

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**

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

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).

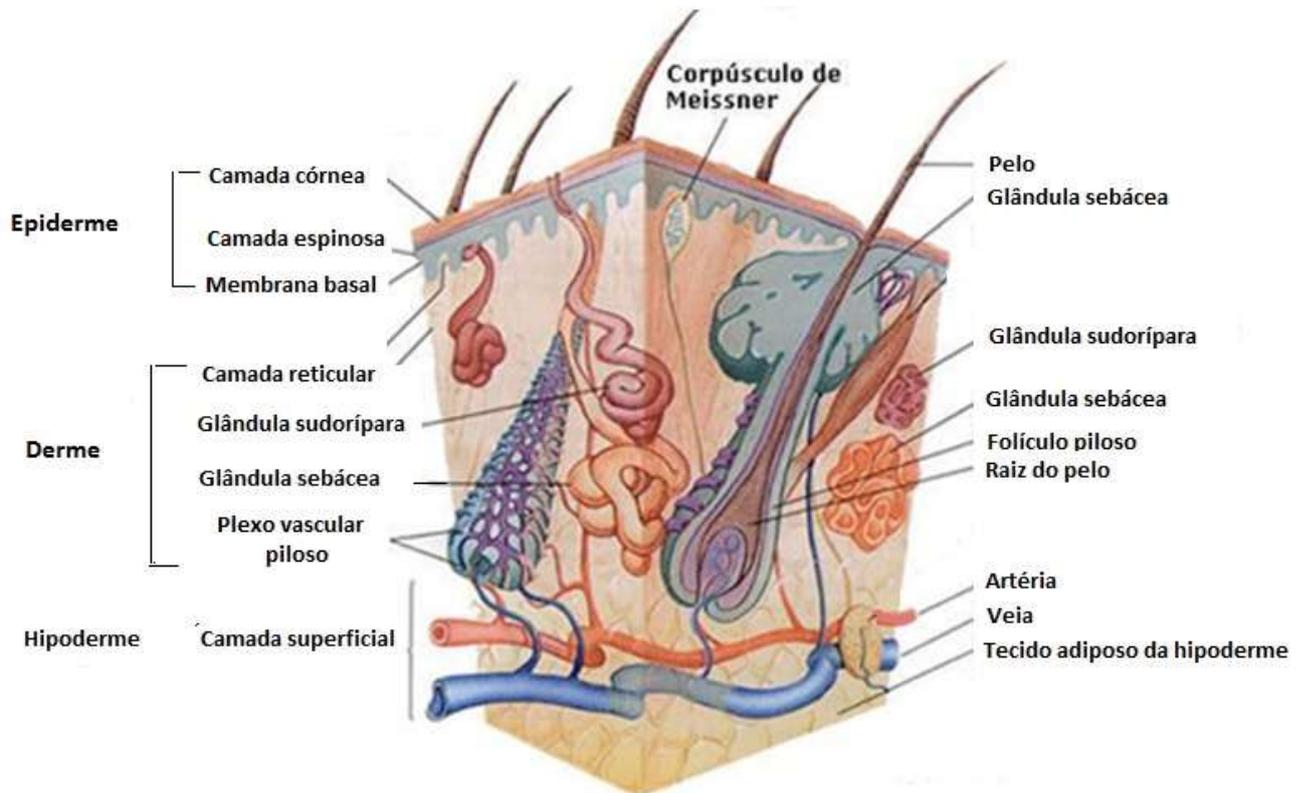


Figura 1 - Estrutura da pele. A pele é composta por duas principais camadas: epiderme e derme. A hipoderme é a camada mais inferior, subjacente à derme. A função de barreira da pele é localizada na camada mais superficial, o estrato córneo.

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).

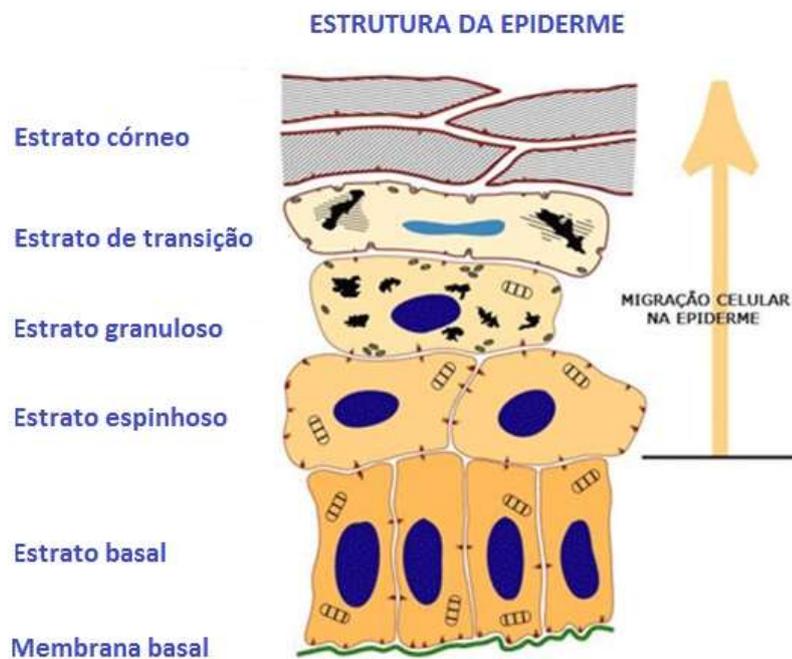


Figura 2 - Estrutura da epiderme. A epiderme é composta por cinco estratos, sendo o estrato basal o mais profundo, seguido dos estratos espinhoso, granuloso e de transição, até a camada mais externa da epiderme, o estrato córneo.

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).

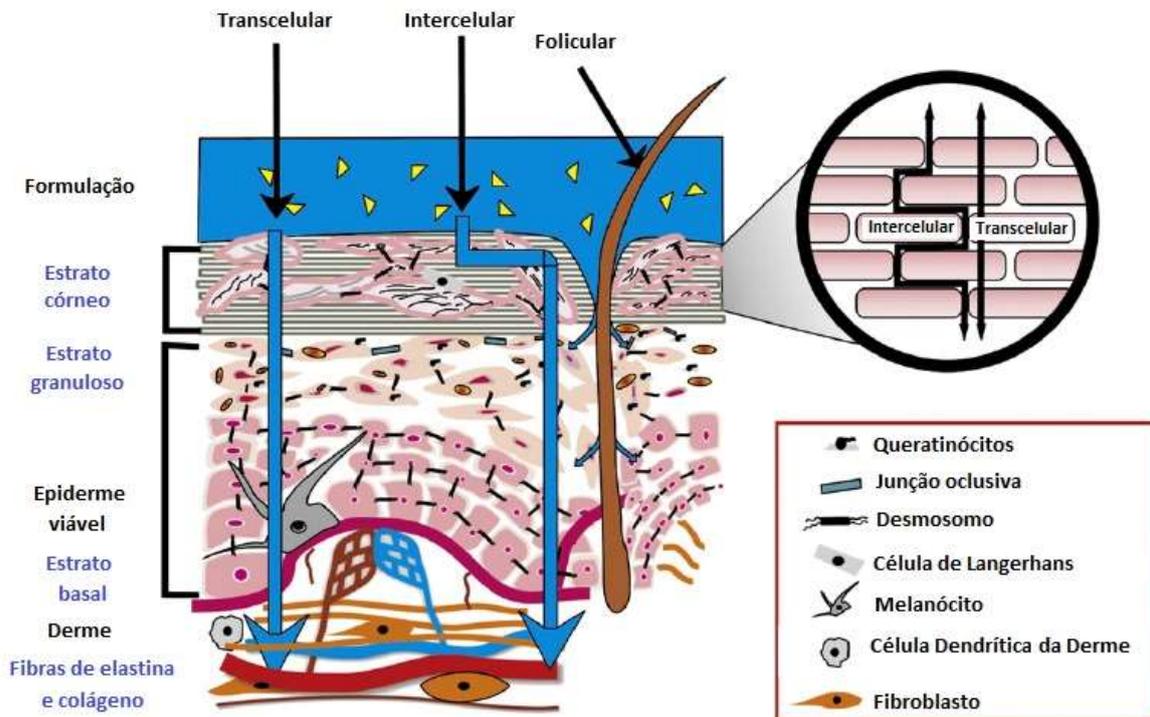


Figura 3 - Representação esquemática das vias de penetração, mostrando as diferenças entre as principais vias. As vias transcelular e intercelular estão representadas no canto superior direito.
Fonte: ALEXANDER et al., 2012

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).

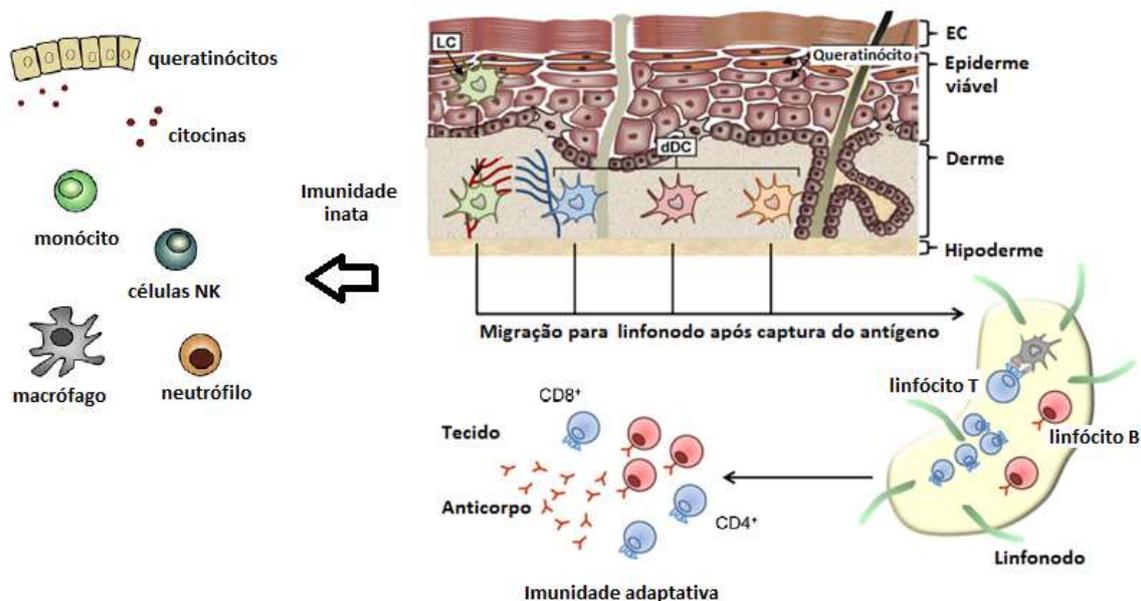


Figura 4 - Sistema imune da pele. A pele possui várias células imunocompetentes, tais como Células de Langerhans (LCs), queratinócitos, e várias células dendríticas da derme (dDCs). Os queratinócitos estão envolvidos principalmente na indução da imunidade inata. LCs e dDCs capturam o antígeno externo, 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 leptospiras 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).

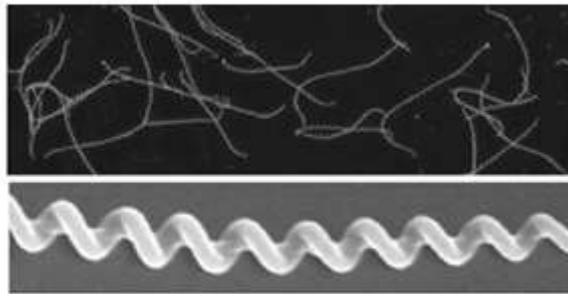


Figura 5 - Micrografias eletrônicas de leptospiras. *Leptospiras* são bactérias finas e em forma de hélice, com diâmetro de 0,15 a 0,3 μm e comprimento de 6 a 20 μm .

Fonte: PICARDEAU, 2013

As leptospiras 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).

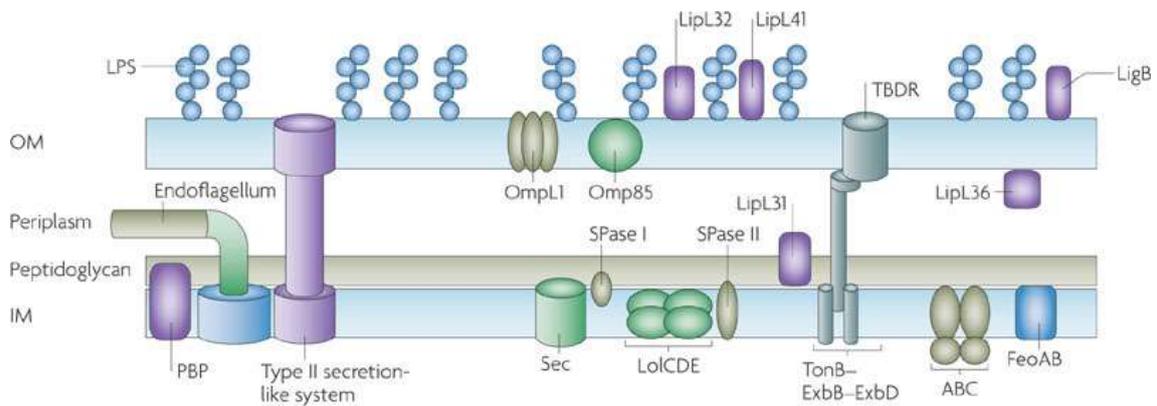


Figura 6 - Representação esquemática da arquitetura da leptospira.
Fonte: KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009

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 leptospiras, 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 incluídos 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).

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://lct.nutes.ufrj.br/toxicologia/ml.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.