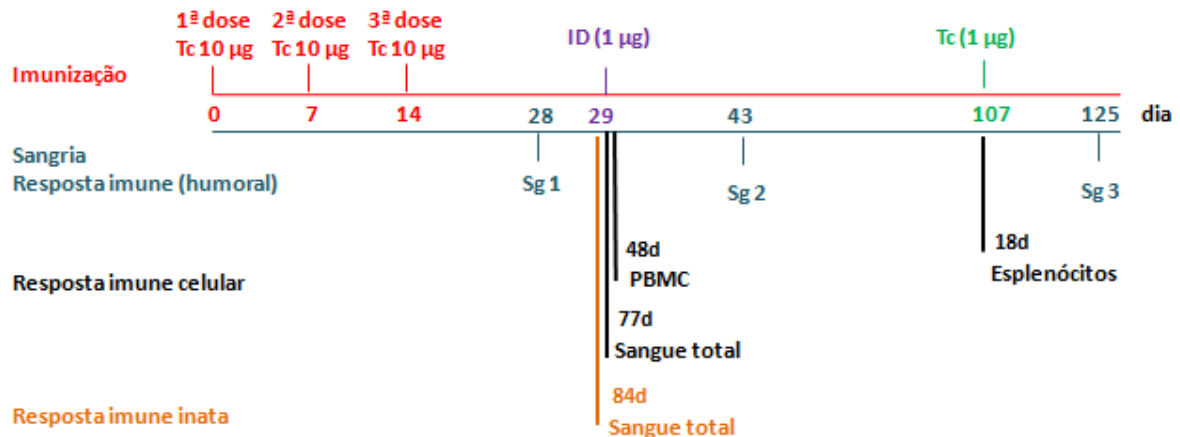


Figura 12 – Exp VI: Protocolo de imunização, sangria, resposta imune celular e resposta inata. Os animais receberam três doses Tc com 10 µg de LipL32, em intervalo semanal e uma dose ID de 1 µg de LipL32, 94 dias após a última dose Tc (Exp VI A) ou três doses Tc com 10 µg de LipL32, em intervalo semanal, uma dose ID, 15 dias depois da última Tc e um reforço Tc de 1 µg de LipL32, 78 dias depois da dose ID (Exp VI B). Para avaliação da resposta imune humoral, no Exp VI A os animais foram sangrados 14 dias após a terceira dose Tc (Sg 1) e 18 dias após a dose ID (Sg 2); e no Exp VI B, 14 dias após a terceira dose Tc (Sg 1), 14 dias após a dose ID (Sg 2) e 18 dias após o reforço Tc (Sg 3). Para avaliação da resposta imune celular foram colhidas células mononucleares do sangue periférico (PBMC), 56 dias após a terceira dose Tc (Exp VI A) e 48 dias após a dose ID (Exp VI B); esplenócitos, 18 dias após o reforço ID (Exp VI A) e após o reforço Tc de 1 µg (Exp VI B); e sangue total, 77 dias após a terceira dose Tc (Exp VI A) e 77 dias após a dose o reforço ID (Exp VI B). Para avaliação da resposta inata foram colhidas amostras de sangue total, 96 dias após a terceira dose Tc (Exp VI A) e 84 dias após o reforço ID (Exp VI B).

4.6 Avaliação de resposta imune humoral e secretória

Os animais dos grupos teste e controles foram sangrados por punção retrorbital e os soros armazenados a - 20 °C, para avaliação de anticorpos IgG anti-LipL32, por ensaio imunoenzimático (ELISA).

Para avaliação de IgA anti-LipL32 por ELISA, foram colhidas as fezes e a saliva dos animais, nos grupos testes e controles. As fezes foram coletadas em tubos “*ependorf*”, em amostras individuais, pesadas e mantidas em gelo, adicionando-se tampão PBS pH 7,2, em volume correspondente a 4 vezes o seu peso. Cada amostra foi homogeneizada, centrifugada a 4 °C, a 7000 rpm, por 7 minutos e o sobrenadante foi recolhido e armazenado a - 20 °C, até a utilização no ELISA.

Para a coleta de saliva, os animais foram previamente injetados intraperitonealmente com solução de 1% de pilorcapina em solução fisiológica. Após 5 minutos, foi colhida a saliva, com micropipetas. As amostras foram mantidas no gelo durante todo o procedimento de coleta e depois armazenadas a - 20 °C, para serem avaliadas por ELISA, contra a LipL32.

4.6.1 Ensaio imunoenzimático – ELISA

O *coating* da microplaca para ELISA foi feito com a proteína LipL32 (10 µg/ml) com incubação a 4 °C, *overnight*. No dia seguinte, a microplaca foi colocada em estufa a 37 °C, por 30 minutos, e a seguir lavada 4 vezes com PBS/Tween 20 a 1%. Foi adicionado o bloqueio (Leite desnatado Molico® a 10% em água destilada), seguido de incubação a 37 °C, por 1 hora, e nova etapa de lavagem. Os soros dos camundongos imunizados e dos controles foram adicionados em diluição seriada em PBS/BSA (1 : 10 a 1 : 1280), seguido de incubação a 37 °C, por 2 horas. Após nova etapa de lavagem, foi adicionado o conjugado, *Goat anti-mouse* IgG/peroxidase (Sigma-Aldrich), diluído em PBS/BSA (1 : 5.000). As placas foram incubadas, a 37 °C, por 1 hora, e após nova etapa de lavagem foi adicionado o substrato (OPD 4% em tampão fosfato citrato, pH 5,0 (citrato de sódio 0,1 M, fosfato de sódio monobásico 0,2 M) e 2,5 µl H₂O₂ (50 µl/ poço). As placas foram mantidas a

temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 30 minutos, e a reação foi interrompida por adição de 25 µl de H₂SO₄ 4M.

A leitura da absorbância foi realizada em leitora de ELISA modelo Labsystems Uniscience MultiScan EX, a 492 nm. O valor do branco foi descontado das leituras das amostras ($DO_{492nm} \geq 0.1$).

4.7 Avaliação da resposta imune celular em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) dos animais imunizados e controles

O sangue de dois camundongos por grupo dos animais imunizados e controles dos protocolos descritos no Exp V (MM) e Exp VI (MM) foi colocado em tubo heparinizado e diluído volume a volume em PBS estéril despirogenizado. 2 ml dessa solução foram cuidadosamente adicionados a 2 ml de Ficoll-Paque em tubo cônico de 15 ml. Os tubos foram centrifugados a 400 xg, por 30 minutos, a temperatura ambiente. Sob esses procedimentos as PBMCs concentram-se em um anel opaco na interface entre o Ficoll-Paque e o plasma e as hemácias e leucócitos polimorfonucleares (PMNs) depositam-se no fundo do tubo, abaixo do gradiente de Ficoll-Paque. Sem remover o fluido de sobreposição, foi inserida cuidadosamente uma ponteira de 1 ml esterilizada, até alcançar o anel de PBMC, que foi removido cuidadosamente e transferido para um novo tubo de 15 ml. O volume foi completado para 12 ml com PBS estéril e as PBMCs foram ressuspendidas e centrifugadas a 200 xg, durante 10 minutos, a temperatura ambiente. O sobrenadante de cada tubo foi descartado e o pellet celular (PBMCs) ressuspendido novamente em 12 ml de PBS estéril, a temperatura ambiente. O sobrenadante de cada tubo foi descartado e as PBMCs foram ressuspendidas em 2 ml de RPMI completo (RPMI incompleto + polimixina B 10 µg/ml + gentamicina 50 µg/ml + 10% de soro fetal bovino). Foi realizada a contagem das células com trypan blue, na diluição 1 : 20.

Em placas de cultivo de 24 poços, foram colocados 500 µl da suspensão de células em cada poço, na concentração de 2×10^6 células/ml. As células foram estimuladas com LipL32 (5 µg/ poço ou 10 µg/ poço) diluída em 500 µl de meio RPMI completo. Foi feito o controle negativo, com células não estimuladas, adicionando-se só o meio de cultivo. O controle da viabilidade celular foi feito por estímulo inespecífico de mitose, com Concanavalina A (Con A) (5 µg/poço). As

placas foram incubadas a 37 °C, com 5% CO₂, e as coletas dos sobrenadantes da cultura foram realizadas após 3 horas, 8 horas e 24 horas. No dia da coleta, as placas de cultura foram centrifugadas a 2000 rpm, por 20 minutos, a 4 °C, e os sobrenadantes foram coletados e mantidos a - 20 °C, até o uso.

4.8 Avaliação da resposta imune celular em amostras de sangue total de camundongos imunizados e controles

Os animais foram sangrados por punção retroorbital. Foi feito um *pool* do sangue dos 6 animais de cada grupo (2 ml), em tubo heparinizado, mantido no gelo até o uso.

125 µl de cada *pool* de sangue foram adicionados aos tubos com os estímulos (125 µl de LipL32 - 5 µg/ml ou 10 µg/ml em RPMI). Como controle sem estímulo foi utilizado o meio de cultivo, sendo utilizada Con A (5 µg/ml), como estímulo inespecífico de mitose celular.

Os tubos foram homogeneizados suavemente e mantidos a 37 °C, com 5% de CO₂, por 48 horas, 72 horas ou 6 dias. No momento da coleta, foram adicionados 50 µl de triton X-100 a 5% para promover a lise das células, os tubos foram agitados em vortex e armazenados a - 80 °C até o uso.

Para a análise das citocinas produzidas após os estímulos, o material foi centrifugado a 4000 rpm, 6 minutos, 4 °C. Os sobrenadantes foram coletados em *ependorf* e mantidos a - 20 °C, até o seu uso. Foi utilizado o *kit* CBA (BD) Th1 Th2 para camundongos, para quantificação das citocinas IL-2, IFN-γ e TNF-α (Th1) e IL-4 e IL-5 (Th2) em uma mesma amostra, para análise por citometria de fluxo (*Fluorescence Activated Cell Sorting* - FACs).

4.8.1 Ensaio de citometria de fluxo

O *kit* CBA (BD) (*cytometric beads array*) contém cinco populações de *beads* conjugadas com anticorpos de captura específicos para cada citocina, e com intensidades de fluorescência distintas, que serão avaliadas por FACs. No CBA, as *beads* de captura das citocinas são misturadas com o anticorpo de detecção conjugado com o fluorocromo PE (*phicoeritrina*), e depois incubadas com as

amostras, por ensaio em “sanduíche”. Foi utilizada uma microplaca de poliestireno, tendo sido adicionados, em cada poço, 6,5 µl de amostra em 18,5 µl em tampão diluente (diluição 1 : 4), 25 µL da mistura de *beads* e 25 µl do reagente de detecção PE. O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção da curva-padrão das *beads*. A microplaca foi incubada por duas horas, em temperatura ambiente, ao abrigo da luz e a seguir centrifugada a 200 xg, 4 °C, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado com 200 µl de tampão diluente e transferido para tubo cônico de poliestireno, não estéril, específico para leitura no FACS. Os resultados foram gerados em gráficos e tabelas utilizando-se o *software CellQuest* (BD) e a quantidade de citocinas foi expressa em pg/ml.

4.9 Avaliação da imunidade celular em cultivo de esplenócitos de camundongos imunizados e controles

Grupos de animais teste e controles foram eutanasiados com CO₂. O baço de cada animal foi extraído e transferido para tubo cônico de 15 ml, contendo 3 mL de RPMI incompleto estéril (RPMI + 2 g NaHCO₃ + HEPES 0,1%). Esse conteúdo foi transferido para homogeneizador, macerado e armazenado em tubo cônico de 15 ml, no gelo, durante todo o procedimento.

Os tubos foram centrifugados a 1100 rpm, por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* homogeneizado suavemente. Foi adicionado 1 ml de água estéril, homogeneizando-se suavemente por 10 segundos para lise das hemácias, e o volume foi completado com RPMI incompleto até 12 ml.

Os tubos foram centrifugados novamente, os sobrenadantes desprezados e o *pellet* ressuscitado em 1 ml de RPMI completo estéril (RPMI incompleto + polimixina B 10 µg/ml + gentamicina 50 µg/ml + 10% de soro fetal bovino), homogeneizando-se suavemente. 50 µL de cada suspensão foram adicionados em *ependorf* contendo 950 µL de PBS. Foram coletados 10 µL dessa suspensão, transferindo-se para outro *ependorf* contendo 10 µL de Trypan Blue 0,4%, para contagem das células em câmara de Neubauer.

Em placa de cultivo de 24 poços, foram colocados 500 µl/poço da suspensão de células (2 x 10⁶ células/ml). As células foram estimuladas com LipL32 (5 µg/ poço ou 10 µg/ poço em meio RPMI completo). Como controle de células não estimuladas

foi utilizado o meio de cultivo, e como estímulo inespecífico de mitose celular, Con A (5 µg/ poço).

As placas foram incubadas a 37 °C com 5% CO₂ e as coletas dos sobrenadantes da cultura foram realizadas após 48 h e 72 h. Os sobrenadantes foram coletados e mantidos a - 20 °C, até o uso, para posterior análise de citocinas por FACS.

Na análise de citocinas por citometria de fluxo dos sobrenadantes de cultivo dos esplenócitos, foi utilizado o mesmo procedimento descrito no item 4.8.1, com *kit* CBA BD Th1 Th2.

4.10 Avaliação da resposta inata em células de sangue total de camundongos C57BL-6 imunizados com LipL32 por via transcutânea

Para se avaliar se a imunização por via transcutânea com a proteína LipL32 interfere na resposta inata a antígenos não relacionados, células de sangue total dos animais imunizados e controles foram estimuladas *in vitro* com vacina BCG. Foram incluídos os mesmos grupos experimentais do Exp VI, em procedimento semelhante ao descrito no item 4.8, utilizando-se como estímulo BCG (10³ ou 10⁵ células/ml). Como controle negativo foi utilizado o meio de cultivo, e Con A (5 µg/ml), como estímulo inespecífico de mitose celular.

Para a análise das citocinas produzidas após os estímulos, o material foi centrifugado a 4000 rpm, a 4 °C, por 7 minutos. Os sobrenadantes foram coletados em *ependorf* e mantidos a - 20 °C, até o uso. Foi utilizado o *kit* CBA inflamatório (BD) para camundongos, para quantificação das citocinas IL-6, IL-10, MCP-1, IFN-γ e TNF-α por citometria de fluxo (FACs), conforme descrito no item 4.8.1.

4.11 Análise estatística dos resultados

Para análise estatística dos resultados foi utilizado o teste não paramétrico Mann-Whitney para comparação entre dois grupos. Também foi utilizado o teste não paramétrico ANOVA, com Teste de Tukey, no qual é feita a comparação de médias de, pelo menos, dois grupos diferentes. Os dados obtidos foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de p foi menor que 0,05 (p<0,05).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A administração tópica de vacinas vem ganhando espaço como técnica de imunização, devido a vários fatores. Alguns são de ordem fisiológica, já que a imunização transcutânea tem como alvo o ambiente imunologicamente rico da pele (GLENN et al., 2000) e elimina o metabolismo hepático, mantendo a liberação do antígeno por período de tempo mais prolongado (KARANDE; MITRAGOTRI, 2009). Outros são de ordem prática e de segurança, incluindo a facilidade de manipulação e aceitação pelo público-alvo, principalmente entre idosos e crianças (JACOBSON et al., 2001; MOYLETT; HANSON, 2004; NIR et al., 2003). A vacinação tradicional, apesar de eficaz na indução da resposta imune, apresenta diversas desvantagens relacionadas à segurança, o que tem levado à consideração de novas estratégias, estimuladas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), a Aliança Global de Vacinas e Imunização e Centros de Controle de Doenças (CDC) (GIUDICE; CAMPBELL, 2006; KERSTEN; HIRSCHBERG, 2007; MITRAGOTRI, 2005; O'HAGAN; RAPPUOLI, 2004).

A vacinação “livre de agulhas” tem surgido como prioridade global, devido à reutilização ou ao descarte inapropriado dos instrumentos de injeção. A principal preocupação é o risco de transmissão de doenças infecciosas entre pacientes, devido à reutilização de agulhas, ou entre os pacientes e os prestadores de serviços de saúde, devido a picadas acidentais com agulha (DICKO et al., 2000; MILLER; PISANI, 1999; PRÜSS-USTUN; RAPITI; HUTIN, 2005; SIMONSEN et al., 1999; TRIM; ELLIOTT, 2003).

Uma pesquisa patrocinada pela OMS revelou que pelo menos 50% de todas as injeções administradas na Ásia, África Subsaariana e a antiga República Soviética foram consideradas inseguras, por reutilização da seringa ou da agulha, sem esterilização desses materiais, expondo os pacientes ao risco de infecção por hepatite, HIV, ou outros patógenos transmissíveis pelo sangue (SIMONSEN et al., 1999). Além disso, esse tipo de manipulação exige certo grau de especialização técnica, o que pode representar um problema onde a supervisão clínica for indisponível ou limitada (FINE, 2004).

Dessa forma, a imunização transcutânea, através da aplicação tópica da formulação vacinal na pele, apresenta algumas vantagens, como facilidade na

administração e menor grau de invasividade, além de ser praticamente indolor e não estar associada a doenças veiculadas por fluidos biológicos e agulhas contaminadas, o que acarreta maior adesão da população (BREAU et al., 2001; MILLER; PISANI, 1999; NIR et al., 2003). É uma via eficiente na indução robusta de resposta imune humoral (FUJITA et al., 2005; GLENN et al., 2003; TADA et al., 2003) e de mucosas (BERRY et al., 2004), tendo-se mostrado capaz de levar a títulos mais elevados de anticorpos IgG específicos ao antígeno, comparativamente a outras vias de imunização, como intranasal, intramuscular, sublingual ou intravaginal (CHO et al., 2010), o que pode ser explicado pelo envolvimento de diferentes células na resposta imunológica da pele, tanto inata quanto adaptativa. Na epiderme são encontrados queratinócitos e células de *Langerhans* (LCs); na derme, os fibroblastos, células dendríticas (DCs) e mastócitos; e nos linfonodos, os linfócitos B e T. Os queratinócitos são os principais constituintes da epiderme, compondo cerca de 90% da população celular epidérmica, secretando ampla variedade de citocinas, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos em resposta a agentes patogênicos e antígenos (KANDA; WATANABE, 2008; MATZINGER, 2002; SCHRODER et al., 2006; SHIRAKI et al., 2006). As DCs são as APCs mais importantes na pele, além de serem uma ponte entre a resposta inata e a adaptativa. As DCs residentes e macrófagos exercem seu papel de sentinela, processando e apresentando potenciais patógenos invasores da pele para outras células do sistema imune (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998).

A leptospirose é uma zoonose com ampla distribuição geográfica, e sua importância em saúde pública justifica o uso de vacinas contra a *Leptospira* em populações de risco. A existência de mais de 230 sorovares entre as leptospirosas patogênicas e sua distribuição endêmica dificulta o desenvolvimento de vacinas com ampla cobertura. Nesse sentido, o desenvolvimento de estratégias vacinais que facilitem a apresentação de antígenos altamente imunogênicos e conservados de *Leptospira* é de grande interesse nas tentativas de prevenção da doença. Proteínas de membrana externa da bactéria, altamente imunogênicas, poderiam ser candidatas a novas formulações vacinais.

A LipL32, também chamada *haemolysis associated protein-1* (Hap-1) é a principal proteína de membrana externa das espécies patogênicas de *Leptospira* (CULLEN et al., 2005), altamente conservada e expressa durante a infecção e antigenicamente dominante na resposta imune humoral contra a leptospirose em humanos (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; GUERREIRO et al., 2001; HAAKE et al., 2000; HOKE et al., 2007; NALLY et al., 2007).

Alguns autores demonstraram que a LipL32 é capaz de induzir imunidade protetora contra leptospirose em chinchila, quando expressa em adenovírus (BRANGER et al., 2001) ou em uma vacina de DNA, embora não tenha apresentado efeito protetor quando produzida como proteína recombinante em *E. coli* e administrada como vacina de subunidade (BRANGER et al., 2005).

Seixas et al. (2007a, b) avaliaram três estratégias de imunização contra leptospirose utilizando LipL32 como modelo vacinal: uma vacina de subunidade com LipL32 recombinante purificada, um vetor recombinante de BCG (rBCG) expressando LipL32 e uma vacina de DNA. As três formulações vacinais foram capazes de induzir níveis elevados de anticorpos anti-LipL32 em camundongos Balb/c, que reconheceu a LipL32 nativa de *L. interrogans* por *Western Blot* e por imunofluorescência indireta. Além disso, um anticorpo monoclonal anti-LipL32 mostrou-se capaz de inibir o crescimento de *Leptospira in vitro*, o que indica potencial de proteção atribuído à proteína. Tais resultados mostraram que o rBCG expressando LipL32 pode ser considerado um vetor de expressão conveniente para induzir resposta imune de longa duração à proteína, reforçando-a como candidata vacinal promissora contra a leptospirose, quando apresentada ao sistema imune por um sistema de entrega adequado.

Dos vários modelos animais estabelecidos para leptospirose, os *hamsters* e cobaias são comumente usados devido à sua alta susceptibilidade à infecção pela leptospira. Esses animais apresentam as características clínicas da doença observadas na leptospirose severa em humanos (HAAKE, 2006) e têm sido úteis no estabelecimento da virulência e grau de infectividade das cepas de leptospira, na avaliação dos danos teciduais causados por leptospirose, na triagem de potenciais vacinas e no teste de drogas terapêuticas (GRIFFITH; HOSPENTHAL; MURRAY, 2006; HAAKE, 2006; NALLY et al., 2004). Ratos e camundongos são considerados

hospedeiros de manutenção, uma vez que são portadores assintomáticos da leptospirose, com eliminação da bactéria de todos os órgãos, exceto rins (ATHANAZIO et al., 2008).

Neste trabalho investigamos a imunogenicidade da proteína recombinante LipL32, apresentada ao sistema imune de murinos, por via transcutânea, numa tentativa de priorizar a entrada do antígeno pela mesma via da infecção nativa. Também foi avaliada a resposta inata *in vitro* de células sanguíneas dos animais imunizados, a um antígeno não relacionado, a vacina BCG. A LipL32 foi testada em formulações com diferentes adjuvantes e/ou emolientes. Foram utilizados como modelo animal camundongos Balb/c e C57BL-6.

5.1 Produção de LipL32 recombinante

As várias alíquotas obtidas em cada etapa do processo de obtenção da proteína recombinante LipL32, desde o cultivo bacteriano até a purificação por cromatografia de afinidade, foram analisadas por SDS-PAGE 12% (Figura 13). A LipL32 possui peso molecular de 32KDa, sendo observada em grande quantidade no gel de SDS-PAGE.

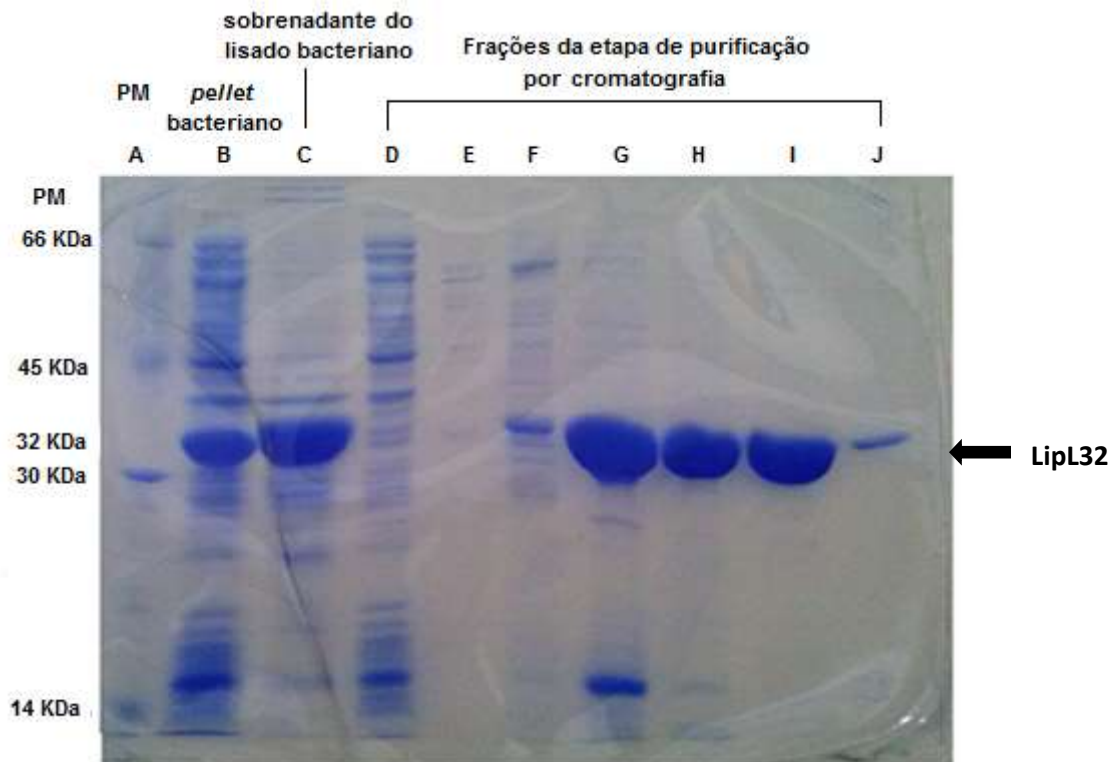


Figura 13 – Gel de SDS-PAGE das frações de purificação da proteína LipL32. Colunas A (Peso Molecular – PM), B (*Pellet* bacteriano), C (Sobrenadante do lisado bacteriano), D a J (Frações da etapa de purificação, sendo D fração mais impura e J fração **Figura 13** – Gel de SDS-PAGE das frações de purificação da proteína LipL32purificada).

Para determinar a concentração final da proteína LipL32 após as etapas de purificação foram avaliadas cinco frações de eluição da proteína com gradiente de imidazol contra curva padrão de BSA. A concentração final de LipL32 purificada foi de 1,5 mg/ml.

5.2 Avaliação da resposta humoral à proteína recombinante LipL32, em camundongos Balb/c imunizados por via subcutânea

Para ser utilizado como soro-padrão para os experimentos subsequentes, cinco camundongos foram imunizados com LipL32 (10 µg/ 200 µl) por via subcutânea, em duas doses com intervalo semanal. A dosagem de IgG sérica foi avaliada 15 dias após a segunda dose.

Foram observados títulos significativos de anticorpos contra a proteína nos cinco animais imunizados (títulos ≥ 640) (Figura 14).

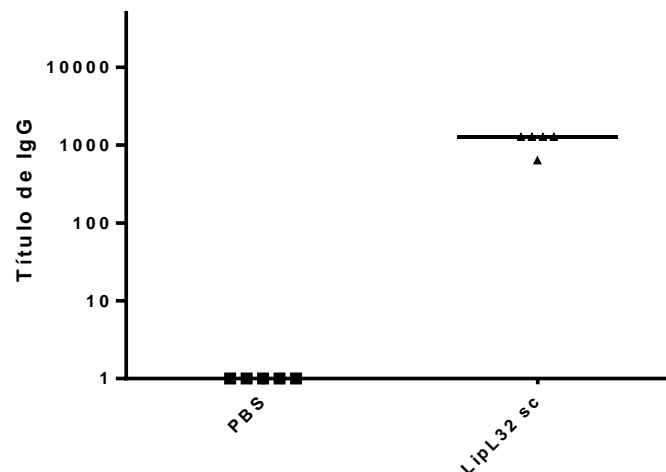


Figura 14 - Avaliação de IgG anti-LipL32 em soro de camundongos Balb/c imunizados por via subcutânea com LipL32 (10 µg/ 200 µl).

5.3 Resposta imune humoral induzida em camundongos Balb/c, após imunização transcutânea com LipL32

A soro conversão contra o antígeno, em modelo murino, foi avaliada em seis diferentes experimentos, variando-se o esquema de imunização, a formulação vacinal (utilizando emolientes e/ou adjuvantes) e a linhagem de camundongos.

Exp I – Imunização transcutânea com LipL32, sem emolientes

Em camundongos Balb/c foram administradas três doses da proteína recombinante LipL32 (10 µg/dose), pela via Tc, sob dois protocolos de imunização (Figura 7): Exp I A, nos dias 0, 7 e 14 e Exp I B, nos dias 0, 25 e 39. Em cada um dos protocolos foram avaliados diferentes locais de aplicação, região abdominal (ab) ou face interna da orelha (or), ficando assim distribuídos os diferentes grupos: Exp I Aab (Protocolo A, abdomen) e Exp I Aor (Protocolo A, orelha); Exp I Bab (Protocolo B, abdomen) e Exp I Bor (Protocolo B, orelha). A dosagem de IgG sérica foi feita 7 dias após a segunda dose (Sg 1) e 14 dias após a terceira (Sg 2).

Após imunização Tc na região abdominal, observou-se maior número de animais respondedores do que nos grupos imunizados na orelha, com títulos de anticorpos aparentemente mais elevados após a terceira dose (Figura 15). Embora

não tenham sido obtidos níveis de anticorpos significativos em relação ao grupo controle, a melhor tendência de resposta ao antígeno foi com a administração abdominal, o que nos levou à escolha deste local para a administração Tc nos demais experimentos. Como também não se notou diferença significativa entre os dois esquemas de imunização, nos experimentos seguintes optamos pela imunização Tc em doses semanais.

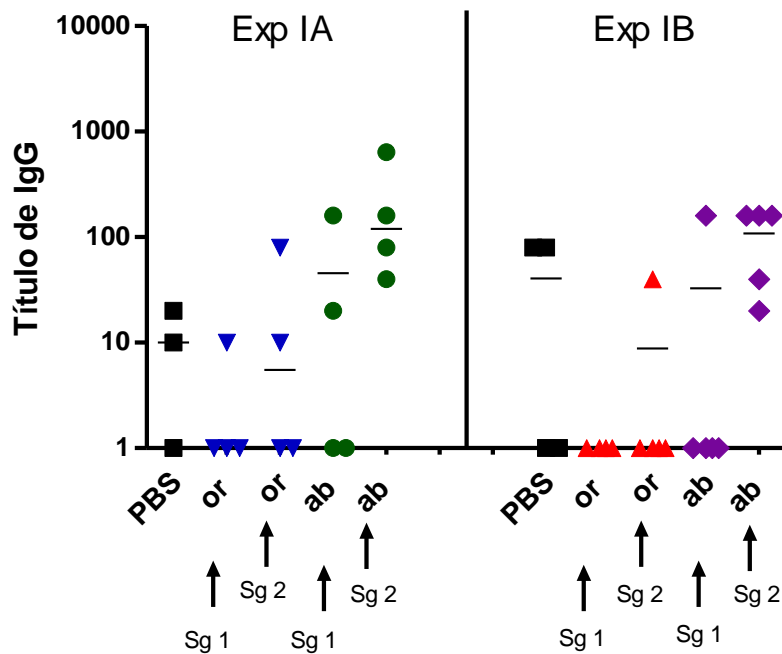


Figura 15 - Exp I: Avaliação de IgG anti-LipL32 em soro de camundongos Balb/c imunizados por via Tc com LipL32. Exp I Aor (Protocolo A, orelha) e Exp I Aab (Protocolo A, abdome); Exp I Bor (Protocolo B, orelha) e Exp I Bab (Protocolo B, abdome). Foram administradas 3 doses de LipL32: Protocolo A: dias 0,7 e 14 e Protocolo B: nos dias 0, 25 e 39. A dosagem de IgG sérica foi feita 7 dias após a segunda dose (Sg 1) e 14 dias após a terceira (Sg 2).

Nos próximos experimentos utilizamos emolientes com potencial função adjuvante, com objetivo de facilitar a penetração do antígeno vacinal pela barreira da derme e de potencializar a indução da resposta imune ao antígeno, pela via Tc.

Exp II - Imunização transcutânea com LipL32, administrada com três diferentes surfactantes

Camundongos Balb/c receberam cinco doses Tc de LipL32, as três primeiras com intervalo de uma semana e a quarta e quinta com intervalo de duas semanas. O antígeno foi coadministrado com três diferentes surfactantes - Surf But, Surf USP e Surf Com. A produção de IgG sérica nos grupos imunizados e controles foi avaliada 14 dias após a terceira, quarta e quinta doses de vacina (Sg 1, 2 e 3, respectivamente) (Figura 8).

Foram observados níveis séricos basais de anticorpos em alguns animais de cada grupo, não significativamente diferentes dos obtidos no grupo controle, injetado com PBS (Figura 16). A adição dos surfactantes coadministrado com o antígeno não potencializou a resposta de anticorpos.

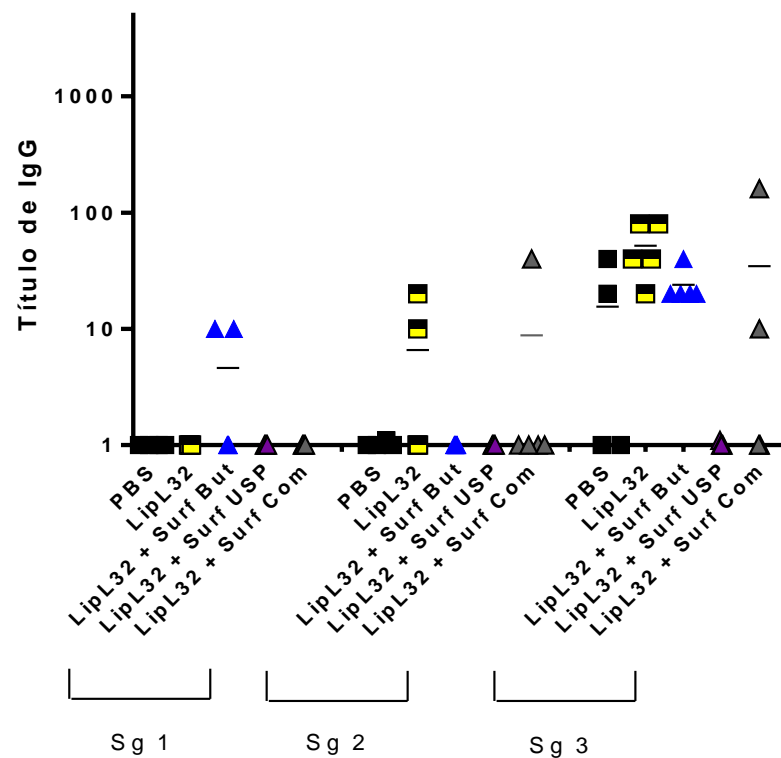


Figura 16 - Exp II: Avaliação de IgG anti-LipL32 em camundongos Balb/c após a terceira, quarta e quinta dose Tc de LipL32, com uso de surfactantes coadministrado com o antígeno.

Exp III - Imunização transcutânea com LipL32, após pré-tratamento local com surfactante ou PEG, antes da aplicação do antígeno

Em camundongos Balb/c, a LipL32 foi avaliada utilizando o Surf But e o PEG em duas diferentes concentrações (Surf But 1% e 2% e PEG 0,5% e 1%), como emolientes, em pré-tratamento local por 10 minutos, antes da aplicação do antígeno. Foram administradas três doses, as duas primeiras em intervalo semanal e a última em intervalo quinzenal. A produção de IgG sérica nos grupos imunizados e controles foi avaliada uma semana após a segunda dose (Sg 1) e 14 dias após a terceira (Sg 2) (Figura 9).

Foi observado, em relação aos experimentos anteriores, certo aumento na resposta ao antígeno, relativamente ao número de animais respondedores, embora não significativamente diferentes do grupo controle, injetado com PBS (Figura 17). Não foi possível observar diferença entre os grupos imunizados após pré-tratamento com surfactante ou PEG, independentemente das concentrações utilizadas.

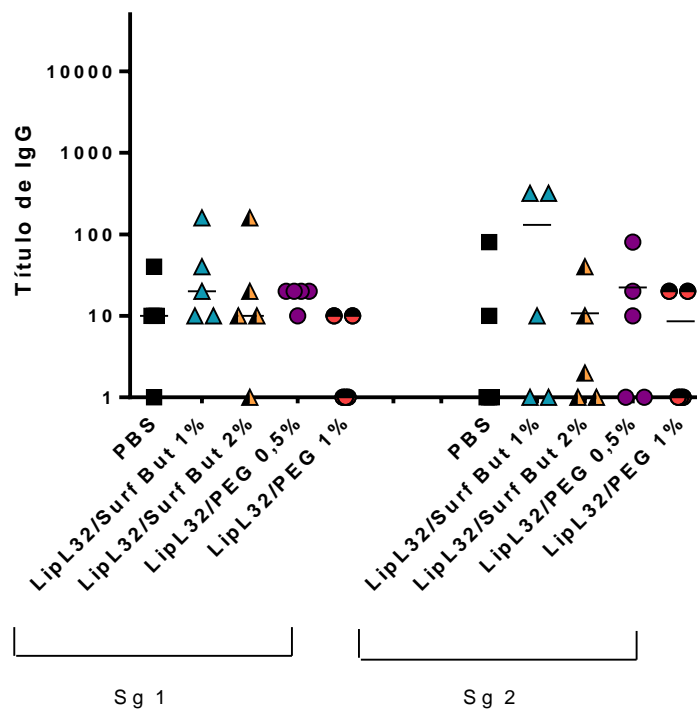


Figura 17 - Exp III: Avaliação de IgG anti-LipL32 em camundongos Balb/c após a segunda e terceira dose Tc de LipL32, com uso de Surf But (1% e 2%) ou PEG (0,5% e 1%) como pré-tratamento. A produção de IgG sérica nos grupos imunizados e controles foi avaliada uma semana após a segunda dose (Sg 1) e 14 dias após a terceira (Sg 2).

Exp IV - Imunização transcutânea com LipL32, coadministrado ou após pré-tratamento com surfactante, PEG ou MPL-A: efeito de reforço de doses subimunizantes de LipL32

Neste experimento repetimos as imunizações com LipL32 após pré-tratamento ou coadministrado com surfactante ou PEG e avaliamos também o monofosforil lipídeo A (MPL-A), como emoliente/adjuvante.

Em curva dose resposta ao antígeno por via Sc, obtida anteriormente em nosso laboratório (dados não mostrados), foi observado que 1 µg por dose de antígeno é insuficiente para evocar a resposta de anticorpos. Considerando que neste estudo esquemas de imunização com doses transcutâneas de 10 µg não estavam levando à produção robusta de anticorpos, mesmo em formulações com emolientes/adjuvantes (Exps I a III), testamos a administração de duas doses de reforço subimunizantes (LipL32 - 1 µg/dose): uma por via ID, 48 dias após o esquema Tc, e outra por via Tc, 36 dias após o reforço ID (Figura 10).

As três doses Tc de LipL32 (10 µg/dose) foram coadministradas com Surf But, MPL-A ou PEG (Figura 18) ou após pré-tratamento local com esses emolientes (Figura 19). As doses de reforço subimunizantes foram feitas apenas com o antígeno, tendo sido feito também um controle da dose subimunizante ID, com um grupo de animais que recebeu apenas uma dose ID de LipL32 (1 µg).

A produção de IgG sérica anti-LipL32 nos grupos imunizados e controles foi avaliada 14 dias após a terceira dose do esquema Tc (Sg 1), 22 dias após a dose subimunizante ID (Sg 2) e 14 dias após o reforço subimunizante Tc (Sg 3).

Embora a administração da dose subimunizante ID após as três doses Tc não tenha levado a aumento significativo nos níveis de anticorpos, tanto nos grupos imunizados com o antígeno coadministrado com os adjuvantes (Figura 18), quanto nos pré-tratados com os emolientes (Figura 19), houve um aumento médio nos títulos de anticorpos contra a proteína de 49,1 vezes com o antígeno coadministrado com os adjuvantes e de 44,9 vezes quando em pré-tratamento como emolientes, em relação ao mesmo grupo, após as três doses Tc.

Essa mesma dose de 1 µg de LipL32 por via ID levou apenas a níveis basais de anticorpos no grupo controle (Controle ID - Figuras 18 e 19).

A administração de reforço subimunizante Tc de 1 µg, embora tenha levado a aumento médio de 22,3 vezes em relação aos níveis observados no mesmo grupo, após o reforço ID, quando se utilizou as formulações coadministradas com o antígeno (Figura 18) e 13,1 vezes nos grupos de pré-tratamento (Figura 19), levou a aumento significativo apenas no grupo imunizado com a LipL32 coadministrada com o MPL-A (LipL32 + MPL-A) ($p = 0,038$) (Figura 18). Note-se que apenas após o esquema de imunização Tc + ID + Tc foram obtidos títulos significativos dos grupos teste em relação ao controle PBS.

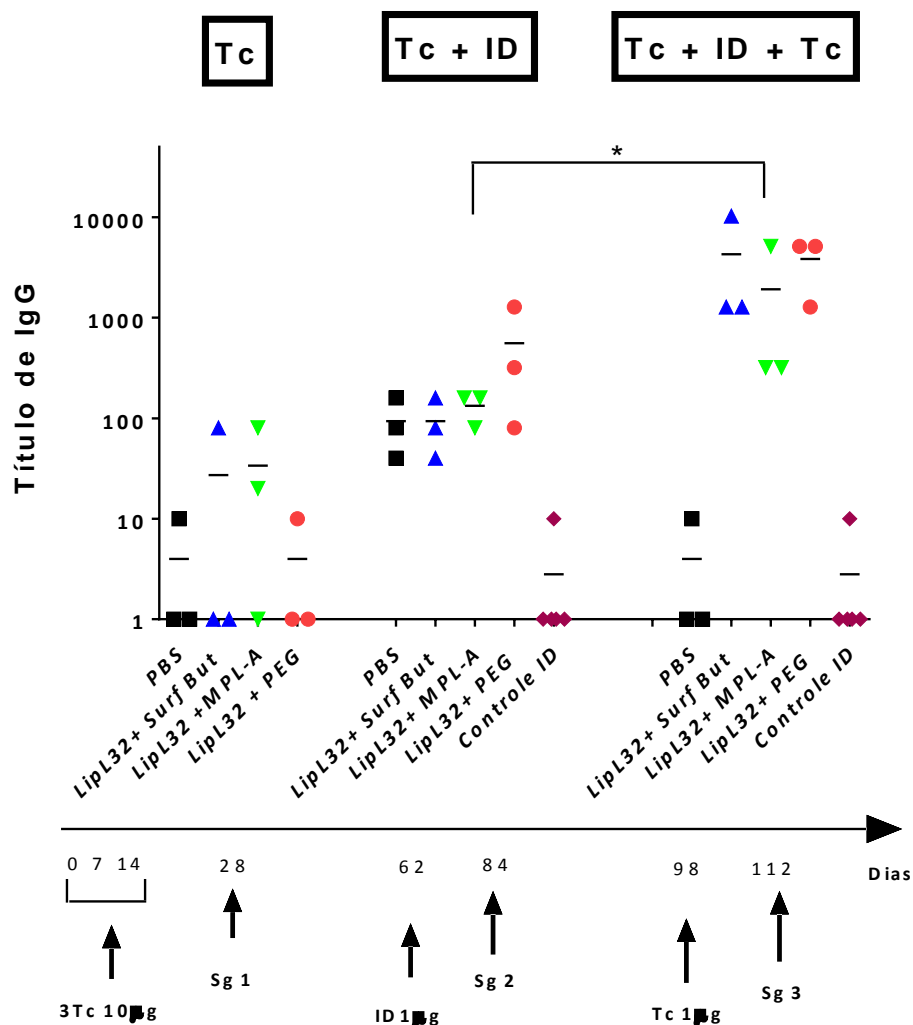


Figura 18 - Exp IV: Avaliação de IgG anti-LipL32 em camundongos Balb/c imunizados com LipL32 coadministrada com emolientes/adjuvantes. Resposta de memória induzida por doses de reforço subimunizantes de LipL32 por via ID e Tc, após 3 doses por via Tc. Na imunização Tc a LipL32 (10 µg/dose) foi coadministrada com Surf But 1%, MPL-A (20 µg/dose) e PEG 0,5%. Sg 1, Sg 2 e Sg 3 (respectivamente Sangrias 1, 2 e 3). Controle ID - LipL32 ID (1 µg/dose). (*) diferença estatisticamente significativa ($p = 0,038$) em relação aos títulos obtidos pelo mesmo grupo, após o reforço subimunizante ID (Tc +ID) (Sg 2).

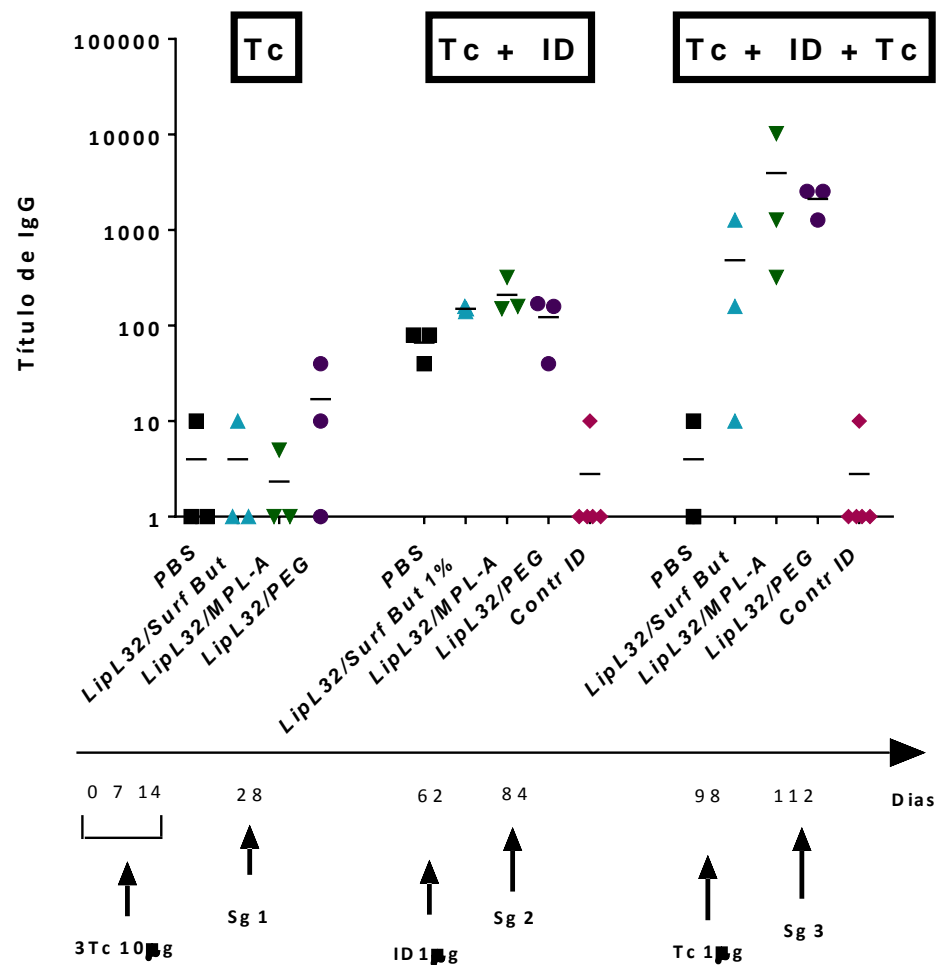


Figura 19 - Exp IV: Avaliação de IgG anti-LipL32 em camundongos Balb/c imunizados com LipL32 após pré-tratamento com emolientes/adjuvantes. Resposta de memória induzida por doses de reforço subimunizantes de LipL32 por via ID e Tc, após 3 doses por via Tc. Na imunização Tc a LipL32 (10 µg/dose) foi administrada após pré-tratamento local com Surf But 1%, MPL-A (20 µg/dose) e PEG 0,5%. Sg 1, Sg 2 e Sg 3 (respectivamente Sangrias 1, 2 e 3). Controle ID - LipL32 ID (1 µg/dose).

A comparação entre os diferentes surfactantes utilizados (Surf But, Surf USP ou Surf Com), coadministrados com a LipL32 ou como pré-tratamento local antes da aplicação da proteína, não evidenciou diferença significativa entre as várias formulações, nas várias etapas do esquema de imunização (Figura 20). Só foi observado aumento significativo nos títulos de anticorpos após reforço subimunizante Tc (Tc + ID + Tc) nos grupos imunizados com Surf Com, tanto em pré-tratamento (LipL32 + Surf Com) quanto coadministrado com a LipL32, quando comparados aos títulos obtidos por esses grupos após a dose subimunizante ID (Figura 20).

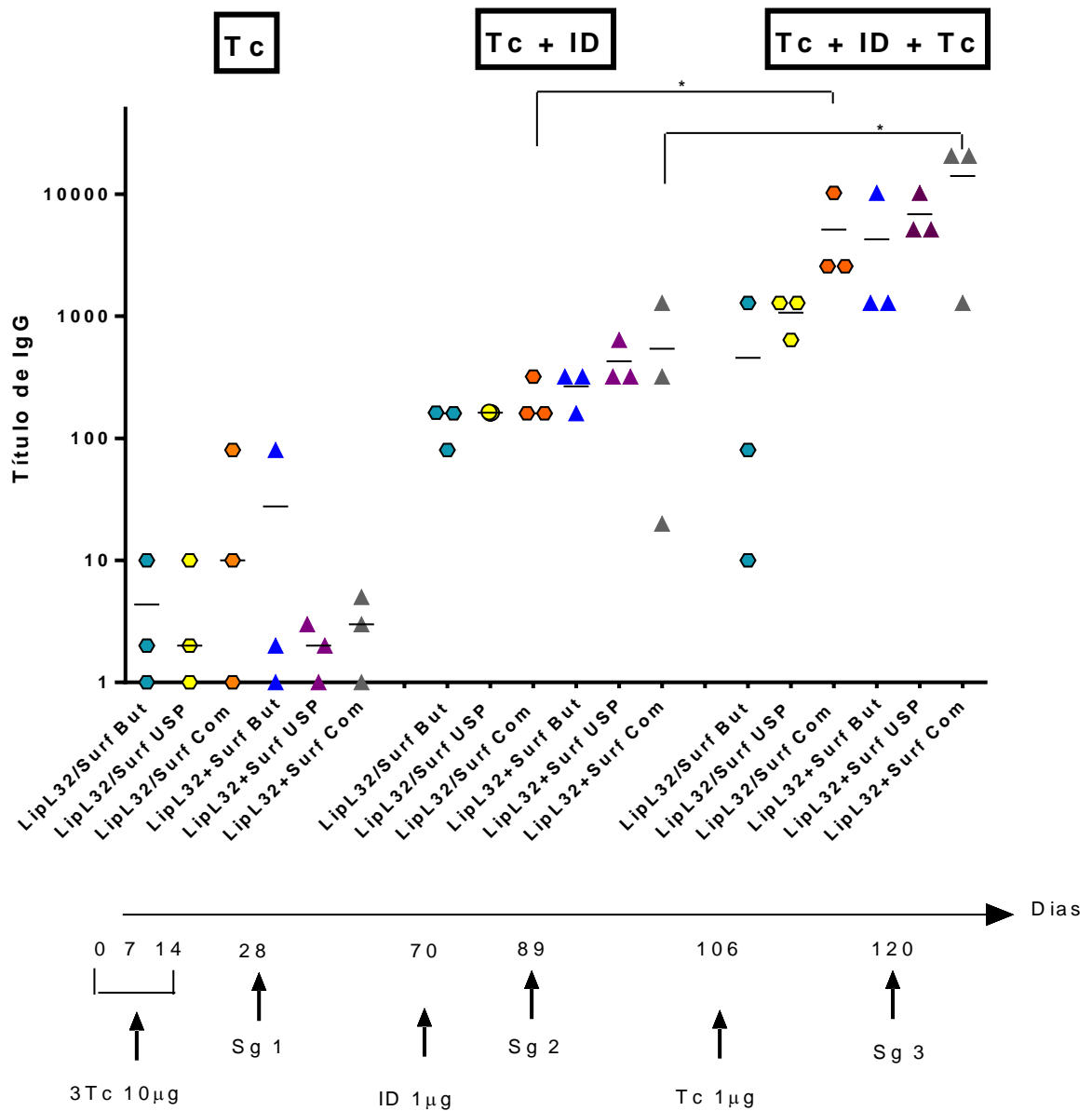


Figura 20 - Exp IV: Avaliação de IgG anti-LipL32 em camundongos Balb/c imunizados com LipL32 e surfactantes, como pré-tratamento local (LipL32/Surf But; LipL32/Surf USP; LipL32/Surf Com) ou coadministrado (LipL32+Surf But; LipL32+Surf USP; LipL32+Surf Com). Sg 1, Sg 2 e Sg 3 (respectivamente Sangrias 1, 2 e 3). (*) $p < 0,05$.

Exp V – Imunização transcutânea com LipL32, coadministrada com surfactante, PEG ou MPL-A: efeito de reforço de doses subimunizantes de LipL32 e da combinação de emolientes/adjuvantes

Utilizando camundongos Balb/c, procuramos consolidar os resultados sobre o efeito de reforço de doses subimunizantes de LipL32 após o esquema de imunização Tc (Figura 11), avaliando, além das formulações de LipL32 com Surf But, PEG e MPL-A, as combinações: Surf But + PEG e MPL-A + PEG.

Foram administradas duas doses de reforço subimunizantes de LipL32 (1 µg/dose): uma por via ID, 56 dias após o esquema Tc, e outra por via Tc, 36 dias após o reforço ID (Figura 11). As doses de reforço subimunizantes foram feitas apenas com o antígeno, tendo sido feito também um controle da dose subimunizante por via ID.

Após o esquema Tc os grupos testes não foram significativamente diferentes dos controles não imunizados.

Após a dose subimunizante ID (Tc + ID) os títulos foram significativamente maiores do que os dos grupos controle PBS e ID, tendo havido aumento dos títulos de anticorpos em relação ao esquema primário Tc (em média 29,5 vezes) (Figura 21).

Após a dose subimuinizante Tc (Tc + ID + Tc), os grupos teste apresentaram títulos de anticorpos significativamente mais elevados do que os dos grupos controles, e todos os grupos apresentaram aumento nos títulos de IgG anti-LipL32, em relação ao mesmo grupo, após o esquema Tc + ID (Figura 21) (em média 10,5 vezes).

Note-se que a adição de adjuvantes não levou a aumento nos títulos de anticorpos em relação à proteína sozinha, e algumas formulações (LipL32 + MPL-A; LipL32 + PEG + Surf But e LipL32 + PEG + MPL-A (Figura 21 – Sg 2 e Sg 3) levaram à diminuição significativa desses títulos.

Os resultados sugerem que todos os grupos teste haviam sido primados pela imunização Tc com LipL32. Após a dose ID subimunizante, 56 dias após a imunização transcutânea primária, foi suscitada resposta de memória, reforçada pela dose Tc subimunizante de LipL32.

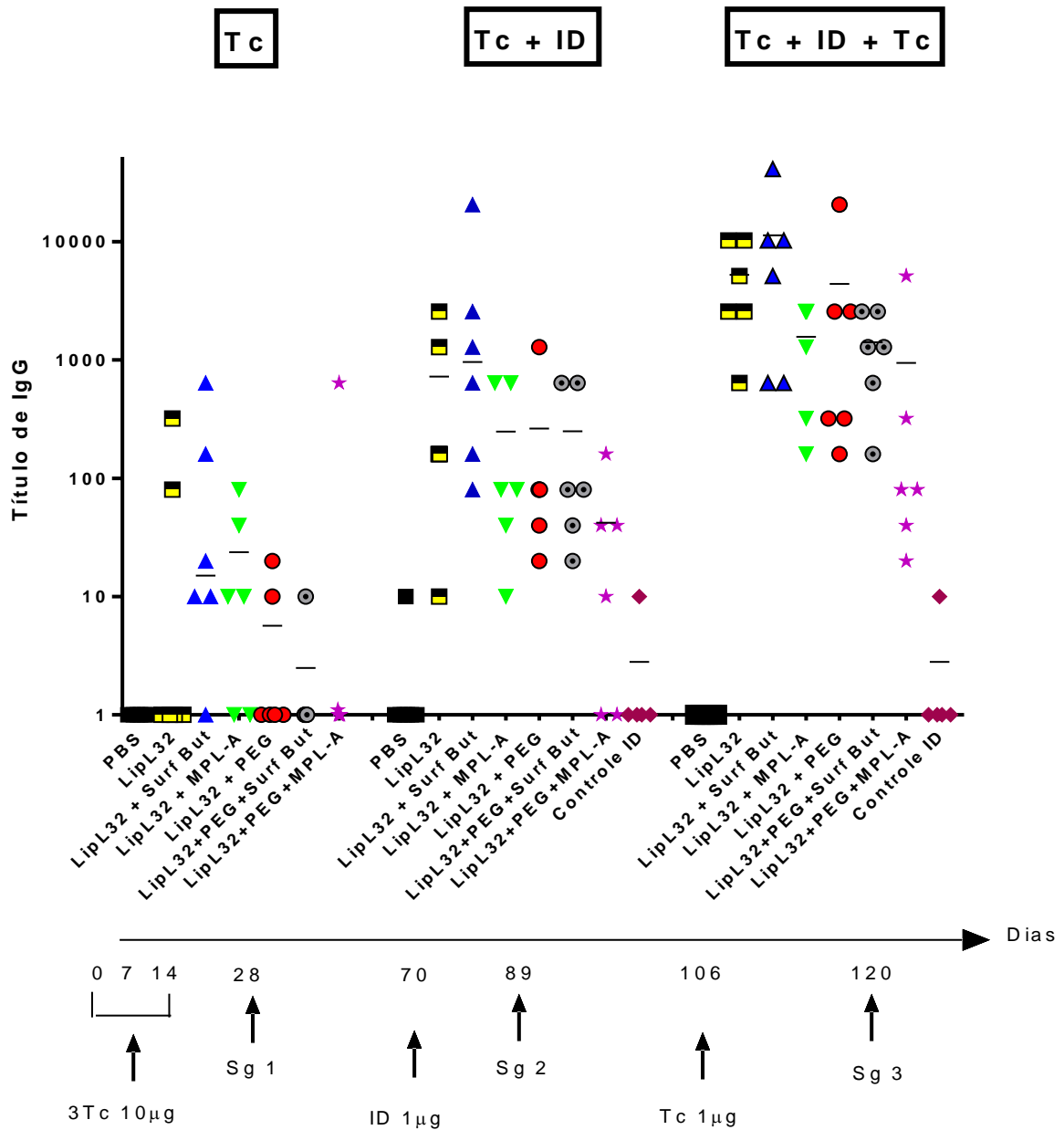


Figura 21 - Exp V: Avaliação de IgG anti-LipL32 em camundongos Balb/c: resposta de memória induzida por doses de reforço subimunizantes de LipL32 por via ID e Tc, após 3 doses por via Tc. Na imunização Tc a LipL32 (10 µg/dose) foi administrada sozinha ou coadministrada com Surf But 1%, MPL-A (20 µg/dose), PEG 0,5%, PEG 0,5% + Surf But 1% e PEG 0,5% + MPL-A (20 µg/dose). Sg 1, Sg 2 e Sg 3 (Sangrias 1, 2 e 3, respectivamente). Controle ID - LipL32 ID (1 µg/dose).

Após o esquema Tc + ID + Tc também foram avaliados os títulos de IgA anti-LipL32 nas fezes e saliva dos animais imunizados e controles, 29 dias após a dose subimunizante Tc. Não foram obtidos níveis detectáveis desses anticorpos, nem nas fezes (Figura 22), nem na saliva (dados não mostrados).

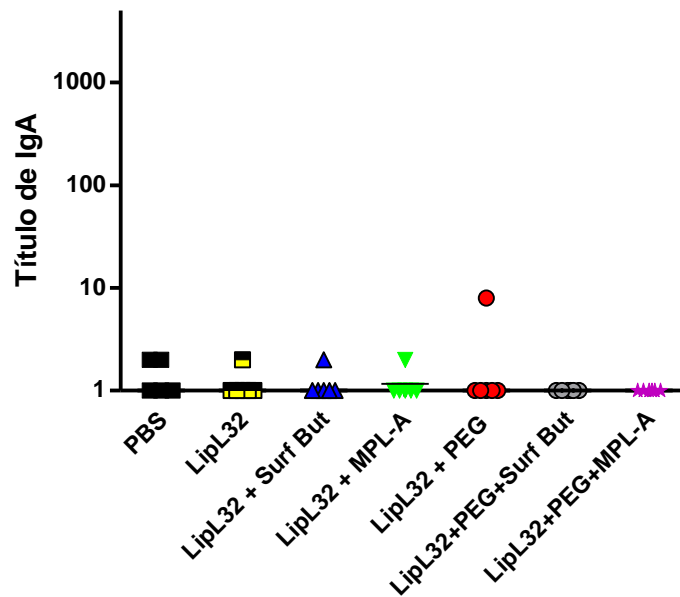


Figura 22 – Exp V: Avaliação de IgA anti-LipL32 nas fezes de camundongos Balb/c imunizados com LipL32, 29 dias após dose de reforço Tc de 1 µg. Os emolientes/adjuvantes Surf But 1%, MPL-A (20 µg/dose), PEG 0,5%, PEG 0,5% + Surf But 1% e PEG 0,5% + MPL-A (20 µg/dose) foram coadministrados com a LipL32, no esquema de imunização transcutânea, em doses semanais.

Resumidamente, pode-se notar por esses experimentos que a imunização transcutânea com doses semanais ou mais prolongadas com LipL32, no sistema utilizando os camundongos Balb/c, não foi capaz de induzir resposta significativa de anticorpos IgG anti-LipL32, independentemente do local da aplicação do antígeno (face interna da orelha ou região abdominal) (Figura 15) ou dos emolientes e/ou adjuvantes utilizados (Exps I ao V) (Figuras 16 a 21). Embora tenha havido aumento nos títulos de IgG anti-LipL32 após a administração tardia de uma dose subimunizante ID da proteína, 48 ou 56 dias após o esquema Tc, esse aumento não foi significativo (Figuras 18, 19, 20 e 21). A administração da proteína em dose subimunizante Tc, 36 dias após o reforço subimunizante ID, levou a aumento significativo de anticorpos anti-LipL32 nos grupos imunizados com a proteína formulada com MPLA (Figura 18) ou com o surfactante comercial, coadministrado com a proteína ou como pré-tratamento local (Figura 20).

Proteínas administradas por via mucosa e transcutânea usualmente não são imunogênicas e requerem a presença de um adjuvante apropriado (GLYNN et al, 2005). Huang et al. (2006) utilizaram um surfactante aniônico, *sodium lauryl sulfate*

(SLS) como pré-tratamento, na pele da região abdominal de camundongos, por 10 minutos, seguido da administração epidérmica de lisozima de ovo de galinha, demonstrando aumento significativo na produção de anticorpos ao antígeno. Karande et al. (2009) avaliaram *in vitro* a capacidade de 28 substâncias químicas no aumento da permeabilidade da inulina em pele de porco. Cada substância química foi testada sozinha e combinada com outras duas, em 4 concentrações diferentes de cada combinação. A combinação com PEG levou a maior taxa de permeação da inulina quando comparado com o grupo PBS. Entretanto, de acordo com Huang et al. (2006), é possível que concentrações mais elevadas de emolientes sejam absorvidas na epiderme e não sejam completamente removidas mesmo após as etapas de lavagem na região pré-tratada.

Neste estudo, a aplicação tópica de substâncias sabidamente emolientes antes da aplicação do antígeno, em nosso caso surfactante pulmonar de diferentes procedências e PEG, assim como a avaliação de MPL-A com essa finalidade, não levou a resultados consistentes. Entretanto, esses experimentos foram realizados com camundongos Balb/c, que não se mostraram bons respondedores à imunização transcutânea com a LipL32.

Os camundongos Balb/c apresentam tendência de resposta imune para o perfil Th2, com prevalência da resposta humoral e produção de citocinas anti-inflamatórias (AUTENRIETH et al., 1994; HSIEH et al., 1993; SANTANIRAND et al., 1999). Em nosso sistema esse modelo animal não respondeu efetivamente ao esquema transcutâneo de imunização com LipL32, e embora sugestiva, não se obteve resposta humoral significativa após os reforços subimunizantes ID e Tc. A resposta imune celular, avaliada por estimulação *in vitro* de PBMC com LipL32 dos animais imunizados e controles, não levou a níveis detectáveis de IL-4, IFN- γ ou TNF- α (ver adiante, item 5.4). Passamos então, a avaliar camundongos C57BL-6, nos experimentos seguintes. Esses animais tendem a perfil de resposta do tipo Th1, com aumento da atividade de células inflamatórias (principalmente macrófagos e polimorfonucleares) e níveis elevados de TNF- α , IFN- γ e IL-2 (AUTENRIETH et al., 1994; BRETT; BUTLER, 1986; HEINZEL; RERKO; HUJER, 1998; SCHARTON; SCOTT, 1993).

Exp VI – Imunização transcutânea com LipL32, coadministrada com surfactante ou MPL-A: efeito de reforço de doses subimunizantes de LipL32, em camundongos C57BL-6

No Exp VI foram utilizados camundongos C57BL-6. Nesse modelo também não obtivemos indução significativa de anticorpos anti-LipL32 após o protocolo transcutâneo, utilizando a proteína sozinha ou coadministrada com Surf But ou MPL-A (Exp VI – Figuras 23 e 24). Após o esquema Tc os animais foram divididos em dois grupos: no primeiro (Figura 12 - Exp VI A) as três doses Tc foram seguidas de uma dose ID subimunizante de LipL32 (1 µg/dose), 94 dias após a terceira dose Tc. No segundo (Figura 12 - Exp VI B), a dose ID subimunizante foi dada 15 dias após a última Tc e um reforço Tc subimunizante (1 µg/dose) foi administrado 78 dias após a dose ID.

A administração da dose subimunizante ID levou a aumento significativo dos títulos de anticorpos anti-LipL32 em relação aos obtidos na imunização primária por via Tc, nos dois protocolos (Figuras 23 e 24) (em média 16,6 vezes e 9,8 vezes, respectivamente). Não foi observada diferença estatística entre os títulos de anticorpos induzidos após a administração mais tardia da dose ID subimunizante, 94 dias após a terceira dose Tc (Figura 23) ou mais recente, 15 dias após a terceira dose Tc (Figura 24).

O reforço Tc subimunizante (Tc + ID + Tc) (Figura 24) potencializou a resposta de anticorpos apenas no grupo imunizado com LipL32 coadministrada com MPL-A, em relação aos títulos obtidos após a dose subimunizante ID (Figura 24) e somente esse grupo apresentou aumento significativo dos títulos de anticorpos anti-LipL32 em relação ao imunizado apenas com a proteína ($p = 0,0348$). A adição de adjuvantes às formulações vacinais (LipL32 + Surf But e LipL32 + MPL-A) não elevou significativamente os títulos de anticorpos em relação aos induzidos apenas com a proteína. Os títulos de anticorpos de todos os grupos teste foram significativamente mais elevados do que os dos controles.

Esses dados demonstram que todos os grupos teste haviam sido primados pela imunização primária com a LipL32 pela via transcutânea. A dose ID subimunizante foi capaz de suscitar resposta de memória, que foi reforçada pela posterior dose Tc subimunizante de LipL32.

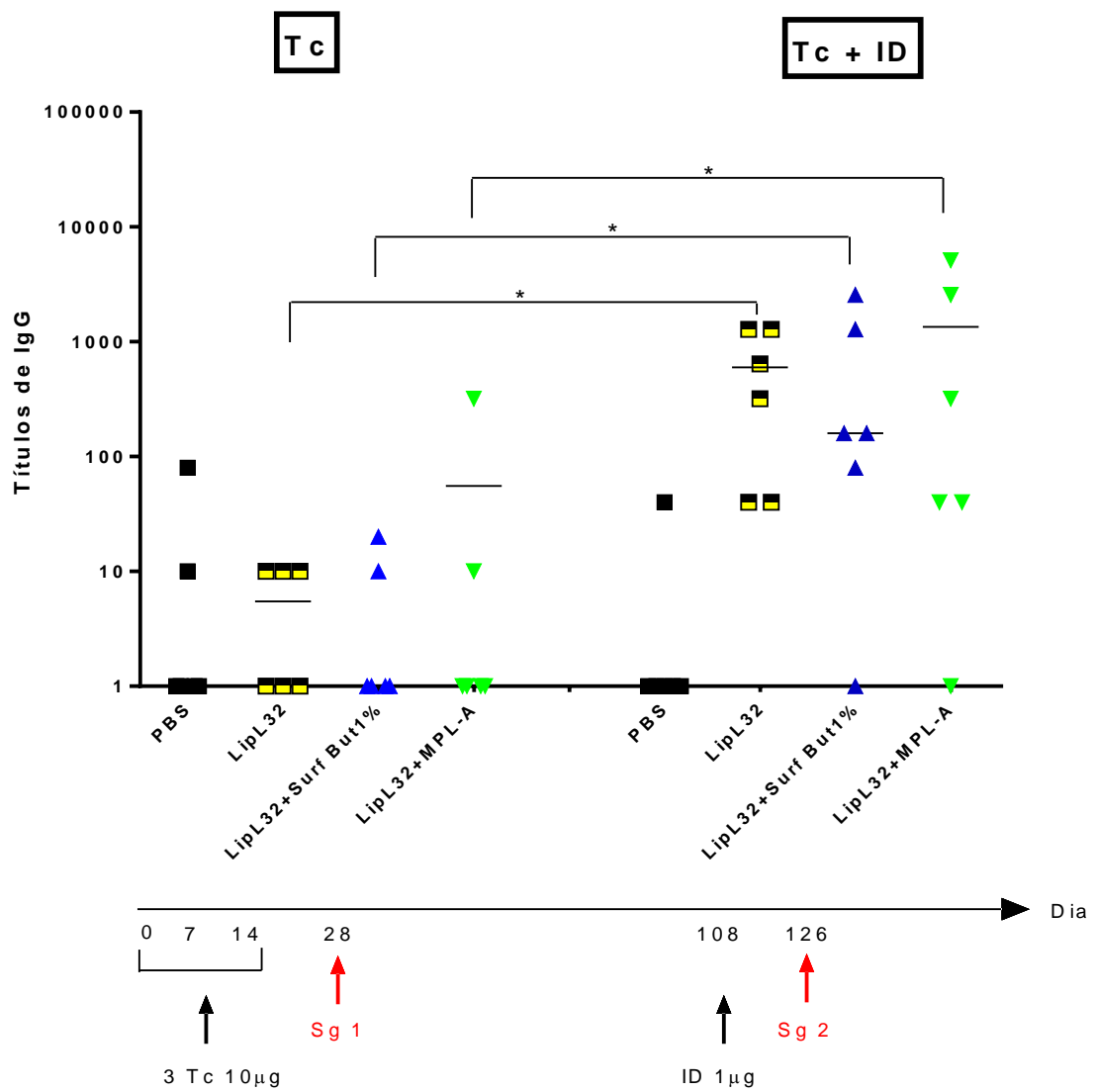


Figura 23 - Exp VI A: Avaliação de IgG anti-LipL32 em camundongos C57BL-6 utilizando LipL32 coadministrada com Surf But 1% e MPL-A (20 µg/dose): efeito de reforço induzido por dose subimunizante de LipL32. Sg 1 e Sg 2 (Sangrias 1 e 2, respectivamente). Controle ID: LipL32 ID. (*) $p < 0,05$.

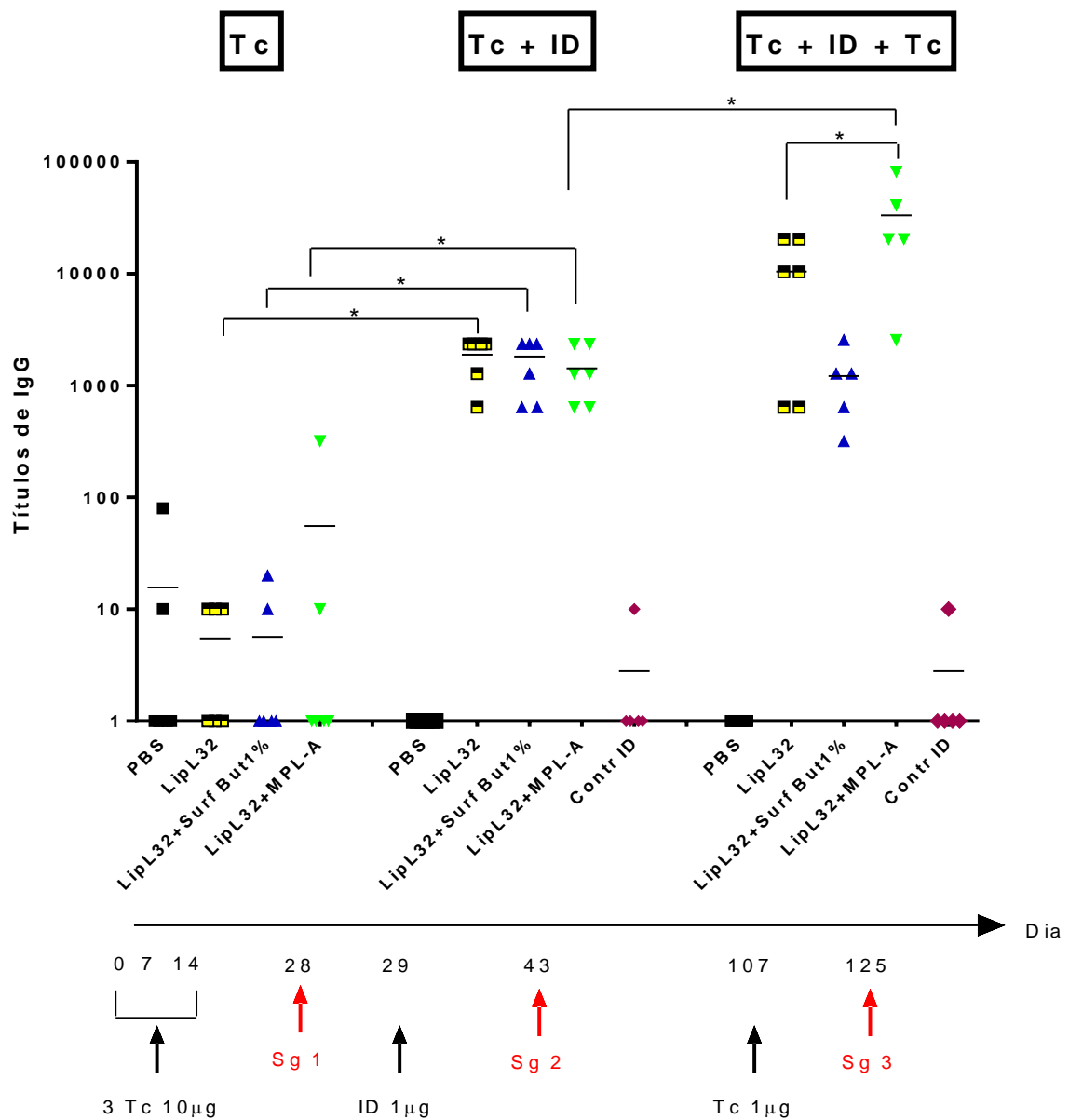


Figura 24 - Exp VI B: Avaliação de IgG anti-LipL32 em camundongos C57BL-6 utilizando LipL32 coadministrada com Surf But 1% e MPL-A (20 μ g/dose): efeito de reforço induzido por doses subimunizantes de LipL32. Sg 1, Sg 2 e Sg 3 (Sangrias 1, 2 e 3, respectivamente). Controle ID: LipL32 ID.
(*) $p < 0,05$.

5.4 Avaliação da resposta imune celular

No grupo de camundongos Balb/c imunizados de acordo com o protocolo descrito no Exp V (Figura 11), a resposta imune celular foi avaliada por estimulação *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) com LipL32, 54 dias após a última dose Tc, 14 dias após a dose subimunizante ID e 19 dias após o reforço subimunizante Tc. Não foram obtidos níveis detectáveis de IL-4, IFN- γ ou TNF- α , nos sobrenadantes de cultivo das PBMC estimuladas (dados não mostrados).

Quando foram utilizados camundongos C57BL-6, no Exp VI A, o padrão de secreção de citocinas foi avaliado em PBMC, sangue total ou esplenócitos dos animais imunizados e controles, após estímulo *in vitro* com LipL32, em cultivos de 48 h, 72 h e 6 dias. Essa resposta foi averiguada após o esquema Tc - depois de 56 dias, em PBMC e depois de 77 dias, em sangue total; e em esplenócitos, 18 dias depois da dose subimunizante ID.

No Exp VI B a resposta imune celular foi avaliada após a dose subimunizante ID, em PBMC, depois de 48 dias e em sangue total, depois de 77 dias. Também foi avaliada 18 dias depois do reforço subimunizante Tc, em esplenócitos dos animais imunizados e controles.

Como não obtivemos resultados detectáveis de citocinas nos sobrenadantes de cultivo de PBMC e de esplenócitos, os resultados (Figuras 25 e 26) se referem às dosagens de citocinas em sangue total, considerando o Exp VI A e Exp VI B em conjunto.

Nos animais imunizados apenas com LipL32 (Figura 25a), o estímulo com a proteína em cultivo de células sanguíneas levou à produção de TNF- α , IL-4 e IL-2, e níveis detectáveis de IL-5 e IFN- γ . No grupo LipL32 + Surf But observou-se resposta aparentemente mais tênue do que a do grupo imunizado apenas com a proteína, com detecção de TNF- α , IL-2 e IL-5 em diferentes tempos de cultivo (Figura 25b). O grupo imunizado com LipL32 + MPL-A (Figura 25c) apresentou resposta mais diversificada, tanto em relação às citocinas induzidas quanto aos níveis obtidos, com destaque para os níveis elevados de TNF- α e IL-5 (Figura 25c), quando comparados

aos obtidos com a proteína sozinha (Figura 25a), sugerindo um balanço Th1/Th2, possivelmente sob efeito imunomodulatório do MPL-A.

O reforço com dose subimunizante ID de LipL32, 15 dias após o esquema Tc não foi capaz de potencializar, de forma geral, a resposta celular nos grupos imunizados apenas com a LipL32 (Figura 25d) ou com a LipL32 + Surf But (Figura 25e), em relação aos obtidos após as 3 doses Tc (Figuras 25a e 25b, respectivamente), excetuando-se a indução tardia de TNF- α , em cultivos de seis dias, do grupo LipL32 + Surf But no esquema 3Tc + ID (Figura 25e), comparativamente aos níveis obtidos após o esquema Tc (Figura 25b).

Entretanto, no grupo imunizado com LipL32 + MPL-A (Figuras 25c e 25f), a dose subimunizante ID (Figura 25f) potencializou a resposta imune celular à LipL32, com aumento médio de 1,5 vezes para a bateria de citocinas avaliada, em relação aos níveis obtidos após o esquema Tc (Figura 25c), levando a um perfil balanceado Th1/Th2, com expressiva indução de TNF- α , após 72 h de cultivo (Figura 25f), com aumento aproximado de cinco vezes, em relação ao obtido após o esquema Tc (Figura 25c).

A adição de MPL-A à formulação vacinal potencializou a resposta à proteína, com aumento médio aproximado de seis vezes nos níveis de citocinas (Figura 25f), em relação aos obtidos com a proteína sozinha (Figura 25d), confirmando o efeito imunomodulatório do MPL-A.

Estes resultados sugerem que a resposta imune celular foi primada pela imunização com a LipL32 pela via Tc e reforçada pela dose ID subimunizante, confirmando os obtidos na resposta humoral ao antígeno. Ressalte-se que o grupo controle imunizado com a dose ID subimunizante apresentou níveis apenas detectáveis de citocinas (Figura 25g).

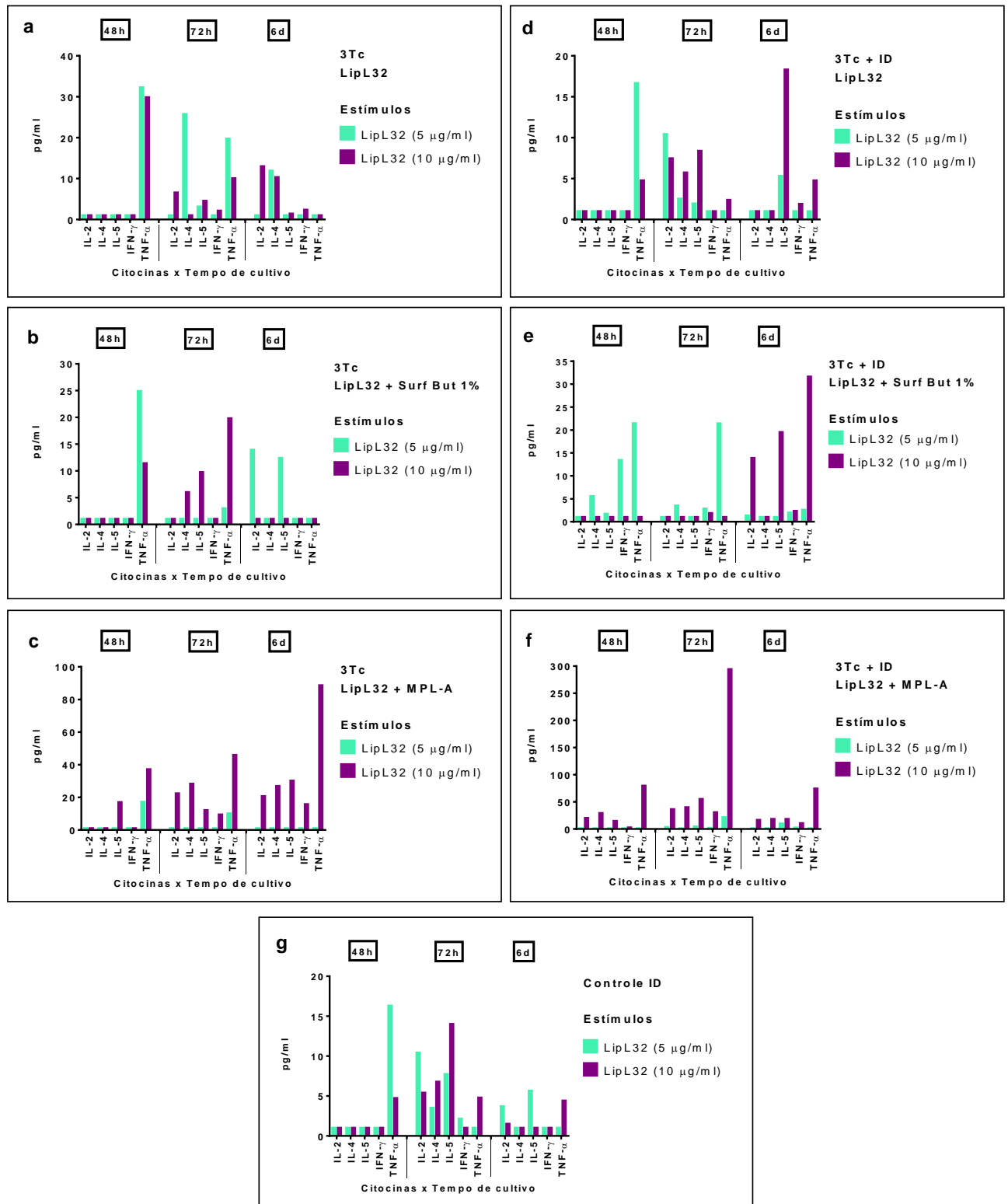


Figura 25 - Avaliação de citocinas Th1/Th2 em sobrenadantes de cultura de células do sangue total de camundongos C57BL-6 imunizados com 3 doses transcutâneas de: (a) LipL32; (b) LipL32 + Surf But ou (c) LipL32 + MPL-A, seguido de dose subimunizante ID (3Tc + ID) (d, e, f). (g) Controle ID: Camundongos C57BL-6 imunizados com LipL32 (1 μ g/dose) por via ID. As células foram estimuladas *in vitro* com LipL32 (5 μ g/ml ou 10 μ g/ml), e cultivadas por 48 h, 72 h ou 6 dias.

Eyles et al. (2004) e Glynn et al. (2005) avaliaram a imunização transcutânea com antígenos de *Yersinia pestis* para primar o sistema imunológico murino, com posteriores reforços subimunizantes, utilizando vias de administração mucosa ou parenterais. Os autores concluíram que o *prime-boost* utilizando a mesma via de imunização foi tão eficiente na indução de resposta imune ao antígeno quanto utilizando reforço por diferentes vias e que a imunização parenteral não foi condição imprescindível para a proteção. Eles verificaram que camundongos imunizados pela via Tc, seguido de doses intradérmicas ou intranasais, apresentaram maiores títulos de IgG contra o antígeno V de *Y. pestis* do que os que receberam dose única intranasal ou intradérmica.

Em nosso estudo, observamos que a imunização com três doses Tc com LipL32, independentemente da formulação com adjuvantes ou após tratamento do local de aplicação com emolientes, foi bastante eficiente para primar o sistema imune.

A dose subimunizante por via parenteral intradérmica elevou os títulos de anticorpos contra o antígeno, como reforço do esquema Tc e a dose subimunizante Tc reforçou a ID.

O esquema primário Tc não induziu anticorpos séricos detectáveis contra a proteína, mas foi suficiente para conferir resposta imune celular (Figura 25a), modulada por ação adjuvante, notadamente do MPL-A (Figuras 25c, 25f), que conferiu um perfil predominantemente Th1.

Vitoriano-Souza et al. (2012), avaliando a resposta inflamatória inata induzida por saponina, adjuvante incompleto de Freund e MPL-A, observaram níveis elevados de citocinas do perfil Th1 (IL-2, TNF- α e IFN- γ) em cultivos das células do sangue periférico de camundongos Swiss, após a administração de uma única dose de 50 μ g por via ID, de MPL-A, com indução principalmente de TNF- α , em cultivo de 12 horas. Na maioria dos casos, existe uma notável diferença entre a resposta obtida após a administração do antígeno sozinho, que pode resultar numa ausência ou baixa resposta, e a coadministração com um adjuvante, com a finalidade de tornar o *priming* do sistema imune mais efetivo, ativando componentes de resposta inflamatória e regulatória. Tanto o surfactante quanto o MPL-A são capazes de se ligar nos TLR-2 e 4 (GUILLOT et al., 2002; MARTIN; MICHALEK; KATZ, 2003;

SATO et al., 2003; TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003). O MPL-A, forma detoxificada do lipopolissacarídeo (LPS) da bactéria, exerce sua ação através de ligação ao receptor TLR4 da célula efetora, ativando citocinas regulatórias e inflamatórias da resposta inata (CASELLA; MITCHELL, 2008). Martin, Michalek e Katz (2003) verificaram em cultivos de monócitos e células mononucleares do sangue periférico humano que o MPL-A induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , IL-10 e IL-12.

Deve-se considerar que estas citocinas podem regular não só a resposta inflamatória, mas também a resposta imune adaptativa, tanto a humoral quanto celular após infecção pela leptospira (XUE et al., 2005). Além do papel das citocinas há a presença das APCs da derme que realizam a apresentação dos antígenos aos linfócitos T nos linfonodos, podendo induzir resposta celular e inflamatória (perfil Th1) ou humoral (perfil Th2) (AUTENRIETH et al., 1994; BANCHEREAU; STEINMAN, 1998).

5.5 Avaliação da resposta inata

No grupo de camundongos C57BL-6 imunizados de acordo com o protocolo descrito no Exp VI (Figura 12), foi avaliada a resposta de células de sangue total à estimulação *in vitro* por vacina BCG (10^3 células/ml ou 10^5 células/ml), 96 dias após a terceira dose Tc (Figura 12 - Exp VI A) ou 84 dias após a dose subimunizante ID (Figura 12 - Exp VI B).

Nas células dos animais não imunes o estímulo com a vacina BCG induziu a produção de níveis elevados de TNF- α e de MCP-1, em níveis não expressivos (Figura 26a).

As células dos animais imunizados apenas com LipL32 (Figura 26b) apresentaram evidente perfil de resposta pró-inflamatória, com níveis elevados de IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF- α , e IL-12p70, notadamente em cultivos de 24 h.

A coadministração de LipL32 com Surf But (Figura 26c) diminuiu a resposta inflamatória em relação à da proteína sozinha (Figura 26b), com acentuada produção de TNF- α , e em menor grau, de MCP-1.

A coadministração de LipL32 com MPL-A (Figura 26d) levou a níveis expressivos de TNF- α , abolindo completamente a detecção das demais citocinas inflamatórias.

Após o reforço com dose subimunizante ID de LipL32, o perfil de citocinas dos grupos imunizados apenas com LipL32 (Figura 26e) se assemelhou ao do grupo não imune (Figura 26a). Para o grupo imunizado com LipL32 + Surf But (Figura 26f) a resposta foi praticamente abolida, com detecção apenas de TNF- α , em concentrações acentuadamente inferiores às obtidas na dosagem após o esquema Tc.

No grupo imunizado com LipL32 + MPL-A, a dose subimunizante ID só com a proteína (Figura 26h) potencializou a indução de citocinas inflamatórias, revertendo o perfil inibitório obtido após o esquema Tc (Figura 26d). Ressalte-se que o grupo controle, que recebeu apenas a dose subimunizante ID, apresentou níveis apenas detectáveis de citocinas anti e pró-inflamatórias (Figura 27).

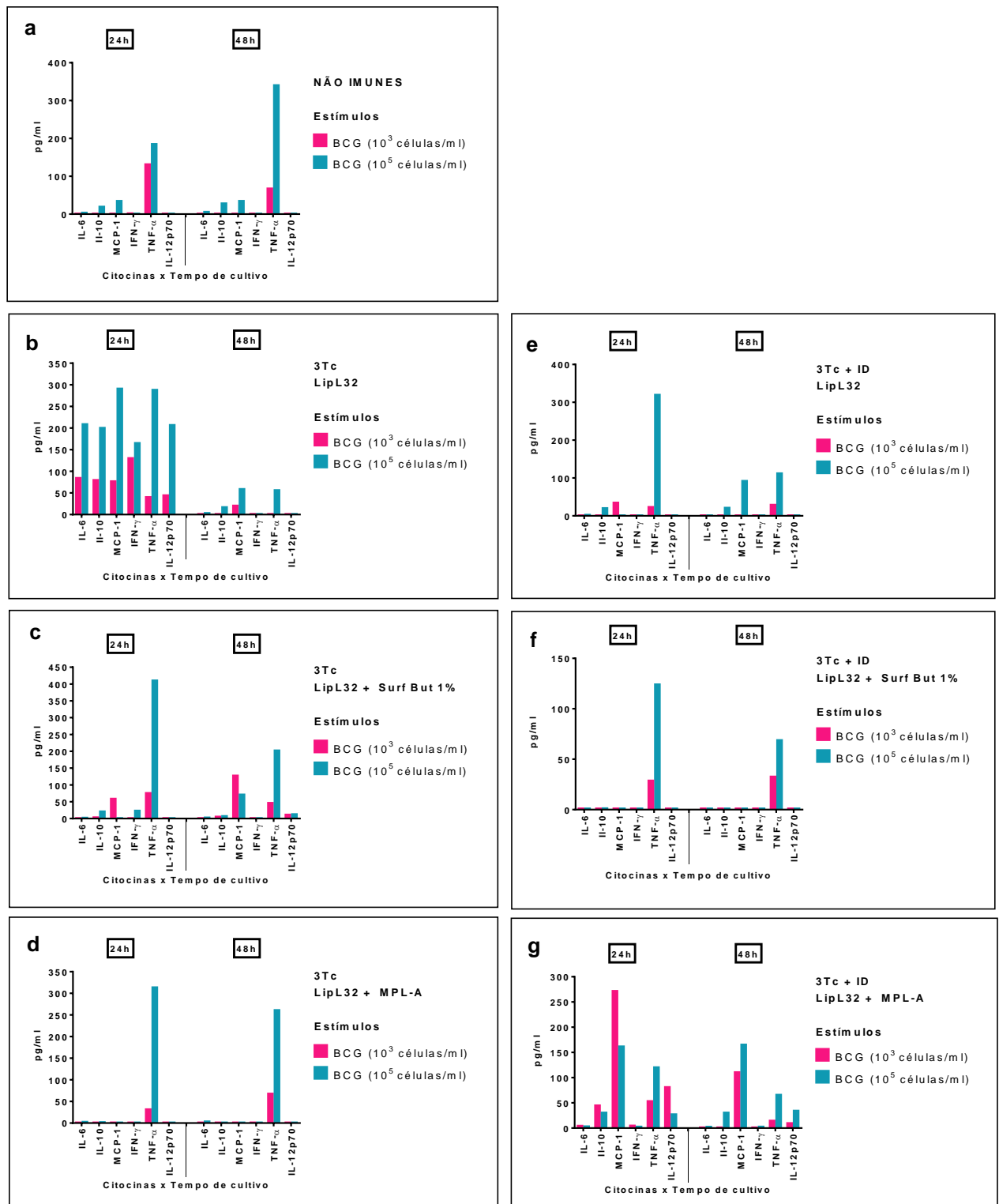


Figura 26 – Avaliação de citocinas pró e anti-inflamatórias em sobrenadantes de cultura de células do sangue total de camundongos C57BL-6: a - Não imunes; b, c, d - Exp VI A - três doses transcutâneas - 3Tc; e, f, g - Exp VI B - três doses transcutâneas, seguidas de dose subimunizante ID - 3Tc + ID. As células foram estimuladas *in vitro* com BCG (10^3 ou 10^5 células/ml), e cultivadas por 24 h ou 48 h.

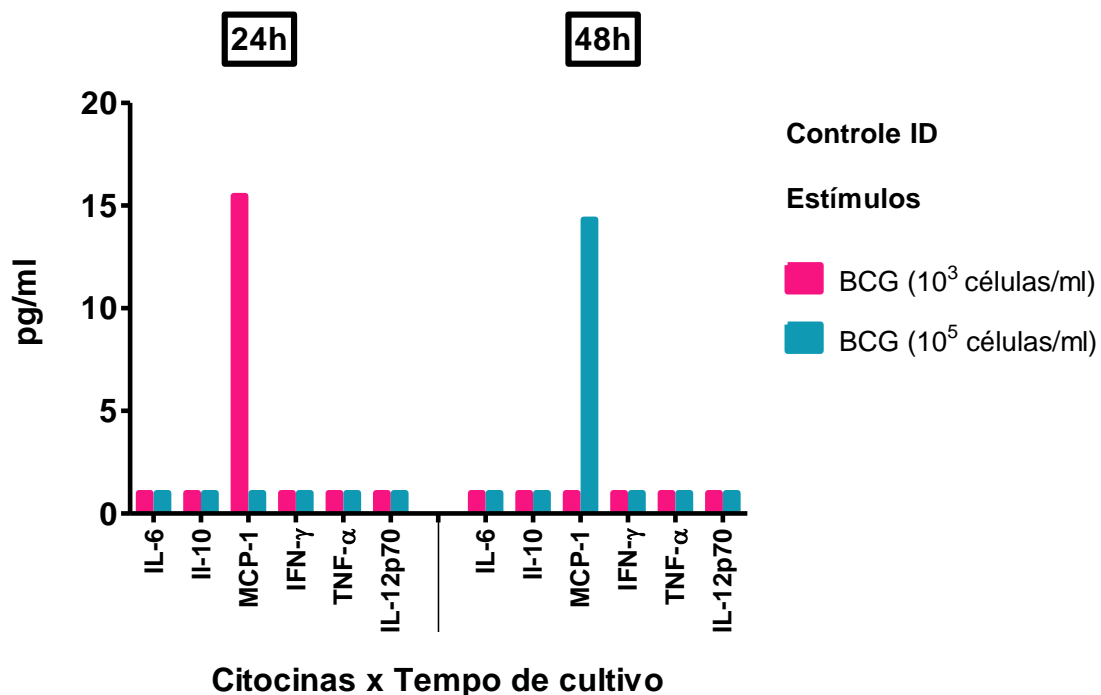


Figura 27 - Exp VI: Avaliação de citocinas pró e anti-inflamatórias em sobrenadantes de cultura de células do sangue total de camundongos C57BL-6 com LipL32 (1 μ g/dose) por via ID (Controle ID).

Em estudo em ratos com vacina de vírus respiratório sincicial (RSV). Boukhvalova et al. (2005) descrevem o efeito supressor do MPL-A na reação pró-inflamatória, sugerindo que o MPL-A não apenas redirecionou o tipo de resposta imune, Th1/Th2, mas suprimiu vários componentes pró-inflamatórios, num efeito moderador da inflamação.

Nossos resultados respaldam os achados da literatura, sugerindo que a imunização transcutânea com uma proteína imunogênica pode eficientemente ativar mecanismos imunes inatos e específicos.

A imunização transcutânea com proteína recombinante LipL32 de leptospira foi capaz de induzir resposta imune humoral robusta, após primar o sistema imune dos camundongos C57BL-6 contra o antígeno. Em esquema *prime boost*, pudemos constatar que os animais foram efetivamente primados pela imunização transcutânea com LipL32, seguida por doses subimunizantes do antígeno, inicialmente por via intradérmica, e mais tardiamente por via Tc, o que levou a subsequentes aumentos significativos dos títulos de anticorpos contra a proteína. O

esquema Tc foi efetivo em suscitar resposta imune celular, com modulação no perfil de citocinas, principalmente no grupo imunizado com a proteína coadministrada com MPL-A. Comparativamente à imunização parenteral por via subcutânea, o esquema de três doses transcutâneas semanais não foi capaz de levar a títulos detectáveis de anticorpos contra a LipL32, mas foi eficiente para primar ou reforçar a imunidade pré-existente, suscitando mecanismos de memória, mais de três meses após o *priming*. Nesse sentido, a imunização Tc com antígeno de *Leptospira* poderia ser considerada para primar ou como reforço em um esquema de vacinação parenteral convencional.

Os ensaios sobre a resposta inata ao BCG, avaliando o perfil e níveis de citocinas em sangue periférico dos animais imunizados com as várias formulações da LipL32, como monocomponente ou em combinação com adjuvantes, levou a resultados interessantes e que devem ser ampliados, confirmando a importância do papel do adjuvante na formulação vacinal, e sugerindo ação imunomodulatória, principalmente do MPL-A, provavelmente no recrutamento de diferentes *subsets* celulares do sistema inato, com regulação da expressão de citocinas inflamatórias, o que já havia sido discutido por outros autores (KENSIL; MO; TRUNEH, 2004).

A via transcutânea, utilizando as indiscutíveis propriedades físicas e imunológicas da pele como sistema de entrada e entrega de antígenos, aliada ao uso de adjuvante adequado, que leve a perfil balanceado de respostas pró-inflamatórias e regulatórias, pode encontrar ambiente seguro para a administração de vacinas e pode ser convenientemente considerada no caso de antígenos de *Leptospira*.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- ✓ A imunização transcutânea com proteína recombinante LipL32 de *Leptospira* foi capaz de primar o sistema imune de camundongos contra a proteína, suscitando resposta sistêmica com altos níveis de anticorpos contra o antígeno, após reforços subimunizantes, intradérmico e transcutâneo.
- ✓ O padrão de citocinas em cultivo de células do sangue periférico dos animais imunizados com LipL32 indicou que o esquema de imunização por via Tc foi capaz de primar o sistema imune, conferindo resposta mediada por células, tanto no sistema inato quanto adaptativo.
- ✓ Dos esquemas avaliados, utilizando os diferentes emolientes/adjuvantes, os resultados mais expressivos foram os relacionados à coadministração Tc da LipL32 com o MPL-A, conferindo possível efeito moderador da reação pro-inflamatória, e redirecionando a resposta adaptativa, tanto humoral quanto celular.
- ✓ Os resultados obtidos neste trabalho, em conjunto com a literatura, atestam que a estimulação tópica de vacinas na pele pode desencadear a estimulação imune efetiva. A administração Tc de LipL32, um antígeno de membrana externa de *Leptospira*, pode ser considerada na indução de resposta imune humoral, celular e inata contra a bactéria.
- ✓ A análise mais acurada da reação inflamatória, assim como da migração celular seletiva, avaliando diferentes populações celulares do sistema inato e adaptativo, tanto circulante quanto no sítio de inoculação do antígeno, podem contribuir para consolidar estes resultados e podem ser objeto de interesse para a continuação deste trabalho. Ensaio de proteção em *hamsters* conferida pela imunização com LipL32, frente a desafios com cepa virulente de *Leptospira* também devem ser considerados.

REFERÊNCIAS*

- ABDULKADER, R. C. Acute renal failure in leptospirosis. **Renal Failure**, v. 19, n. 2, p. 191-198, 1997.
- ABELA-RIDDER, B.; SIKKEMA, R.; HARTSKEERL, R. A. Estimating the burden of human leptospirosis. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 36, Suppl. 1, S5–7, 2010.
- ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis – review. **Vet. Microbiol.**, v. 140, n. 3-4, p. 287-296, 2010.
- ADLER, B. Pathogenesis of leptospirosis: Cellular and molecular aspects. **Vet. Microbiol.**, v. 172, n. 3-4, p. 353–358, 2014.
- AGAMPODI, S. B. et al. Utility of quantitative polymerase chain reaction in leptospirosis diagnosis: association of level of leptospiremia and clinical manifestations in Sri Lanka. **Clin. Infect. Dis.**, v. 54, n. 9, p. 1249–1255, 2012.
- AHMED, A. et al. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials. **PLoS One**, v. 4, n. 9, e7093, 2009.
- ALEXANDER, A. et al. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. **J. Control. Release**, v. 164, n. 1, p. 26-40, 2012.
- ATHANAZIO, D. A. et al. *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. **Acta Trop.**, v. 105, n. 2, p. 176-180, 2008.
- ATZINGEN, M. V. et al. Identification and characterization of novel adhesins in *Leptospira*. **Current Research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology**. Spain: Formatex, 2010. 704–713p.
- AUTENRIETH, I. B. et al. Immune responses to *Yersinia enterocolitica* in susceptible BALB/c and resistant C57BL/6 mice: an essential role for gamma interferon. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 6, p. 2590-2599, 1994.
- AZAD, N.; ROJANASAKUL, Y. Nanobiotechnology in drug delivery. **Am. J. Drug Deliv.**, v. 4, n. 2, p. 79–88, 2006.

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

BAL, S. M. et al. Advances in transcutaneous vaccine delivery: Do all ways lead to Rome? **J. Control. Release**, v. 148, n. 3, p. 266–282, 2010.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, p. 245–252, 1998.

BANFI, E. et al. The role of antibodies and serum complement in the interaction between macrophages and leptospires. **J. Gen. Microbiol.**, v. 128, n.4, p. 813–816, 1982.

BARANY, E.; LINDBERG, M.; LODÉN, M. Unexpected skin barrier influence from non-ionic emulsifiers. **Int. J. Pharm.**, v. 195, n. 1-2, p. 189–195, 2000.

BAROCCHIM, A. et al. Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but non intracellular pathogen. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 12, p. 6926-6932, 2002.

BARRY, M. A.; JOHNSTON, S. A. Biological features of genetic immunization. **Vaccine.**, v. 15, n. 8, p. 788–791, 1997.

BARRY, B. W. Breaching the skin's barrier to drugs. **Nat. Biotechnol.**, v. 22, n. 2, p. 165–167, 2004.

BELYAKOV, I. M. et al. Transcutaneous immunization induces mucosal CTLs and protective immunity by migration of primed skin dendritic cells. **J. Clin. Invest.**, v. 113, n. 7, p. 998-1007, 2004.

BERRY, L. J. et al. Transcutaneous immunization with combined cholera toxin and CpG adjuvant protects against *Chlamydia muridarum* genital tract infection. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 2, p. 1019–1028, 2004.

BEUTLER, B.; RIETSCHHEL, E. T. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, n. 2, p. 169–176, 2003.

BHADRA, D. et al. Pegnology: a review of PEG-ylated systems. **Pharmazie**, v. 57, n. 1, p. 5-29, 2002.

BHARTI, A. R. et al. Leptospirosis: A zoonotic disease a global importance. **Lancet Infect. Dis.**, v. 3, n. 12, p. 757-771, 2003.

BLASI, E. et al. NF- κ B activation and p38 phosphorylation in microglial cells infected with *Leptospira* or exposed to partially purified leptospiral lipoproteins. **Microb. Pathog.**, v. 42, n. 2-3, p. 80-87, 2007.

BOLIN, C. A.; KOELLNER, P. Human-to-human transmission of *Leptospira interrogans* by milk. **J. Infect. Dis.**, v. 158, n. 1, p. 246–247, 1988.

BOLZINGER, M-A. et al. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Curr. Opin. Colloid Interface Sci.**, v. 17, n. 3, p. 156–165, 2012.

BOS, J. D.; MEINARDI, M. M. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. **Exp. Dermatol.**, v. 9, n. 3, p. 165–169, 2000.

BOUKHVALOVA, M. S. et al. The TLR4 agonist, monophosphoryl lipid A, attenuates the cytokine storm associated with respiratory syncytial virus vaccine-enhanced disease 5. **Vaccine**, v. 24, n. 23, p. 5027–5035, 2006.

BOUWSTRA, J. et al. New aspects of the skin barrier organization. **Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.**, v. 14, Suppl. 1, p. 52–62, 2001.

BOUWSTRA, J. A.; HONEYWELL-NGUYEN, P. L. Skin structure and mode of action of vesicles. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 54, Suppl 1, S41–S55, 2002.

BOUWSTRA, J. A. Water distribution and related morphology in human stratum corneum at different hydration levels. **J. Invest. Dermatol.**, v. 120, n. 5, p. 750-758, 2003.

BRANGER, C. et al. Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 11, p. 6831–6838, 2001.

BRANGER, C. et al. Protection against *Leptospira interrogans sensu lato* challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 7, p. 4062–4069, 2005.

BREAU, L. M. et al. Facial expression of children receiving immunizations: a principal components analysis of the child facial coding system. **Clin. J. Pain.**, v. 17, p. 178–186, 2001.

BRETT, S. J.; BUTLER, R. Resistance to *Mycobacterium lepraemurium* is correlated with the capacity to generate macrophage activating factor(s) in response to mycobacterial antigens *in vitro*. **Immun.**, v. 59, n. 3, p. 339-345, 1986.

CANDI, E.; SCHMIDT, R.; MELINO, G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 6, n. 4, p. 328–340, 2005.

CAO, Y. et al. Evaluation of novel fusion proteins derived from extracellular matrix binding domains of LigB as vaccine candidates against leptospirosis in a hamster model. **Vaccine**, v. 29, n. 43, p. 7379–7386, 2011.

CASELLA, C. R.; MITCHELL, T. C. Putting Endotoxin to Work for Us: Monophosphoryl Lipid A as a Safe and Effective Vaccine Adjuvant. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 65, n. 20, p. 3231-3240, 2008.

CHANG, Y. F. et al. Immunogenicity of the recombinant leptospiral putative outer membrane proteins as vaccine candidates. **Vaccine**, v. 25, n. 48, p. 8190-8197, 2007.

CHASSIN, C. et al. TLR4- and TLR2-mediated B cell responses control the clearance of the bacterial pathogen, *Leptospira interrogans*. **J. Immunol.**, v. 183, n. 4, p. 2669–2677, 2009.

CHEN, J. et al. Polyethylene glycol and solutions of polyethylene glycol as green reaction media. **Green Chemistry**, v. 7, n. 2, p. 64–82, 2005.

CHEN, X. et al. Facilitation of transcutaneous drug delivery and vaccine immunization by a safe laser technology. **J. Control. Release**, v. 159, n. 1, p. 43-51, 2012.

CHIARELLA, P.; FAZIO, V. M; SIGNORI, E. Application of electroporation in DNA vaccination protocols. **Curr. Gene Ther.**, v. 10, n. 4, p. 281–286, 2010.

CHO, H-J et al. Enhanced humoral and cellular immune responses after sublingual immunization against human papillomavirus 16 L1 protein with adjuvants. **Vaccine**, v. 28, n. 14, p. 2598–2606, 2010.

CHOPRA, A.; CEVC, G. Non-invasive, epicutaneous immunisation with toxoid in deformable vesicles protects mice against tetanus, chiefly owing to a Th2 response. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 56, p. 55–64, 2014.

CINCO, M. New insights into the pathogenicity of leptospires: evasion of host defences. **New Microbiologica**, v. 33, p. 283-292, 2010.

CULLEN, P. A.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 28, n. 3, p. 291–318, 2004.

CULLEN, P. A. et al. Surfaceome of *Leptospira* spp. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 8, p. 4853–4863, 2005.

CUMBERBATCH, M.; DEARMAN, R. J.; KIMBER, I. Langerhans cells require signals from both tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta for migration. **Immun.**, v. 92, n. 3, p. 388–395, 1997.

CUMBERLAND, P. et al. Persistence of anti-leptospiral IgM, IgG and agglutinating antibodies in patients presenting with acute febrile illness in Barbados 1979–1989. **Eur. J. Epidemiol.**, v. 17, n. 7, p. 601–608, 2001.

DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. et al. Comparative analysis of the LPS biosynthetic loci of the genetic subtypes of serovar Hardjo: *Leptospira interrogans* subtype *Hardjoprajitno* and *Leptospira borgpetersenii* subtype *Hardjobovis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 177, n. 2, p. 319-326, 1999.

DICKO, M. et al. Safety of immunization injections in Africa: not simply a problem of logistics. **Bull. World Health Organ.**, v. 78, n. 2, p. 163–169, 2000.

ELIAS, P. M.; FRIEND, D. S. The permeability barrier in mammalian epidermis. **J. Cell Biol.**, v. 65, n. 1, p. 180–191, 1975.

ELIAS, P. M. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. **J. Invest. Dermatol.**, v. 80, S44–S49, 1983.

ESHGHI, A. et al. *Leptospira interrogans* catalase is required for resistance to H₂O₂ and for virulence. **Infect. Immun.**, v. 80, n. 11, p. 3892–3899, 2012.

ESHGHI, A. et al. A putative regulatory genetic locus modulates virulence in the pathogen *Leptospira interrogans*. **Infect. Immun.**, v. 82, n. 6, p. 2542–2552, 2014.

ETCHART, N. et al. Safety and efficacy of transcutaneous vaccination using a patch with the live-attenuated measles vaccine in humans. **Vaccine**, v. 25, n. 39–40, p. 6891–6899, 2007.

EYLES, J. E. et al. Immunisation against plague by transcutaneous and intradermal application of subunit antigens. **Vaccine**, v. 22, n. 31–32, p. 4365–4373, 2004.

FAINE, S.; STALLMAN, N. D. Amended descriptions of the genus *Leptospira* Noguchi 1917 and the species *L. interrogans* (Stimson 1907) Wenyon 1926 and *L. biflexa* (Wolbach and Binger 1914) Noguchi 1918. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 32, n. 4, p. 461–463, 1982.

FAINE, S. et al. **Leptospira and leptospirosis**. 2a. ed. Melbourne: MediSci, 1999. 272 p.

FARTASCH, M. Ultrastructure of the epidermal barrier after irritation. **Microsc. Res. Tech.**, v. 37, n. 3, p. 193–199, 1997.

FINE, P. E. Poliomyelitis: very small risks and very large risks. **Lancet Neurol.** v. 3, n. 12, p. 703, 2004.

FLACHER, V. et al. Human Langerhans cells express a specific TLR profile and differentially respond to viruses and Gram-positive bacteria. **J. Immunol.**, v. 177, n. 11, p. 7959–7967, 2006.

FRANCIS, G. E. et al. PEGylation of cytokines and other therapeutic proteins and peptides: the importance of biological optimisation of coupling techniques. **Int. J. Hematol.**, v. 68, n. 1, p. 1–18, 1998.

FRECH, S. A. et al. Use of a patch containing heat-labile toxin from *Escherichia coli* against travellers' diarrhoea: a phase II, randomised, double-blind, placebo-controlled field trial. **Lancet**, v. 371, n. 9629, p. 2019–2025, 2008.

FRUIJTIER-PÖLLOTH, C. Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products. **Toxicology**, v. 214, n. 1-2, p. 1-38, 2005.

FUJITA, H. et al. Differential production of Th1-and Th2-type chemokines by mouse Langerhans cells and splenic dendritic cells. **J. Invest. Dermatol.**, v. 124, n. 2, p. 343–350, 2005.

FUJITA, R. et al. Comparison of Bacterial Burden and Cytokine Gene Expression in Golden Hamsters in Early Phase of Infection with Two Different Strains of *Leptospira interrogans*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, e0132694, 2015.

GIUDICE, E. L.; CAMPBELL, J. D. Needle-free vaccine delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 58, n. 1, p. 68–89, 2006.

GLENN, G. M. et al. Transcutaneous immunization with cholera toxin protects mice against lethal mucosal toxin challenge. **J. Immunol.**, v. 161, n. 7, p. 3211-3214, 1998.

GLENN, G. M. et al. Transcutaneous immunization: a human vaccine delivery strategy using a patch. **Nat. Med.**, v. 6, n. 12, p. 1403–1406, 2000.

GLENN, G. M. et al. Transcutaneous immunization and immunostimulant strategies: capitalizing on the immunocompetence of the skin. **Expert Rev. Vaccines**, v. 2, n. 2, p. 253–267, 2003.

GLENN, G. M. et al. Safety and immunogenicity of an enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine patch containing heat-labile toxin: use of skin pretreatment to disrupt the stratum corneum. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 5, p. 2163–2170, 2007.

GLYNN, A. et al. Protection against Aerosolized *Yersinia pestis* Challenge following Homologous and Heterologous Prime-Boost with Recombinant Plague Antigens. **Infect Immun.**, v. 73, n. 8, p. 5256–5261, 2005.

GONZÁLEZ, M. et al. Vax-Spiral®. Trivalent Antileptospirosis Vaccine For Human Use: Research, Development and Impact On The Disease In Cuba. **Medic Rev.**, v. 2, n. 5, p. 33-41, 2004.

GRASSMANN, A. A. et al. Protection against lethal leptospirosis after vaccination with LipL32 coupled or coadministered with the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 19, n. 5, p. 740–745, 2012.

GRIFFITH, M. E., HOSPENTHAL, D. R; MURRAY, CK. Antimicrobial therapy of leptospirosis. **Curr. Opin. Infect Dis.**, v. 19, n. 6, p. 533-537, 2006.

GUERRA, M. A. Zoonosis Uptodate: Leptospirosis. **Vet. Med. Today**, v. 234, n. 4, p. 472-478, 2009.

GUERREIRO, H. et al. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 8, p. 4958–4968, 2001.

GUILLOT, L. et al. The immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4. **J. Immunol.**, v. 168, n. 12, p. 5989–5992, 2002.

HAAKE, D. A. et al. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 12, p. 6572-6582, 1999.

HAAKE, D. A. Review Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. **Microbiology**, v. 146, n. 7, p. 1491-1504, 2000.

HAAKE, D. A. Hamster Model of Leptospirosis. **Current Protocols in Microbiology**. 2:E:12E.2:12E.2.1–12E.2.13, 2006.

HARRIS, J. M. Polyethylene Glycol Chemistry. In: _____. **Biotechnical and Biomedical Applications**. Nova York: Plenum Press, 1992. p. 1-14

HARRISON, N. A.; FITZGERALD, W. R. Leptospirosis - can it be a sexually transmitted disease? **Postgraduate Medical Journal**, v. 64, n. 748, p. 163–164, 1988.

HAUK, P. et al. In LipL32, the Major Leptospiral Lipoprotein, the C Terminus Is the Primary Immunogenic Domain and Mediates Interaction with Collagen IV and Plasma Fibronectin. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 6, p. 2642–2665, 2008.

HAUT, R. C. **Biomechanics of soft tissue**. 2a. ed. Nova York: Springer, 2002. 230 p.

HEINZEL, F. P.; RERKO, R. M.; HUJER, A. M. Underproduction of interleukin-12 in susceptible mice during progressive leishmaniasis is due to decreased CD40 activity. **Cell. Immunol.**, v. 184, n. 2, p. 129-142, 1998.

HEROLD, D. A.; KEIL, K.; BRUNS, D. E. Oxidation of polyethylene glycols by alcohol dehydrogenase. **Biochem. Pharmacol.**, v. 38, n. 1, p. 73-76, 1989.

HIROBE, S. et al. Clinical study of transcutaneous vaccination using a hydrogel patch for tetanus and diphtheria. **Vaccine**, v. 30, n. 10, p. 1847–1854, 2012.

HOKE, D. E. et al. LipL32 Is an Extracellular Matrix-Interacting Protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata*. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 5, p. 2063-2069, 2008.

HSIEH, C. S. et al. Development of T_H1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. **Science**, v. 260, n. 5107, p. 547-549, 1993.

HUANG, C-M. et al. Surfactant sodium lauryl sulfate enhances skin vaccination. **Mol. Cell. Proteomics**, v. 5, n. 3, p. 523-532, 2006.

HUHN, R. G. et al. Immunity to leptospirosis: *Leptospira interrogans* serotype pomona bacterins in cattle. **Am. J. Vet. Res.**, v. 36, n. 1, p. 59-65, 1975.

HUMPHRYES, P. C. et al. Vaccination with Leptospiral Outer Membrane Lipoprotein LipL32 Reduces Kidney Invasion of *Leptospira interrogans* Serovar Canicola in hamsters. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 21, n. 4, p. 546-551, 2014.

IGARASHI, T.; NISHINO, K.; NAYAR, J. E. The appearance of human skin: a survey. **Comput. Graph. Vis.**, v. 3, n. 1, p. 1–95, 2007.

JACOBSON, R. M. et al. Making vaccines more acceptable—methods to prevent and minimize pain and other common adverse events associated with vaccines. **Vaccine**, v. 19, n. 17-19, p. 2418–2427, 2001.

JIN, D. et al. *Leptospira interrogans* induces apoptosis in macrophages via caspase-8- and caspase-3-dependent pathways. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 2, p. 799–809, 2009.

JOHNSON, R. C; FAINE, S. *Leptospira*. In: KRIEG, N.R; HOLT, J.G, editors. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. v. 1. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. p. 62–66.

KALIA, Y. N.; MERINO, V.; GUY, R. H. Transdermal drug delivery — clinical aspects. **Dermatol. Clin.**, v. 16, n. 2, p. 289-299, 1998.

KANDA, N.; WATANABE, S. IL-12, IL-23, and IL-27 enhance human β -defensin-2 production in human keratinocytes. **Eur. J. Immunol.**, v. 38, n. 5, p. 1287–1296, 2008.

KARANDE, P. et al. Design principles of chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 102, n. 13, p. 4688–4693, 2005.

KARANDE, P. et al. Transcutaneous immunization using common chemicals. **J. Control. Release**, v. 138, n. 2, p. 134–140, 2009.

KARANDE, P.; MITRAGOTRI, S. Enhancement of transdermal drug delivery via synergistic action of chemicals. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1788, n. 11, p. 2362–2373, 2009.

KAUSHIK, D. et al. Percutaneous permeation modifiers: enhancement versus retardation. **Expert Opin. Drug Deliv.**, v. 5, n. 5, p. 517–529, 2008.

KAWAI, K. Expression of functional toll-like receptors on cultured human epidermal keratinocytes. **J. Invest. Dermatol.**, v. 121, n. 1, p. 217–218, 2003.

KENSIL, C. R.; MO, A. X.; TRUNEH, A. Current vaccine adjuvants: an overview of a diverse class. **Front Biosci.**, v. 9, p. 2972–2988, 2004.

- KERSTEN, G.; HIRSCHBERG, H. Needle-free vaccine delivery. **Expert Opin. Drug Deliv.**, v. 4, n. 5, p. 459–474, 2007.
- KIM, Y. C. et al. Synergistic enhancement of skin permeability by N-lauroylsarcosine and ethanol. **Int. J. Pharm.**, v. 352, n. 1-2, p. 129–138, 2008.
- KIRSNER, R. S.; FROELICH, C. W. Soaps and detergents: understanding their composition and effect. **Ostomy Wound Manage**, v. 44, n. 3A, p. 62S-69S, 1998.
- KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nat. Rev. Microbiol.**, 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.
- KUBRUSLY, F. S. et al. A natural pig lung surfactant. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 15, p. 1251-1253, 2000.
- KUSUM, M. et al. Comparison of leptospiral serovars identification by serology and cultivation in north-eastern region, Thailand. **J. Med. Assoc. Thai.**, v. 88, n. 8, p. 1098–1102, 2005.
- KYRIAKIDIS, I.; SAMARA, P.; PAPA, A. Serum TNF- α , sTNFR1, IL-6, IL-8 and IL-10 levels in Weil's syndrome. **Cytokine**, v. 54, n. 2, p. 117-120, 2011.
- LADDY, D. J. et al. Electroporation of synthetic DNA antigens offers protection in nonhuman primates challenged with highly pathogenic avian influenza virus. **J. Virol.**, v. 83, n. 9, p. 4624–4630, 2009.
- LAI-CHEONG, J. E.; McGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. **Medicine**, v. 37, n. 5, p. 223–236, 2009.
- LAMBERT, A. et al. FlaA proteins in *Leptospira interrogans* are essential for motility and virulence but are not required for formation of the flagellum sheath. **Infect. Immun.**, v. 80, n. 6, p. 2019–2025, 2012.
- LAU, C. L. et al. Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: fuelling the fire? **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 104, n. 10, p. 631–638, 2010.
- LAVELLE, E. C. Generation of improved mucosal vaccines by induction of innate immunity. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 62, n. 23, p. 2750–2770, 2005.
- LEE, S. H. et al. Cytotoxic activities of *Leptospira interrogans* hemolysin SphH as a pore-forming protein on mammalian cells. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 1, p. 315–322, 2002.
- LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 14, n. 2, p. 296-326, 2001.

- LI, S. et al. Replication or death: distinct fates of pathogenic *Leptospira strain Lai* within macrophages of human or mouse origin. **Innate Immun.**, v. 16, n. 2, p. 80–92, 2010.
- LI, N. et al. Transcutaneous vaccines: Novel advances in technology and delivery for overcoming the barriers. **Vaccine**, v. 29, n. 37, p. 6179–6190, 2011.
- LIAO, S. et al. Inactivation of the fliY gene encoding a flagellar motor switch protein attenuates mobility and virulence of *Leptospira interrogans* strain Lai. **BMC Microbiol.**, v. 9, p. 253-263, 2009.
- LIN, K. et al. Therapeutic HPV DNA vaccines. **Immunol. Res.**, v. 47, n. 1-3, p. 86–112, 2010.
- LO, M. et al. Effects of temperature on gene expression patterns in *Leptospira interrogans* serovar Lai as assessed by whole-genome microarrays. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 10, p. 5848–5859, 2006.
- LO, M. et al. Transcriptional response of *Leptospira interrogans* to iron limitation and characterization of a PerR homolog. **Infect. Immun.**, v. 78, n. 11, p. 4850–4859, 2010.
- LOURDAULT, K. et al. Inactivation of clpB in the pathogen *Leptospira interrogans* reduces virulence and resistance to stress conditions. **Infect. Immun.**, v. 79, n. 9, p. 3711–3717, 2011.
- LUCAS, D. S. et al. Recombinant LipL32 and LigA from *Leptospira* are unable to stimulate protective immunity against leptospirosis in the hamster model. **Vaccine**, v. 29, n. 18, p. 3413–3418, 2011.
- MARCSISIN, R. A. et al. Use of a high-throughput screen to identify *Leptospira* mutants unable to colonise the carrier host or cause disease in the acute model of infection. **J. Med. Microbiol.**, v. 62, Pt 10, p. 1601–1608, 2013.
- MARTIN, M.; MICHALEK, S. M.; KATZ, J. Role of Innate Immune Factors in the Adjuvant Activity of Monophosphoryl Lipid A. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 5, p. 2498–2507, 2003.
- MARTÍNEZ, R. et al. Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba. **Rev. Panam. Salud Publica**, v. 15, n. 4, p. 249-255, 2004.
- MATHERS, A. R; LARREGINA, A. T. Professional antigen-presenting cells of the skin. **Immunol. Res.**, v. 36, n. 1-3, p. 127–136, 2006.
- MATSUI, M. et al. Gene expression profiles of immune mediators and histopathological findings in animal models of leptospirosis: comparison between susceptible hamsters and resistant mice. **Infect. Immun.**, v. 79, n. 11, p. 4480–4492, 2011.

- MATSUNAGA, J. et al. Response of *Leptospira interrogans* to physiologic osmolarity: relevance in signaling the environment-to-host transition. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 6, p. 2864–2874, 2007.
- MATSUO, K. et al. Frontiers of transcutaneous vaccination systems: Novel technologies and devices for vaccine delivery. **Vaccine**, v. 31, n. 19, p. 2403–2415, 2013.
- MATZINGER, P. The danger model: a renewed sense of self. **Science**, v. 296, n. 5566, p. 301–305, 2002.
- McGRATH, H. et al. Phagocytosis of virulent and avirulent leptospire by guinea-pig and human polymorphonuclear leukocytes *in vitro*. **Pathology**, v. 16, n. 3, p. 243–249, 1984.
- MERIEN, F.; BARANTON, G.; PEROLAT, P. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 2, p. 729–728, 1997.
- MILLER, M. A.; PISANI, E. The cost of unsafe injections. **Bull. World Health Organ.**, v. 77, n. 10, p. 808-811, 1999.
- MINSAP. National Direction of Epidemiology. **National Programs of Prevention and Control of the human Leptospirosis**. 2a. ed. Havana, 1998. p. 1-95.
- MITRAGOTRI, S. Immunization without needles. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 5, n. 12, p. 905–916, 2005.
- MONTEIRO-RIVIERE, N. A. Structure and function of skin. In _____. **Toxicology of the Skin**. New York: Informa Healthcare USA, 2010. p. 1–18.
- MOYLETT, E. H.; HANSON, C. I. Mechanistic actions of the risks and adverse events associated with vaccine administration. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 114, n. 5, p. 1010–1020, 2004.
- MURRAY, G. L. et al. *Leptospira interrogans* requires a functional heme oxygenase to scavenge iron from hemoglobin. **Microb. Infect.**, v. 10, n. 7, p. 791–797, 2008.
- MURRAY, G. L. et al. *Leptospira interrogans* requires heme oxygenase for disease pathogenesis. **Microb. Infect.**, v. 11, n. 2, p. 311–314, 2009.
- MURRAY, G. L. et al. Mutations affecting *Leptospira interrogans* lipopolysaccharide attenuate virulence. **Mol. Microbiol.**, v. 78, n. 3, p. 701–709, 2010.
- NAHORI, M. A. et al. Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. **J. Immunol.**, v. 175, n. 9, p. 6022–6031, 2005.

NALLY, J. E. et al. Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. **Am J Pathol.**, v. 164, n. 3, p. 1115-1127, 2004.

NALLY, J. E. et al. Characterization of the outer membrane proteome of *Leptospira interrogans* expressed during acute lethal infection. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 2, p. 766-773, 2007.

NARAYANAVARI, S. A. et al. Multiple leptospiral sphingomyelinases (or are there?). **Microbiology**, v. 158, Pt 5, p. 1137–1146, 2012.

NASCIMENTO, A. L. T. O. 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, 2004.

NIR, Y. et al. Fear of injections in young adults: prevalence and associations. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 68, n. 3, p. 341–344, 2003.

NOGEE, L. M. Alterations in SP-B and SP-C expression in neonatal lung disease. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 66, p. 601–623, 2004.

O'HAGAN, D. T., RAPPUOLI, R. Novel approaches to vaccine delivery. **Pharm. Res.**, v. 21, n. 9, p. 1519–1530, 2004.

OPS. Main infectious illnesses in Central America during 1998, before and after Mitch. **Pan American Public Health Journal**, v. 6, n. 6, p. 1-30, 1999.

PALANIAPPAN, R. U. M. et al. Immunoprotection of recombinant Leptospiral immunoglobulin-like protein A against *Leptospira interrogans* serovar *Pomona* infection. **Infect Immun.**, v. 74, n. 3, p. 1745–1750, 2006.

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

PICARDEAU, M. et al. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. **PLoS One**, v. 13, n. 2, e1607, 2008.

PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Med. Mal. Infect.**, v. 43, n. 1, p. 1–9, 2013.

POLAT, B. E.; BLANKSCHTEIN, D.; LANGER, R. Low-frequency sonophoresis: application to the transdermal delivery of macromolecules and hydrophilic drugs. **Expert Opin. Drug Deliv.**, v. 7, n. 12, p. 1415–1432, 2010.

PRAUSNITZ, M. R. et al. Electroporation of mammalian skin: a mechanism to enhance transdermal drug delivery. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 90, n. 20, p. 10504–10508, 1993.

PRAUSNITZ, M. R.; MITRAGOTRI, S.; LANGER, R. Current status and future potential of transdermal drug delivery. **Nat. Rev. Drug. Discov.**, v. 3, n. 2, p. 115–124, 2004.

PRAUSNITZ, M. R.; Langer, R. Transdermal drug delivery. **Nat. Biotechnol.**, v. 26, n. 11, p. 1261–1268, 2008.

PRINCIPE, A. H. Polyethylene glycols. Studies of absorption, excretion, retention, and identification. **J. Forensic. Sci.**, v. 13, n. 1, p. 90–113, 1968.

PRÜSS-USTUN, A.; RAPITI, E.; HUTIN, Y. Estimation of the global burden of disease attributable to contaminated sharps injuries among health-care workers. **Am. J. Ind. Med.**, v. 48, n. 6, p. 482–490, 2005.

QUINTILIO, W. et al. *Bordetella pertussis* monophosphoryl lipid A as adjuvant for inactivated split virion influenza vaccine in mice. **Vaccine**, v. 27, n. 31, p. 4219–4224, 2009.

REIHSNER, R.; BALOGH, B.; MENZEL, E. J. Two-dimensional elastic properties of human skin in terms of an incremental model at the *in vivo* configuration. **Med. Eng. Phys.**, v. 17, n. 4, p. 304–313, 1995.

REIS, R. B. et al. Impact of environment and social gradient on leptospira infection in urban slums. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 2, n. 4, e228, 2008.

REIS, E. A. et al. Cytokine response signatures in disease progression and development of severe clinical outcomes for leptospirosis. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 7, n. 9, e2457, 2013.

RENN, C. N. et al. TLR activation of Langerhans cell-like dendritic cells triggers an antiviral immune response. **J. Immunol.**, v. 177, n. 1, p. 298–305, 2006.

RILEY, L. W. et al. Slum health: diseases of neglected populations. **BMC Int. Health Hum. Rights**, v. 7, n. 2, p. 1–6, 2007.

RISTOW, P. et al. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. **PLoS Pathog.**, v. 3, n. 7, e97, 2007.

ROBERTS, M. S.; CROSS, S. E.; PELLETT, M. A. Skin transport. In: WALTERS, K. A, editor. **Dermatological and Transdermal Formulations**. New York: Marcel Dekker, 2002. p. 89–195.

ROBERTS, M. S.; WALTERS, K. A. Human skin morphology and dermal absorption. In: WALTERS, K. A, editor. **Dermal Absorption and Toxicity Assessment**. New York: Informa Healthcare, 2008. p. 1–15.

ROSARIO, L. A. R. et al. Efficacy of Leptospiral vaccine (vax-SPIRAL®) against challenge with strains isolated from leptospirosis epidemic in Nicaragua using the hamster as biomodel. **Vet. World**, v. 5, n. 1, p. 5–12, 2012.

SAALBACH, A. et al. Dermal fibroblasts promote the migration of dendritic cells. **J. Invest. Dermatol.**, v. 130, n. 2, p. 444–454, 2010.

SANFORD, J. C. et al. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. **Part. Sci. Technol.**, v. 5, n. 1, p. 27–37, 1987.

SANTANIRAND, P. et al. Obligatory role of gamma interferon for host survival in a murine model of infection with *Burkholderia pseudomallei*. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 7, p. 3593–3600, 1999.

SATO, M. et al. Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF- κ B activation and TNF- α secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A. **J. Immunol.**, v. 171, n. 1, p. 417–425, 2003.

SCHARTON, T. M.; SCOTT, P. Natural killer cells are a source of interferon γ that drives differentiation of CD4⁺ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. **J. Exp. Med.**, v. 178, n. 2, p. 567–577, 1993.

SCHRODER, J. M. et al. Who is really in control of skin immunity under physiological circumstances—lymphocytes, dendritic cells or keratinocytes? **Exp. Dermatol.**, v. 15, n. 11, p. 913–929, 2006.

SEIXAS, F. K. et al. Evaluation of different ways of presenting LipL32 to the immune system with the aim of developing a recombinant vaccine against leptospirosis. **Can. J. Microbiol.**, v. 53, n. 4, p. 472–479, 2007a.

SEIXAS, F. K. et al. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. **Vaccine**, v. 26, n. 1, p. 88–95, 2007b.

SEN, D. et al. Selective and site-specific mobilization of dermal dendritic cells and Langerhans cells by Th1- and Th2- polarizing adjuvants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 107, n. 18, p. 8334–8339, 2010.

SHIN, S. C. et al. Development of tretinoin gels for enhanced transdermal delivery. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 60, n. 1, p. 67–71, 2005.

SHIRAKI, Y. et al. Cytokine secretion profiles of human keratinocytes during *Trichophyton tonsurans* and *Arthroderma benhamiae* infections. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, Pt. 9, p. 1175–1185, 2006.

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

SIMONSEN, L. et al. Unsafe injections in the developing world and transmission of bloodborne pathogens: a review. **Bull. World Health Organ.**, v. 77, p.789–800, 1999.

SINGH, M.; O'HAGAN, D. T. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. **Int. J. Parasitol.**, v. 33, n. 5-6, p. 469-478, 2003.

SMYTH Jr., H. F et al. Some pharmacological properties of polyethylene glycols of high molecular weight ("carbowax" compounds). **J. Ind. Hyg. Toxicol.**, v. 24, p. 281–284, 1942.

SMYTHE, L. D. et al. The microscopic agglutination test (MAT) is an unreliable predictor of infecting *Leptospira* serovar in Thailand. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, n. 4, p. 695–297, 2009.

SUGITA, K. et al. Innate immunity mediated by epidermal keratinocytes promotes acquired immunity involving Langerhans cells and T cells in the skin. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 147, n. 1, p. 176–183, 2007.

TADA, Y. et al. Langerhans cells do not produce interferon- γ . **J. Invest. Dermatol.**, v. 120, n. 5, p. 891–892, 2003.

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

TEZEL, A. et al. Low-frequency ultrasound as a transcutaneous immunization adjuvant. **Vaccine**, v. 23, n. 29, p. 3800–3807, 2005.

THIERMANN, A. B. Leptospirosis: current development and trends. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 184, n. 6, p. 722–725, 1984.

THOELLEN, S. et al. Safety and immunogenicity of hepatitis B vaccine formulated with a novel adjuvant system. **Vaccine**, v. 16, n. 7, p. 708-714, 1998.

THOMAS D. D.; HIGHBLE, L. M. *In vitro* association of *Leptospira* with host cells. **Infect. Immun.**, v. 58, n. 3, p. 581-585, 1990.

Toxinologia Aplicada. Disponível em <<http://ltc.nutes.ufrj.br/toxicologia/mll.pele.htm>>
Acesso em: 10 ago.15

TREGGAR, R. T. The permeability of mammalian skin to ions. **J. Invest. Dermatol.**, v. 46, n. 1, p. 16–23, 1966.

TRIM, J. C.; ELLIOTT, T. S. J. A review of sharps injuries and preventative strategies. **J. Hosp. Infect.**, v. 53, p. 237–242, 2003.

TRIPATHY, D. N. et al. Evaluation of the immune response of cattle to single and multiple vaccination with a polyvalent leptospiral bacterin. **Proc. Annu. Meet U. S. Anim. Health Assoc.**, v. 80, p. 173-181, 1976.

TURNER, L. H. Leptospirosis. **BMJ**, v. 1, n. 5638, p. 231–235, 1969.

- UCHIDA, M. et al. Transfection by particle bombardment: Delivery of plasmid DNA into mammalian cells using gene gun. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1790, n. 8, p. 754–764, 2009.
- VAN DAMME, P. et al. Safety and efficacy of a novel microneedle device for dose sparing intradermal influenza vaccination in healthy adults. **Vaccine**, v. 27, n. 3, p. 454–459, 2009.
- VERONESE, F. M. et al. Polyethylene glycol-superoxide dismutase, a conjugate in search of exploitation. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v. 54, n. 4, p. 587-606, 2002.
- VIJAYACHARI, P. et al. Evaluation of darkground microscopy as a rapid diagnostic procedure in leptospirosis. **Indian J. Med. Res.**, v. 114, p. 54–58, 2001.
- VILLUMSEN, S. et al. Novel TaqMan® PCR for detection of *Leptospira* species in urine and blood: Pit-falls of in silico validation. **J. Microbiol. Methods**, v. 91, n. 1, p. 184–190, 2012.
- VINH, T.; ADLER, B.; FAINE, S. The role of macrophages in the protection of mice against leptospirosis: *in vitro* and *in vivo* studies. **Pathology**, v. 14, n. 4, p. 463–468, 1982.
- VIRIYAKOSOL, S. et al. Toll-like receptor 4 protects against lethal *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae infection and contributes to *in vivo* control of leptospiral burden. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 2, p. 887–895, 2006.
- VITORIANO-SOUZA, J. et al. Cell Recruitment and Cytokines in Skin Mice Sensitized with the Vaccine Adjuvants: Saponin, Incomplete Freund's Adjuvant, and Monophosphoryl Lipid A. **PLoS One**, v. 7, n. 7, e40745, 2012.
- WANG, Z.; JIN, L.; WEGRZYN, A. Leptospirosis vaccines. **Microb. Cell Factories**, v. 6, n. 39, p. 1-10, 2007.
- WANG, H. et al. Leptospiral hemolysins induce proinflammatory cytokines through Toll-like receptor 2-and 4-mediated JNK and NF-κB signaling pathways. **PLoS One**, v. 7, n. 8, e42266, 2012.
- WERTS, C. et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. **Nat. Immunol.**, v. 2, n. 4, p. 346–352, 2001.
- WOOD, L. C. et al. Cutaneous barrier perturbation stimulates cytokine production in the epidermis of mice. **J Clin Invest.**, v. 90, n. 2, p. 482-487, 1992.
- WU, C. et al. Innate immune modulation of keratinocytes by antikeratin 16 antibodies. **Exp. Dermatol.**, v. 17, n. 8, p. 645–652, 2008.
- YAGI, H. et al. Induction of therapeutically relevant cytotoxic T lymphocytes in humans by percutaneous peptide immunization. **Cancer Res.**, v. 66, n. 20, p. 10136–10144, 2006.

- YAN, W. et al. 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.
- YANG, C. W. et al. The *Leptospira* outer membrane protein LipL32 induces tubulointerstitial nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells. **J Am Soc Nephrol.**, v. 13, n. 8, p. 2037–2045, 2002.
- YANG, C. W. et al. Toll-like receptor 2 mediates early inflammation by leptospiral outer membrane proteins in proximal tubule cells. **Kidney Int.**, v. 69, n. 5, p. 815-822, 2006.
- YORK, C. J. Combined viral and bacterial antigens for canine vaccines. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 149, n. 5, p. 681-685, 1966.
- ZHANG, Y. X. et al. Cytotoxic activity and probable apoptotic effect of Sph2, a sphingomyelinase hemolysin from *Leptospira interrogans strain Lai*. **BMB Rep.**, v. 29, n. 41, p. 119–125, 2008.
- ZHANG, L. et al. The mammalian cell entry (Mce) protein of pathogenic *Leptospira* species is responsible for RGD motif-dependent infection of cells and animals. **Mol. Microbiol.**, v. 83, n. 5, p. 1006–1023, 2012.
- XUE, F. Responses of Murine and Human Macrophages to Leptospiral Infection: A Study Using Comparative Array Analysis. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 7, n. 10, e2477, 2013.