

LUANA MELO LOPES

**CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS
CANDIDATAS VACINAIS DE *LEPTOSPIRA INTERROGANS*
SOROVAR COPENHAGENI.
AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES IMUNOGÊNICAS E
CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS**

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

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador:
Dr. Alexandre Paulo Yague Lopes

Co-Orientador:
Dra. Elizabeth Angélica Leme Martins

São Paulo

2009

RESUMO

LOPES, L. M. **Clonagem, expressão e purificação de proteínas candidatas vacinais de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni. Avaliação de atividades imunogênicas e características funcionais.** 2009. 92 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial, causada pela bactéria espiroqueta aeróbia do gênero *Leptospira*. A forma grave da leptospirose é denominada doença de Weil. A leptospira é eliminada na urina de animais, sendo o rato de esgoto (*Rattus norvegicus*) o principal reservatório para a infecção em humanos. A gravidade e frequência da doença impõem a necessidade de desenvolvimento de uma vacina de subunidade, de baixo custo, eficaz e que determine memória imune para uso em humanos. Propusemos a investigação de 4 antígenos, VapB, VapC, Sph2 e uma proteína de camada S, cujos genes LIC12659, LIC12660, LIC12631 e LIC10868, foram clonados para expressão em *E. coli* e em salmonela SL3261. Estas proteínas são potencialmente relacionadas à virulência e à interação patógeno-hospedeiro, participando em mecanismos de invasão e adesão. A proteína VapC (proteína associada a virulência C) é uma toxina, cuja atividade ribonuclease foi descrita para a proteína homóloga de *Haemophilus influenza*. VapC tem seu efeito neutralizado pela VapB (proteína associada a virulência B) que é uma antitoxina. O par de proteínas VapB e VapC possui homólogos em diversas bactérias e os genes codificadores são organizados em um operon, denominado *vapBC*. A proteína Sph2 apresenta homologia com hemolisina e esfingomielinase. A quarta proteína é homóloga a proteínas de camada S, associada à integridade da estrutura da superfície da bactéria. Os genes foram amplificados por PCR sobre o DNA genômico da *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni, clonados nos vetores de expressão pAE e pAEsox. As proteínas, VapB, VapC, VapBC e Sph2 foram expressas em *E. coli* BL21 (DE3) Star pLysS. As proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade a metal. A expressão das proteínas VapB, VapC e VapBC também foi obtida em salmonela *in vitro*. As atividades hemolítica de Sph2 e ribonucleásica de VapC não foram evidenciadas, possivelmente devido a diferenças estruturais entre as proteínas recombinantes e as nativas. No entanto, os clones de *E. coli* contendo os genes relacionados ao módulo toxina-antitoxina – *vapBC* – sofreram os efeitos de inibição de crescimento (*vapC*) e recuperação do mesmo (*vapBC*) previamente descritos. As proteínas recombinantes utilizadas nos ensaios imunológicos, VapB e Sph2, mostraram-se imunogênicas em camundongos e hamsters. A proteína VapB apresentada ao sistema imune como salmonela recombinante também induziu resposta imune em hamsters. Ensaio de Western Blot confirmaram o reconhecimento das proteínas recombinantes por anticorpos dos soros dos animais imunizados. A imunização com Salmonela-VapB determinou a maior imunidade protetora no teste de desafio (30% de sobrevivência).

Palavras-chave: *Leptospira*. Leptospirose. Clonagem, expressão e purificação de proteínas recombinantes. Vacinologia reversa. Salmonela vacinal.

ABSTRACT

LOPES, L. M. **Cloning, expression and purification of proteins, vaccine candidates from *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni. Evaluation of immunogenic and functional characteristics.** 2009. 92 p. Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Leptospirosis is a zoonosis worldwide distributed, caused by the aerobic bacteria spirochaeta, genus *Leptospira*. The severe form of the disease is named Weil's disease. The leptospira is eliminated in the urine of animals, being the sewer rat (*Rattus norvegicus*) the main reservoir for human infection. The severity and frequency of the disease impose the need for the development of an efficient vaccine of sub-unities, at low costs, which determines long term immune response for human uses. We proposed the investigation of 4 antigens, VapB, VapC, Sph2 and a S-layer protein, which the genes LIC12659, LIC12660, LIC12631 and LIC10868, were cloned for expression in *E. coli* and in salmonella SL3261. These proteins are considered potentially related to the virulence of the pathogen by participation on host/pathogen interactions, invasion and adhesion mechanisms. The protein VapC (virulence associated protein C) is a toxin. Ribonuclease activity was described for the VapC homolog in *Haemophilus influenza*. VapC has its effect neutralized by VapB (virulence associated protein B) an antitoxin. The pair of proteins VapB and VapC posses homologs in many other bactéria, with the coding genes organized in an operon named *vapBC*. The protein Sph2 is homolog to other hemolysins and sphingonyelinases. The fourth protein is homolog to proteins from S-layer, associated to the integrity of the structure of the cell surface. The genes were amplified by PCR using genomic DNA from *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni as template and cloned into expression vectors pAE e pAEsox. The proteins VapB, VapC, VapBC and Sph2 were expressed in *E. coli* BL21 (DE3) Star pLysS for protein purification by metal affinity chromatography. The expression of the proteins VapB, VapC and VapBC were also obtained in salmonella *in vitro*. The hemolytic activity of Sph2 and the ribonuclease activity of VapC could not be confirmed, probably due to the differences on the structures of native and recombinant proteins. The *E. coli* clones with the genes related to toxin-antitoxin module - *vapBC* – suffered the effects of growth inhibition (*vapC*) and recovery of growth (*vapBC*) previously described. The recombinant proteins VapB and Sph2 showed to be immunogenic in mice and in hamsters. The protein VapB presented to the immune system of hamsters carried by salmonella also induced immune response. Western blot assays confirmed the recognition of the recombinant proteins by the antibodies in the sera of immunized animals. The immunization with Salmonella-VapB determined the major protective immunity on challenge assays (30% survival).

Key words: Leptospira. Leptospirosis. Cloning, expression and purification of recombinant proteins. Reverse vaccinology. Vaccine salmonella.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leptospirose e leptospiras

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial com maior prevalência em países tropicais e subtropicais. Nos países desenvolvidos, a leptospirose está geralmente associada a atividades de recreação, ao passo que no Brasil e em outros países em desenvolvimento está associada com o rápido crescimento populacional, aumento de favelas, enchentes e a falta de saneamento básico. Estas condições favorecem a proliferação de roedores, vetores importantes de transmissão da leptospirose, principalmente em áreas urbanas (KO *et al.*, 1999; LOMAR *et al.*, 2000; PLANK e DEAN, 2000; BHARTI *et al.*, 2003; GAMBERINI *et al.*, 2005). A leptospirose é considerada também uma doença ocupacional, pois atinge trabalhadores de serviços de água e esgotos, canaviais, arrozais, bebedouros, tratadores de animais, veterinários, militares, dentre outros (SAKATA *et al.*, 1992; PLANK e DEAN, 2000; BHARTI *et al.*, 2003). A leptospirose representa um problema econômico para o Sistema de Saúde Público, pois o tratamento requer hospitalização e cerca de 15% dos pacientes vão a óbito (KO *et al.*, 1999).

A leptospirose humana é uma doença de notificação compulsória no Brasil. De 1985 a 2005 foram notificados 60.753 casos e 6.778 óbitos segundo o Sistema de Vigilância Epidemiológica. Os casos notificados à FUNASA/MS devem ser 10 a 20 vezes menor que a ocorrência, uma vez que as infecções são, em sua maioria, erroneamente diagnosticadas e não notificadas, (NICODEMO *et al.*, 1997; MAROTO *et al.*, 1997). Só no estado de São Paulo, no ano de 2006, ocorreram 1060 casos e 132 óbitos (Centro de Zoonoses - Centro de Vigilância Epidemiológica).

Recentemente, no final de novembro passado, nos vinte e seis dos 47 municípios atingidos pelas chuvas que castigaram o estado de Santa Catarina, foram registrados 301 casos de leptospirose confirmados pela Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Estado da Saúde de Santa Catarina.

A leptospirose foi primeiramente descrita em 1886 por Adolf Weil. O agente etiológico da doença são espiroquetas patogênicas, pertencentes à Ordem *Spirochaetales*, Família *Leptospiraceae* e Gênero *Leptospira*. São microrganismos aeróbios obrigatórios, helicoidais, flexíveis e móveis que medem de 6 a 20 µm de comprimento e 0,1 µm de diâmetro. Apresentam as extremidades dobradas ou em

forma de ganchos e são constituídas por um corpo citoplasmático e filamento axial enrolados em espiral, sendo ambos envolvidos por uma membrana denominada envelope ou membrana envolvente. O citoplasma é envolvido por uma membrana citoplasmática e uma camada de peptidoglicano formando um complexo. O complexo basal destes flagelos é semelhante ao de uma bactéria Gram-negativa, contudo com baixa atividade endotóxica (TRABULSI, 1996; PLANK e DEAN, 2000; VERONESI, 2004; CORRÊA, 2005).

Primeiramente o gênero *Leptospira* foi dividido em duas espécies pela classificação fenotípica: *L. biflexa* (sorovares saprófitos, de vida livre) e *L. interrogans* (sorovares patogênicos) (LEVETT, 2001). Atualmente a classificação genotípica identifica 17 espécies de *Leptospira*: *L. interrogans*, *L. biflexa*, *L. alexandrei*, *L. alexandrei*, *L. fainei*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. inadai*, *L. noguchii*, *L. weilli*, *L. kirshneri*, *L. meyeri*, *L. wolbachii*, e as geno-espécies 1, 2, 3, 4 e 5, ainda sem denominação (BHARTI *et al.*, 2003). Elas também são classificadas de acordo com o sorovar, o que está relacionado com anticorpos específicos determinados pela variação na porção e tipos de carboidrato do lipopolisacarídeos (LPS). Existem mais de 226 sorovares nos 24 sorogrupos fenotipicamente agrupados como *L. interrogans* e 65 sorovares agrupados em 38 sorogrupos fenotipicamente agrupados como *L. biflexa* (FARR, 1994; FAINE *et al.*, 1999; PLANK e DEAN, 2000; LEVETT, 2001; BHARTI *et al.*, 2003; NASCIMENTO *et al.*, 2004; GAMBERINI *et al.*, 2005; VERONESI, 2004; CORRÊA, 2005).

A *Leptospira interrogans* (fig.1) abrange todos os sorotipos associados a infecções humanas e animais (TRABULSI, 1996), atingindo animais domésticos (cães, gatos) e outros de importância econômica (bois, cavalos, porcos, cabras, ovelhas) (PLANK e DEAN, 2000; BHARTI *et al.*, 2003; NASCIMENTO *et al.*, 2004). Os variantes da bactéria não possuem especificidade por determinados hospedeiros, mas possuem certas preferências. Por exemplo, o sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* é o mais importante em termos de saúde pública já o sorogrupo *Pomona* tem tropismo pelos suínos e o *Hardjo*, por bovinos. O sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* tem como hospedeiro preferencial o rato de esgoto (*Rattus norvegicus*), considerado o principal transmissor da leptospirose para o homem, pela proximidade e por existir em grande número. Os roedores das espécies *Rattus rattus* (rato de telhado ou rato preto) e *Mus musculus* (camundongo ou catita) também

podem desempenhar o papel de transmissor (Coordenação de vigilância em saúde COVISA-SP; NASCIMENTO *et al.*, 2004).

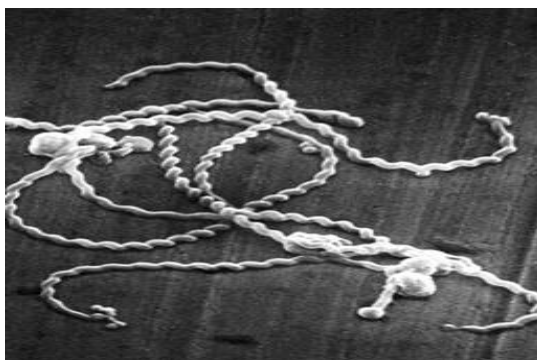


FIGURA 1- Microscopia eletrônica de varredura de *Leptospira interrogans*.

A *L. interrogans* sorovar Copenhageni e *L. interrogans* sorovar *Icterohaemorrhagiae* são os principais agentes etiológicos dos casos de leptospirose em humanos no Brasil, onde a incidência da doença é maior no período de janeiro a abril; sendo o sorovar Copenhageni mais comum nas regiões Sudeste e Nordeste do país (VERONESI, 2004; CORRÊA, 2005).

A imunidade à infecção inicial por leptospiras é dependente basicamente de resposta humoral, majoritariamente contra os LPSs (ADLER e FAINE, 1978). A opsonização das bactérias permite que sejam fagocitadas e eliminadas da corrente sanguínea no começo da infecção (FAINE *et al.*, 1964). Indivíduos que contraem leptospirose ficam protegidos contra a reinfecção pelo mesmo sorovar ou por sorovares relacionados por certo período de tempo (LEVETT, 2001).

Roedores peridomiciliares e silvestres são portadores naturais de leptospiras com ampla dispersão geográfica. Animais domésticos, principalmente os bovinos, suínos e cães são importantes na cadeia epidemiológica e podem ser portadores de determinados sorovares por períodos prolongados. Nos portadores naturais a infecção é crônica com colonização da bactéria nos túbulos renais e eliminação intermitente através da urina, sem evidências de alterações patológicas. As interações da espiroqueta com os hospedeiros constituem processos dinâmicos, sendo que os hospedeiros podem ser suscetíveis a determinados sorovares e refratários a outros (CORRÊA, 2005).

A *L. interrogans* multiplica-se nos rins dos animais portadores sem causar danos. A bactéria é eliminada pela urina, às vezes por toda a vida do animal, e sobrevive no solo úmido ou na água. O homem é infectado casual e

transitoriamente, e não tem importância como transmissor da doença. A transmissão de uma pessoa para outra é muito pouco provável (MURRAY *et al.*, 2000; PLANK e DEAN, 2000; BHARTI *et al.*, 2003).

A transmissão ao homem pode ocorrer por contato direto com sangue, tecidos, órgãos ou urina de animais infectados, ou, por via indireta, através do contato com água, lama das enchentes ou solo contaminado com a urina dos animais portadores. Também pode ocorrer a transmissão acidental em laboratório, por mordedura de ratos e pela via transplacentária que é rara em humano e comum em animais (VERONESI, 2004).

Após penetrar pela mucosa ou pele, as bactérias disseminam-se rapidamente pela circulação sanguínea para todos os tecidos, incluindo o sistema nervoso central e os olhos, porém, com localização especial em determinados órgãos, particularmente fígados, rins, coração e músculo esquelético. A bactéria multiplica-se rapidamente e provoca lesão no endotélio vascular, a que é responsável pelas principais manifestações clínicas da doença (intensa vasculite). Os microrganismos, no estágio inicial da doença, podem ser encontrados no sangue (fase leptospirêmica) e líquido cefalorraquidiano e, nas fases mais avançadas, na urina (fase imune ou leptospúrica) (MURRAY *et al.*, 2000; PLANK e DEAN, 2000; BROD *et al.*, 2005).

As leptospiros são microrganismos que usam ácidos graxos como fonte de energia e aderem à membrana celular, o que pode ser interpretado como um passo inicial importante no estabelecimento da infecção (VERONESI, 2004).

A manifestação clínica da leptospirose é facilmente confundida com os sintomas de outras doenças, como a gripe e a dengue. As manifestações iniciais são febre alta de início súbito, sensação de mal estar, dor de cabeça constante e acentuada, dor muscular intensa (principalmente na panturrilha), cansaço, calafrios e é caracterizada por intensa vasculite. Dor abdominal, náuseas, vômitos e diarreia são frequentes, podendo levar à desidratação. É comum que os olhos fiquem acentuadamente avermelhados (hiperemia conjuntival) e que alguns doentes apresentem tosse e faringite. Após dois ou três dias de aparente melhora, os sintomas podem ressurgir, ainda que menos intensamente. Nesta fase é comum o aparecimento de manchas avermelhadas no corpo (exantema) e pode ocorrer meningite, que em geral tem boa evolução (PLANK e DEAN, 2000; BHARTI *et al.*, 2003; NASCIMENTO *et al.*, 2004).

Em cerca de 10% dos pacientes, a partir do terceiro dia de doença surge icterícia intensa (olhos amarelados), o que caracteriza os casos mais graves. Esses casos são mais comuns (90%) em adultos jovens do sexo masculino e raro em crianças. Aparecem manifestações hemorrágicas (equimoses, sangramentos em nariz, gengivas e pulmões) e pode ocorrer funcionamento inadequado dos rins, o que causa diminuição do volume urinário e, às vezes, anúria total. A forma grave da leptospirose é denominada doença de Weil. A evolução para a morte pode ocorrer em cerca de 10% a 15% dos pacientes com formas graves da doença (MURRAY *et al.*, 2000; PLANK e DEAN, 2000; LEVETT, 2001; NASCIMENTO *et al.*, 2004; GAMBERINI *et al.*, 2005). A forma grave da leptospirose é comumente associada ao sorogrupo *Icterohaemorrhagie* (BHARTI *et al.*, 2003).

Para o diagnóstico da leptospirose, testes sorológicos são os mais comumente empregados. Um teste elaborado como referência pela Organização Mundial da Saúde é o teste de Microaglutinação (MAT). (LEVETT, 2003; SÃO PAULO, 1994; BROD *et al.*, 2005). Testes para detecção de IgM específica por reação de ELISA são feitos após 7 dias do início da doença. Se o exame der negativo, deve ser colhida amostra novamente após 7 dias (SÃO PAULO, 1994). Métodos moleculares estão sendo desenvolvidos, principalmente baseados *primers* específicos para PCR e análises de restrição (HEINEMANN *et al.*, 2000; LEVETT, 2001).

O tratamento da leptospirose é feito com Penicilina G cristalina e como alternativas, a Ampicilina, Tetraciclina ou Doxiciclina (MURRAY *et al.*, 2000). A terapia de suporte é importante para tratar sintomas como desidratação, febre, hipotensão, falência renal e hemorragia (KO *et al.*, 1999).

Na profilaxia da leptospirose o importante é impedir que o homem sadio entre em contato com águas ou animais contaminados, assim como a imunização dos animais domésticos e animais de rebanho.

1.2 Vacinas

Vacinas obtidas a partir de preparações de leptospira atenuada/inativada (bacterina), para uso veterinário, estão no mercado, porém sua capacidade imunogênica é baixa e não induz resposta imunológica contra outros sorovares

(FAINE *et al.*, 1999). Há relatos de animais que apresentam leptospiúria após a vacinação (PLANK e DEAN, 2000).

A gravidade e frequência da doença impõem à necessidade de desenvolvimento de uma vacina licenciada para uso humano. Atualmente existem vacinas humanas disponíveis, baseadas em preparações de leptospiras atenuada/inativadas (Cuba e Japão), ou baseadas em preparações da membrana externa (China). Tais vacinas são licenciadas somente nos países em que foram desenvolvidas.

Vários trabalhos têm sido publicados sobre o desenvolvimento de vacinas humanas contra a leptospirose. Entretanto, os resultados também são controversos. As vacinas testadas são produzidas a partir de culturas de diferentes sorovares de *L. interrogans*, e as culturas mortas pela ação do calor e/ou formol. Zhuo e colaboradores (1995) testaram uma vacina em área endêmica na China e observaram que crianças abaixo de 14 anos não estavam protegidas contra a doença. As vacinas obtidas a partir de bactérias inativadas ou atenuadas promovem imunidade timo-independente, com desvantagem de não induzir memória imunológica, além de serem impuras e reatogênicas, pois contêm contaminantes indesejáveis oriundos do próprio processo de obtenção. Nesse tipo de vacina, as bacterinas, a resposta imune primária contra os açúcares dos lipopolissacarídeos (LPS) da superfície das *Leptospira* que determinam a especificidade de sorogrupos e sorovares (BHARTHI *et al.*, 2003, FAINE *et al.*, 1999).

A variedade de sorovares em regiões distintas dificulta a obtenção de uma vacina única para prevenir a doença em humanos, o que conseqüentemente reduz o interesse comercial no desenvolvimento.

Atualmente, se busca é uma vacina de componente(s) bem definido(s) e sem contaminações, que induza resposta imunológica timo-dependente, com mínimos efeitos adversos e baixo custo. Com este objetivo, o genoma da espiroqueta *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni foi seqüenciado pelo Consórcio AEG–Agronomical & Environmental Genomes/ONSA/FAPESP, sob a coordenação geral da Dra. Ana Lúcia Tabet Oller do Nascimento (Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan) (NASCIMENTO *et al.*, 2004).

A partir de investigações sobre o genoma da bactéria, um projeto temático para desenvolvimento de vacinas foi proposto “Clonagem e expressão de candidatos vacinais contra a leptospirose identificados no projeto genoma *Leptospira*

interrogans sorovar Copenhageni”, sob coordenação do Dr. Paulo Lee Ho do Instituto Butantan, sendo o trabalho aqui descrito, parte desse projeto temático.

1.3 Genoma da *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni

Até o momento foram seqüenciados cinco genomas de linhagens de leptospiros: *Leptospira interrogans* sorovar Lai (REN *et al.*, 2003); *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni (NASCIMENTO *et al.*, 2004); duas linhagens de *Leptospira borgpetersenii* sorovar Hardjo (BULACH *et al.*, 2006) e mais recentemente o genoma da leptospira de vida livre *Leptospira biflexa* sorovar Patoc (PICARDEAU, 2008).

O genoma da *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni seqüenciado pertence a linhagem Fiocruz L1-130 que foi isolada de um paciente com leptospirose severa durante um surto epidêmico em Salvador (BA) ocorrido em 1996 pelo grupo do Dr. Albert Ko (Fiocruz - BA) (KO *et al.*, 1999). O isolado foi identificado e o DNA genômico extraído para o seqüenciamento pelo Consórcio descrito acima.

As duas espécies patogênicas para humanos, Copenhageni e Lai, possuem dois cromossomos, um maior (4,3 a 3,6 Mpb) e outro menor (358 a 316 kb) codificando cerca de 3700 genes. Na espécie de vida livre é observado, além dos dois cromossomos semelhantes ao das espécies patogênicas, uma terceira unidade de replicação de cerca de 74 kb. O genoma de leptospiros pode ser considerado grande quando comparado ao de outras espiroquetas, o que pode estar relacionado à habilidade da *Leptospira spp* de viver em diferentes condições, como no hospedeiro animal e livre no meio ambiente (BHARTI *et al.*, 2003).

Foram identificadas diversas proteínas a partir do seqüenciamento do genoma da *L. interrogans* sorovar Copenhageni considerados potenciais antígenos vacinais, com estruturas sugestivas de interação com o hospedeiro, ou atividades relacionadas com a patogênese (GAMBERINI *et al.*, 2005). Alguns genes associados com a patogênese estão indicados na tabela I.

TABELA 1 – Genes de *L. interrogans* sorovar Copenhageni possivelmente envolvidos na patogênese da bactéria.

Candidato	Nº de genes
LPS	23
Mobilidade e quimiotaxia	73
Proteínas de adesão e superfície	
- Adesinas afimbriais – domínio similar à imunoglobulina	3
- domínios repetidos de FG-GAP	3
- Proteínas similares à hemaglutininas	9
- Lipoproteínas	174
- Polissacarídeos capsulares / exopolissacarídeos secretados	33
Degradação da membrana celular do hospedeiro	
- Hemolisina similar à esfingomielinase C	5
- Homólogo da fosfolipase D	1
- Hemolisina (homólogos – <i>tlyABC</i>)	3
Proteases	
- Colagenase	1
- Metaloproteinase	1
- Termolisina	1
Proteínas similares à ankirina	12
Resistência ao estresse oxidativo	8

A resposta adaptativa da leptospira ao seu ambiente deve envolver uma rede complexa de sinalização, como é sugerido pelo número de genes (79) codificando proteínas com função regulatória e de transdução de sinal. Também ocorre um grande número de genes (79) envolvidos com motilidade celular e quimiotaxia, o que deve refletir a sua habilidade de responder à diversidade de estímulos ambientais, inclusive a capacidade de localização e penetração no hospedeiro e a posterior distribuição nos órgãos, ainda que não exista uma evidência direta que motilidade e quimiotaxia estejam envolvidos na entrada no hospedeiro (FAINE *et al.*, 1999). A disseminação da leptospira aos órgãos deve ser facilitada por enzimas como esfingomielinase C e pela fosfolipase D. A ação hemolítica também pode ser mediada por hemolisinas do tipo *tlyABC*, semelhante as observadas em *Serpulina*

hyodysenteriae. Colagenases, metaloprotease e termolisina foram identificadas como sendo lipoproteínas e devem estar relacionadas à invasão e patogenicidade destas bactérias. Fatores de colonização também devem participar na disseminação da leptospira nos órgãos do hospedeiro. Foram encontradas adesinas, algumas com estruturas repetitivas de imunoglobulinas e outras com estrutura de integrinas. Um grande número de genes relacionados à biosíntese de polissacarídeos capsulares foram evidenciados e outros sugerindo a possibilidade de leptospiros formar biofilmes durante a infecção. Também foram identificadas 174 lipoproteínas de superfície, o que as caracterizam como candidatos potenciais para antígenos vacinais e diagnósticos (NASCIMENTO *et al.*, 2004).

1.4 Genes de *L. interrogans* sorovar Copenhageni selecionadas para investigação neste projeto

A tabela 2 mostra os genes escolhidos após análise do genoma para desenvolvimento deste projeto.

TABELA 2 – Genes de *L. interrogans* svr Copenhageni selecionados para estudo.

Gene	Similaridade	Número de pares de bases	Número de aminoácidos da proteína codificada
LIC12659	VapB- proteína associada à virulência	231	77
LIC12660	VapC- proteína associada à virulência	399	132
LIC12631	Sph2- Hemolisina/ esfingomielinase	1872	624
LIC10868	Proteína associada à camada S	1395	465

As seqüências dos genes utilizados neste projeto estão depositadas no banco público de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e na página oficial do genoma da *L. interrogans* sorovar Copenhageni (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/world/lic/>).

Os 4 genes LIC12659, 12660, 12631 e 10868 codificam proteínas potencialmente relacionadas com virulência e com a interação patógeno-hospedeiro, como mecanismos de invasão e adesão.

O gene LIC 12659 codifica uma proteína identificada por Blast (“BLAST” – “Basic Local Alignment Search Tool”) como homologa a VapB – “virulence associated protein B” – descrita inicialmente em *Dichelobacter nodosus* e assim denominada por ter sido encontrada nos genomas de todos os isolados patogênicos, desta bactéria, causadora de *footrot* em ovinos (KATZ, 1991).

O gene LIC12660 codifica a proteína homologa a VapC – “virulence associated protein C”. A proteína VapC apresenta domínios PIN (supostamente relacionados com atividades ribonucleásicas, presentes em uma grande família de proteínas de eucariotos e procariotos (COOPER *et al.*, 2009). A maioria das proteínas que possuem este domínio são tóxicas (ARCUS *et al.*, 2005, BUNKER *et al.*, 2008). A proteína VapC é uma toxina, cuja atividade ribonuclease foi descrita para a proteína homóloga de *Haemophilus influenza* e tem seu efeito neutralizado pela VapB que é uma antitoxina (DAINES *et al.*, 2007).

O gene LIC12631 codifica uma hemolisina com 56% de similaridade com esfingomielinase de *Pseudomonas sp.* Foi classificada na categoria primária de “patogenicidade, virulência, adaptação, produção de toxina e detoxificação”. O programa PSORT indica que é uma proteína localizada na membrana interna da bactéria (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/world/lic/>).

A LIC10868 mostrou-se homologia com proteínas associadas à camada S (S-layer), que fornecem integridade na estrutura da superfície da bactéria, embora este tipo de proteína não tenha sido observada em leptospiros patogênicos, o genoma contém pelo menos 2 proteínas de camada S, LIC10868 e LIC 12952 (NASCIMENTO *et al.*, 2004).

1.4.1 Complexo toxina-antitoxina (*locus vapBC*)

Genomas de bactérias freqüentemente contêm vários *loci* toxina-antitoxina (TA). Eles são organizados em operons que codificam duas proteínas, a primeira, uma antitoxina, que neutraliza a segunda, uma toxina. Os módulos TA são divididos em 7 famílias de genes (*relBE*, *parDE*, *higBA*, *vapBC*, *mazEF*, *phD-doc* e *ccdAB*) e foram primeiramente encontrados em plasmídeos, principalmente em archaeas e

bactérias patogênicas e, por este motivo, foram relacionados com a virulência da bactéria. A família *vapBC* é a família mais abundante, representando cerca de 40% dos TA encontrados em bactérias Gram negativa, Gram positiva e também em archaea (BODOGAI *et al.*, 2008; COOPER *et al.*, 2009). De acordo com análise genômica comparativa *in silico*, as seqüências LIC12659 e LIC12660 formam um operon denominado *vapBC*. O módulo *VapBC* foi descrito em *Leptospira interrogans* serovar Lai e a expressão da *VapC* em *Escherichia coli* resultou na inibição do crescimento bacteriano, enquanto a co-expressão de *VapC* e *VapB* restaurou o crescimento (ZHANG *et al.*, 2004). De acordo com Daines e colaboradores (2007), a proteína *VapC* de *Haemophilus influenza* é uma toxina, com atividade ribonuclease, que tem seu efeito neutralizado pela *VapB*, a antitoxina.

Os módulos TA parecem possuir um importante papel dentro da fisiologia do estresse bacteriano. Em experiências laboratoriais foi evidenciado que os módulos TA proporcionam um mecanismo que ajuda as células a sobreviverem em condições de crescimento desfavoráveis em resposta ao estresse. Em condições normais a antitoxina inibe a toxina e o complexo TA age como um repressor sobre o operon TA, enquanto que, em condições de ativação, a velocidade de degradação proteolítica da antitoxina ultrapassa sua síntese (BUTS *et al.*, 2005; PANDEY e GERDES, 2005; GERDES *et al.*, 2005). Devido ao fato da antitoxina ser degradada continuamente, nova síntese é necessária para manter um elevado nível da antitoxina, que forma um complexo inibidor com a toxina. A degradação da antitoxina na ausência de nova síntese proteica leva à morte celular, uma vez que a toxina é menos vulnerável a ação proteolítica (HAYES e SAUER, 2003; BUTS *et al.*, 2005; ARCUS *et al.*, 2005).

Os módulos TA são ativados em condições de estresse, como a falta de aminoácidos, falta de timina, danos de DNA, presença de antibióticos ou infecção por fagos, sugerindo que os módulos TA estejam envolvidos na mediação da morte celular programada (BUTS *et al.*, 2005; GERDES *et al.*, 2005). A análise do transcriptoma de *Sulfolobus solfataricus*, que codifica pelo menos 26 *loci* de *vapBC*, sugere que o *locus* tem função na resposta ao choque térmico desta archaea, pois a expressão de vários operons *vapBC* foi disparada quando estas bactérias foram submetidas a elevações de temperatura (COOPER *et al.*, 2009).

1.4.2 Hemolisinas

As leptopiras dependem de ferro para crescer e se multiplicar e por isso a capacidade de gerar hemólise parece ser essencial para a sobrevivência e para a reprodução das leptospiras patogênicas, uma vez que o rompimento dos eritrócitos libera uma grande quantidade de ferro (WANDERSMAN e STOJIEJKOVIC, 2000).

Em leptopiras, a hemólise é caracterizada pela atividade de esfingomielinases, fosfolipases e de outras proteínas auxiliaadoras (LEE *et al.*, 2000). As leptopiras patogênicas possuem múltiplos genes que codificam para esfingomielinases, que podem estar associadas, além da aquisição de ferro, ao uso dos lipídeos de membrana como fonte de carbono e energia e à geração de morte celular no hospedeiro (CARVALHO, 2008).

A proteína Sph2 (LIC12631) possui um domínio exo-endo-phos (exonuclease-endonuclease-fosfatase), encontrado em diversas enzimas, incluindo as esfingomielinases. As esfingomielinases são enzimas responsáveis pela geração de ceramida e fosforilcolina a partir da hidrólise da esfingomielina (um fosfolípido constituinte da membrana plasmática). Em procariotos não são necessárias para o ciclo de vida, mas são encontradas freqüentemente em patógenos, atuando como toxinas. Em leptopiras os genes que codificam esfingomielinases são encontrados somente em linhagens patogênicas. A proteína Sph2 é produzida somente durante a infecção e foi relatada sua habilidade em romper membranas (CARVALHO, 2008; ARTIUSHIN *et al.*, 2004).

1.5 Salmonelas recombinantes como carregadores de antígenos vacinais

A salmonela é uma bactéria em forma de bastonete, Gram negativa, com características invasivas de mamíferos e com tropismo por macrófagos. Sobrevive nos fagolisossomos e utiliza mecanismos de defesa antioxidantes (TRABULSI, 1996).

Diferentes linhagens de salmonelas com patogenicidade atenuada têm sido utilizadas como vacinas vivas (GARMORY *et al.*, 2002). As bactérias atenuadas permanecem nos hospedeiros por tempo suficiente para estimular o sistema imune (ROSENKRANZ *et al.*, 2003). Antígenos de diversos patógenos, bacterianos,

protozoários e virais têm sido clonados em salmonela de maneira a induzir resposta imune nos hospedeiros (GARMORY *et al.*, 2002).

Existem diferentes linhagens mutantes de salmonelas desenvolvidas para utilização como vetores vacinais vivos. As linhagens mais importantes foram obtidas pela deleção dos genes *aro*, tornando as bactérias nutricionalmente dependentes de precursores aromáticos para síntese de aminoácidos aromáticos e vitaminas, limitando sua sobrevivência no tecido infectado e assim atenuando acentuadamente sua patogenicidade (CHATFIELD E DOUGAN, 1997; COYNAULT e NOREL, 1999).

A infecção natural por salmonelas se dá por via de mucosas (SIRARD *et al.*, 1999) e segue-se infecção sistêmica. Primariamente ocorre uma resposta imune para mucosas e então as respostas humoral e celular. Têm sido descritas manipulações genéticas com o fim de se obter proteínas quiméricas que direcionariam os antígenos no sistema imune dos hospedeiros de forma a modular as respostas segundo o tipo que se deseja priorizar (CHEN e SCHIFFERLI, 2000). Outro aspecto investigado é a capacidade das salmonelas atuarem como adjuvantes vacinais, dirigindo a resposta imune através de células Th1 (JÖRG LEHMANN *et al.*, 2006), além da resposta humoral mediada por células Th2 e da resposta secretora (IgA). Além disto, demonstrou-se que diferentes respostas imunes são determinadas pela via de imunização utilizada, nasal, oral, intraperitoneal, subcutânea ou endovenosa (SBROGIO-ALMEIDA e FERREIRA, 2001; TOMITA, 2005).

Foi demonstrado que salmonela é também um bom veículo para transferência de informação genética para expressão de proteínas sob controle da maquinaria de replicação e tradução das células do hospedeiro. Verificou-se que essas proteínas podem estimular o sistema imune, confirmando que salmonelas recombinantes representam uma ferramenta bastante versátil para o desenvolvimento de vacinas. Elas apresentam a vantagem de imunização direta, dispensando etapas de purificação e renaturação de proteínas, reduzindo assim o custo das vacinas. A clonagem em salmonelas possibilita a expressão dos antígenos na forma nativa e a apresentação direta ao hospedeiro (TOMITA, 2005).

Escolhemos para estudos de sistemas de expressão a linhagem de *S. entérica* sorovar Typhimurium SL3261, a qual possui uma deleção do gene *aroA*, sendo dependente do substrato ácido p-aminobenzóico (PABA) ou aminoácidos aromáticos para sobrevivência e por isso tendo crescimento limitado nos tecidos

infectados onde os substratos são pouco disponíveis (HOISETH e STOCKER, 1981).

1.5.1 Regulon *soxRS*

Existem muitos dados sobre a utilização de promotores de expressão gênica ativados *in vivo*, ou seja, induzidos por características específicas do micro-ambiente do hospedeiro com possibilidade de uso em salmonela. Vários estudos descritos na literatura demonstram as características do regulon *soxRS*, o qual é ativado em *E. coli* em resposta ao estresse oxidativo que ocorre durante infecção nos hospedeiros mamíferos (DEMPLE, 1996). O regulon é comprovadamente induzido em macrófagos por radicais superóxido e óxido nítrico. O controle de expressão do regulon é feito em dois estágios, com uma proteína sensora de estresse oxidativo, SoxR, a qual ativada, atua sobre o promotor do gene *soxS* (fator de transcrição), induzindo forte expressão. A proteína SoxS vai então ativar a expressão de ao menos quinze genes relacionados com a defesa contra estresse oxidativo, como superóxido dismutase A, aconitase, glicose-6-fosfato desidrogenase, fumarase C, endonuclease IV. Foi demonstrado a existência do controle desse regulon em salmonela e em outras enterobactérias (TOMITA, 2005; KOUTSOLIOUTSOU *et al.*, 2001). Verificou-se que mutações específicas no gene de *soxR* podem acarretar alteração conformacional da proteína SoxR de modo a manter a expressão de *soxS* constitutiva. De fato, essa mutação em *soxR* foi verificada em salmonela resistente a antibióticos, isolada de paciente após reincidência de salmonelose. A mutação foi transferida a outras cepas de salmonelas conferindo características de resistência a antibióticos e expressão constitutiva das proteínas do regulon *soxRS* (KOUTSOLIOUTSOU *et al.*, 2001).

Estudos com o sistema *soxR*-promotor-*soxS* no controle da expressão de fragmento C de toxina tetânica mostram resultados interessantes em termos de ativação do sistema imune de camundongos. A linhagem recombinante de *S. typhimurium* SL3261 foi capaz de proteger os camundongos desafiados com a toxina tetânica após duas doses administradas pela via oral (TOMITA, 2005).

6 CONCLUSÕES

Este trabalho propôs a obtenção de proteínas recombinantes a partir dos genes LIC12659, LIC12660, LIC12631, e LIC10868 de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni e a avaliação de atividades imunogênicas e características funcionais.

Todos os genes foram clonados nos vetores de expressão pAE e pAEsox e as proteínas recombinantes, com exceção da proteína codificada pelo gene LIC10868, expressas com sucesso em *E. coli* BL21. Em *Salmonella typhimurium* SL3261 obteve-se a expressão *in vitro* das proteínas do módulo VapBC.

As proteínas Sph2 e VapC expressas em corpúsculos de inclusão tornaram-se solúveis após os processos de renaturação, no entanto, as referidas atividades enzimáticas não foram observadas.

O operon *vapBC* (LIC12659/12660) foi clonado em *E. coli* e *S. typhimurium*, onde foi obtida a expressão das duas proteínas de maneira similar ao que deve ocorrer na bactéria de origem do operon.

Foi demonstrado que o crescimento de *E. coli* foi inibido pela presença do vetor contendo o gene *vapC* e normalizado pela presença de *vapB* no vetor que carrega o módulo *vapBC*, provavelmente pela toxicidade da proteína VapC e neutralização pela VapB.

De maneira inversa ao esperado, nossos ensaios demonstraram que a atividade ribonuclease estava presente nos preparados de VapB e do complexo co-purificado VapBC, mas não de VapC. O uso de proteínas controle obtidas de maneira idêntica a VapB descartaram a presença de RNases contaminantes devido ao processo de purificação, sendo necessários estudos mais detalhados para confirmação deste achado.

As proteínas recombinantes VapB e Sph2 mostraram-se imunogênicas, induzindo resposta imune em camundongos e hamsters e os ensaios de *Western blot* indicaram o reconhecimento das proteínas recombinantes nos soros dos animais imunizados.

A imunização em hamsters com *Salmonella*-VapB induziu resposta imune que resultou em 30% de proteção contra o desafio por *L. interrogans*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ARCUS, V. L.; RAINEY, P. B.; TURNER, S. J. The PIN-domain toxin–antitoxin array in mycobacteria. **Trends Microbiol.**, v.13, n. 8, p. 258-263, 2005.

ARTIUSHIN, S.; Timoney, J. F.; Nally, J.; Verma, A. Host-inducible immunogenic sphingomyelinase-like protein, Lk73.5, of *Leptospira interrogans*. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 2, p. 742- 749, 2004.

ASHBY, D.; LEDUC, I.; LAUZON, W.; LEE, B. C.; SINGHAL, N.; CAMERON, D. W. Attenuated *Salmonella typhimurium* SL3261 as a vaccine vector for recombinant antigen in rabbits. **J. Immunol. Methods**, v. 299, p.153-164, 2005.

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect. Dis.**, v. 3, n. 12, p. 757-771, 2003.

BROD, C. S.; ALEIXO, J. A. G.; JOUGLAR, S. D. D.; FERNANDES, C. P. H.; TEIXEIRA, J. L. R.; DELLAGOSTIN, O. A. Evidência do cão como reservatório da leptospirose humana: isolamento de um sorovar, caracterização molecular e utilização em inquérito sorológico. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38, n. 4, p. 294-300, 2005.

BODOGAI, M.; FERENCZI, S. Z.; MICLEA, S. P.; PAPP, P.; DUSHA, I. Toxin-antitoxin modules and symbiosis. **Curr. Plant. Sci. Biotech. Agri.**, v. 42, p. 237-238, 2008.

BULACH, D. M.; ZUERNER, R. L.; WILSON, P.; SEEMANN, T.; MCGRATH, A.; CULLEN, P. A.; DAVIS, J.; JOHNSON, M.; KUCZEK, E.; ALT D. P. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.103, n. 39, p. 14560-14565, 2006.

BUTS, L.; LAH, J.; DAO-THI, M. H.; WYNS L.; LORIS, R. **Trends Biochem. Sci.**, v. 30, n. 12, p. 672-679, 2005.

CARVALHO, E. **Análise das proteínas de *Leptospira* com possível papel hemolítico através de expressão recombinante:** detecção de expressão nativa, atividade biológica e potencial vacinal. 100 f. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. 2006. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br/>>. Acesso em: 8 fev. 2009.

* De acordo com:

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

CHATFIELD, S. N.; DOUGAN, G. New generation vaccines. In: LEVINE, M. M. *et al.* 2.ed. **Novel Vaccination Strategies**. New York: Plenum Press, 1997. p. 331-341.
CHEN, H.; SCHIFFERLI, D. M. Mucosal and systemic immune responses to chimeric fimbriae expressed by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine strains. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 3129-3139, 2000.

COOPER, C. R.; DAUGHERTY, A. J.; TACHDJIAN, S.; BLUM, P. H.; KELLY, R. M. Role of vapBC toxin-antitoxin loci in the thermal stress response of *Sulfolobus solfataricus*. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 37, n. 1, p. 123-126, 2009.

COORDENAÇÃO DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. 2005. Disponível em: <[http://portal.prefeitura.sp.gov.br/secretarias/saude/vigilancia_saude /ccz/0067/](http://portal.prefeitura.sp.gov.br/secretarias/saude/vigilancia_saude/ccz/0067/)>. Acesso em: 15 jan. 2008.

CORRÊA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

COYNAULT, C.; NOREL, F. Comparison of the abilities of *Salmonella typhimurium* rpoS, aroA and rpoS aroA strains to elicit humoral immune responses in BALB/c mice and to cause lethal infection in athymic BALB/c mice. **Microbiol. Pathog.**, v. 26, n. 6, p. 299-305, 1999.

DAINES, D. A.; WU, M. H.; YUAN, S. Y. VapC-1 of Nontypeable *Haemophilus influenzae* Is a Ribonuclease. **J. Bacteriol.**, v. 7, p. 5041–5048, 2007.

DEMPLE, B. Redox signaling and gene control in the *Escherichia coli* soxRS oxidative stress regulon. **Gene**, v. 179, n. 1, p. 53-57, 1996. Review.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. 2.ed. Melbourne: MedSci, 1999. 353 p.

FARR, W. Leptospirosis. **Clin. Infect. Dis.**, v.21, p.1-8, 1994.

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

GARMORY, H. S.; BROWN, K. A.; TITBALL, R. W. *Salmonella* vaccines for use in humans: present and future perspectives. **Microbiol. Rev.**, v. 26, p. 339-353, 2002.

GERDES, K.; CHRISTENSEN S. K.; LOBNER-OLESEN, A. Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 3, n. 5, p. 371-82, 2005.

HAYES, C. S. E SAUER, R. T. Toxin-antitoxin pairs in bacteria: killers or stress regulators? **Cell**, v. 10, n. 112, p. 2-4, 2003.

HEINEMANN, M. B.; GARCIA, J. F.; NUNES, C. M.; GREGORI, F.; HIGA, Z. M. M.; VASCONCELLOS, S. A.; RICHTZENHAIN, L. J. Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. **Vet. Microbiol.**, v. 73, p. 261-267, 2000.

HOISETH, S. K.; STOCKER, B. A. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. **Nature**, v. 5812, p. 238-239, 1981.

JANEWAY, C. A.; Travers, P. **Immunobiology**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 566 p.

JÖRG, L.; SPRINGER, S.; CHRISTOPH; WERNER, C. E.; LINDNER, T.; BELLMAN, N.; STRAUBINGER, R. K.; SELBITZ, H. J.; ALBER, G. Immunity induced with a *Salmonella enterica* serovar Enteritidis live vaccine is regulated by Th1-cell-dependent cellular and humoral effector mechanisms in susceptible BALB/c mice. **Vaccine**, v. 29, n. 22, p. 4779-93, 2006.

KATZ, M. E.; HOWARTH, P. M.; YONG, W. K., RIFFKIN, G. G.; DEPIAZZI, L. J.; ROOD, J. I. Identification of three gene regions associated with virulence in *Dichelobacter nodosus*, the causative agent of ovine footrot. **J. Gen. Microbiol.**, v. 137, p. 2117-2124, 1991.

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

KOUTSOLIOUTSOU, A.; MARTINS, E. A.; WHITE, D. G.; LEVY, S. B.; DEMPLE, B. A *soxRS*-constitutive mutation contributing to antibiotic resistance in a clinical isolate of *Salmonella enterica* (Serovar typhimurium). **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.45, n. 1, p. 38-43, 2001.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEE, S. H.; KIM, K. A.; PARK, Y. G.; SEONG I. W.; KIM, M. J.; LEE, Y. J. Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar lai. **Gene**, v. 254, p. 19-28, 2000.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 14, p. 296-326, 2001.

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

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

MAROTO, P. C. Outcome of leptospirosis in children. **Am. J.Trop. Med. Hyg.**, v. 56, p. 307-310, 1997.

MARTINEZ SANCHEZ, R.; OBREGON FUENTES, A. M.; PEREZ SIERRA, A.; BALY GIL, A.; DIAZ GONZALEZ, M.; BARO SUAREZ, M.; MENENDEZ CAPOTE, R.; RUIZ PEREZ, A.; SIERRA GONZALEZ G.; LOPEZ CHAVEZ, A. U. The reactogenicity and immunogenicity of the first Cuban vaccine against human leptospirosis. **Rev. Cubana Med. Trop.**, v. 50, p. 159-166, 1998.

MIALLAU, L.; FALLER, M.; CHIANG, J.; ARBING, M.; GUO, F.; CASCIO, D. EISENBERG, D. Structure and proposed activity of a member of the VapBC family of toxin-antitoxin systems. VapBC-5 from *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 1, p. 276-83, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portal da Saúde. Disponível em: <http://200.214.130.38/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21740>. Acesso em: 14 fev. 2009.

MURRAY, P. M.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. Treponena, Borrelia e Leptospira. In: MURRAY, Patrick R. **Microbiologia Médica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 285-288.

NASCIMENTO, A. L.; KO, A. I.; MARTINS, E. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; HO, P. L.; HAAKE, D. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; HARSTKEERL, R. A.; MARQUES, M. V.; OLIVEIRA, M. C.; MENCK, C. F. M.; LEITE, L. C. C.; CARRER, H.; COUTINHO, L. L.; DEGRAVE, W. M.; DELLAGOSTIN, O. A.; EL-DORRY, H.; FERRO, M.I.T.; FURLAN, L.R.; GAMBERINI, M.; GIGLIOTI, E.A.; GOES-NETO, A.; GOLDMAN, G. H.; HAKAKAVA, R.; JERONIMO, S. M. B.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; KIMURA, E. T.; KURAMAE, E. E.; LEMOS, E. G. M.; LEMOS, M. V. F.; MARINO, C. L.; NUNES, L. R.; OLIVEIRA, L.C.; PEREIRA G. G.; REIS, M. S.; SCHRIEFER, A.; SIQUEIRA, W. J.; SOMMER, P.; TSAI, S. M.; SIMPSON, A. J. G.; FERRO, J. A.; CAMARGO, L. E. A.; KITAJIMA, J. P.; SETUBAL, J. C.; VAN SLUYS, M. A. Comparative Genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 7, p. 2164-72, 2004.

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

NICODEMO, A. C.; DUARTE, M. I.; ALVES V. A.; TAKAKURA C. F.; SANTOS R. T.; NICODEMO, E. L. Lung lesions in human leptospirosis: microscopic, immunohistochemical, and ultrastructural features related to thrombocytopenia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v., 56, p. 181-187, 1997.

PALANIAPPAN, R. U.; MCDONOUGH, S. P.; DIVERS, T. J.; CHEN, C. S.; PAN, M. J.; MATSUMOTO, M.; CHANG, Y. F. Immunoprotection of recombinant leptospiral immunoglobulin-like protein A against *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection. **Infect. Immun.**, v. 3, p. 1745-1750, 2006.

PANDEY, P.; GERDES, K. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. **Nucleic Acids Res.**, v. 33, n. 3, p. 966-976, 2005.

PASETTI, M. F.; BARRY, E. M.; LOSONSKY, G.; SINGH, M.; MEDINA-MORENO, S. M.; POLO, J. M.; ULMER, J.; ROBINSON, H.; SZTEIN, M. B.; LEVINE, M. M. Attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi and *Shigella flexneri* 2a strains mucosally deliver DNA vaccines encoding measles virus hemagglutinin, inducing specific immune responses and protection in cotton rats. **J. Virol.**, v. 77, n. 9, p. 5209-17, 2003.

PICARDEAU, M.; BULACH, D. M.; BOUCHIER, C.; ZUERNER, R. L.; ZIDANE, N.; WILSON, P. J.; CRENO, S.; KUCZEK, E. S.; BOMMEZZADRI, S.; DAVIS, J. C.; MCGRATH, A.; JOHNSON, M. J.; BOURSAUX-EUDE, C.; SEEMANN, T.; ROUY, Z.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; LAJUS, A.; DAVIES, J. K.; MÉDIGUE, C.; ADLER, B. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. **PLoS One**, v. 13, n. 3, p. 1607, 2008.

PLANK, R.; DEAN, D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira ssp.* in humans. **Microbes Infect.**, v. 2, p. 1265-1276, 2000. Review.

QORONFLEH, M. W.; HESTERBERG, L. K.; SEEFELDT, M. B. Confronting high-throughput protein refolding using high pressure and solution screens. **Protein Expr. Purif.**, v. 55, n. 2, p. 209-224, 2007.

RAMOS, C. R.; ABREU, P. A.; NASCIMENTO, A. L.; HO, P. L. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, n. 8, p. 1103-1109, 2004.

Ren, S. X.; Fu, G.; Jiang, X. G.; Zeng, R.; Miao, Y. G.; Xu, H.; Zhang Y. X.; Xiong H.; Lu, G.; Lu, L. F.; Jiang, H. Q.; Jia, J.; Tu, Y. F.; Jiang, J. X.; Gu, W. Y.; Zhang, Y. Q.; Cai, Z.; Sheng, H. H.; Yin H. F.; Zhang, Y.; Zhu, G. F.; Wan, M.; Huang, H. L.; Qian, Z.; Wang, S. Y.; Ma, W.; Yao, Z. J.; Shen, Y.; Qiang, B. Q.; Xia, Q. C.; Guo, X. K.; Danchin, A.; Saint Girons, I.; Somerville, R. L.; Wen, Y. M.; Shi, M. H.; Chen, Z.; Xu, J. G.; Zhao, G. P. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. **Nature**, v. 24, n. 422, p. 888-93, 2003.

RIBEIRO, A. F. Leptospirose, avaliação de fatores prognósticos da doença, município de São Paulo, 2005. **Boletim Epidemiológico de São Paulo**, ano 3, n. 28, abr., 2006.

ROSENKRANZ, C. D.; CHIARA, D.; AGORIO, C.; BAZ, A.; PASETTI, M. F.; SCHREIBER, F.; DEMATTEIS, S.; MARTINEZ, M.; SZTEIN, M. B.; CHABALGOITY, J. A. Towards new immunotherapies: targeting recombinant cytokines to the immune system using live attenuated *Salmonella*. **Vaccine**, v. 21, p. 798-801, 2003.

SAKATA, E. E.; YASUDA, P. H.; ROMERO, E. C.; SILVA, M. V.; LOMAR, A. V. Sorovares de *L. interrogans* isolados de casos de leptospirose humana em São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 34, p. 217-221, 1992.

SBROGIO- ALMEIDA, M. E. E FERREIRA, L. C. S. Flagelin expressed by live *Salmonella* vaccine strains induces distinct antibody responses following delivery via systemic or mucosal immunization routes. **Fems Immunol. Med. Microbiol.**, v. 30, p. 203-208, 2001.

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

SÃO PAULO (Estado). Secretaria Estadual da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância Epidemiológica – Leptospirose**. São Paulo: CVE, 1994.

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

SIRARD, JEAN-CLAUDE; NIEDERGANG, FLORENCE; KRAEHENBUHL, JEAN-PIERRE Live attenuated *Salmonella*: a paradigm of mucosal vaccines, vaccines and vaccination. **Part Immunol.**, v. 171, p. 5-26, 1999. Review.

TOMITA, E.Y. **Construção de Linhagens recombinantes de salmonelas atenuadas a serem utilizadas como vetor vivo, expressando antígenos heterólogos para imunização via oral e nasal**. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Programa de Pós- Graduação Interunidades em Biotecnologia, São Paulo, 2005.

TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1996. p. 212-213.

VERONESI R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004.

WANDERSMAN, C.; STOJILJKOVIC I. Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 3, n. 2, p. 215-20, 2000. Review.

ZHANG, Y. X.; GUO, X. K.; WU, C.; BO B.I.; XI REN, S.; WU, C. F.; ZHAO, G. P. Characterization of a novel toxin-antitoxin module, VapBC, encoded by *Leptospira interrogans* chromosome. **Cell Res.**, v. 14, n. 3, p. 208-216, 2004.

ZHANG, Y. X.; GENG, Y.; YANG, J. W.; GUO, X. K.; ZHAO, G. P. Cytotoxic activity and probable apoptotic effect of Sph2, a sphingomyelinase hemolysin from *Leptospira interrogans* strain Lai. **BMB Rep.**, v. 41, n. 2, p. 119-125, 2008.

ZHUO, J. T; WANG, S. S.; LAN W. L. A discussion on setting up target age group for immunization against leptospirosis. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi**, v. 16, n. 4, p. 228-30, 1995.