TATIANA RODRIGUES FRAGA

**ESTUDO DE POTENCIAIS ANTÍGENOS
VACINAIS DE *LEPTOSPIRA INTERROGANS*
SOROVAR COPENHAGENI**

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

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora:

Prof. Dra. Elizabeth Angélica Leme Martins

São Paulo
2009

RESUMO

FRAGA, F. A. **Estudo de potenciais antígenos vacinais de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni**. 2009. 149 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A leptospirose é uma zoonose mundialmente disseminada, causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*. A melhor estratégia para combater a doença é a adoção de medidas preventivas. Neste contexto, o desenvolvimento de vacinas se destaca. Potenciais antígenos a serem testados como candidatos vacinais foram identificados pela análise do genoma de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni por programas de bioinformática. Foram selecionadas sete proteínas para estudo: três lipoproteínas (LipL32, LipL23 e LipL22), duas hemolisinas (SphH e Sph4), uma proteína com domínios anquirina (AnkB) e uma com domínio OmpA (OmpA76). Os genes selecionados foram amplificados a partir do DNA genômico por PCR, clonados nos vetores pGEM-T Easy ou pDEST17, e subclonados nos vetores de expressão pAE e pAEsox. A expressão das proteínas foi induzida nas bactérias *E.coli* BL21(DE3)Star[pLysS] e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium SL3261, que é vacinal para camundongos. Todas as proteínas foram expressas na forma insolúvel. Após otimização das condições de indução, as proteínas LipL32, LipL23 e LipL22 foram expressas na forma solúvel e purificadas. As proteínas OmpA76, AnkB, Sph4 e SphH foram purificadas e renaturadas por diferentes métodos. Foram feitos dois ensaios de imunização e desafio. No primeiro, hamsters foram imunizados com a salmonela carregando a construção pAEsoxLIC10537, para expressão da proteína OmpA76 *in vivo*, e desafiados com *L. interrogans* sorovar Pomona. Houve sobrevivência de aproximadamente 30% dos animais imunizados com a salmonela recombinante, 100% dos que receberam a vacina comercial e 10% dos imunizados com salmonela pAEsox vazio ou com PBS. No segundo ensaio, os hamsters foram imunizados com um *pool* das sete proteínas recombinantes purificadas, e desafiados com *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Houve sobrevivência de 30% dos animais imunizados com o *pool* de proteínas, 90% dos que receberam a vacina comercial, 100% dos imunizados com bacterina de *L. interrogans* sorovar Copenhageni e nenhum animal do grupo PBS. A reatividade das proteínas com soro de hamster infectado com *L. interrogans* sorovar Pomona ou Copenhageni foi analisada. A proteína LipL32 reagiu com todos os soros testados. As proteínas OmpA76, LipL23 e LipL22 foram reconhecidas pelos soros que apresentaram títulos de MAT mais elevados. A imunogenicidade das proteínas e das salmonelas recombinantes, carregando as construções plasmidiais para expressão das proteínas *in vivo*, foi avaliada em

ensaio em camundongos. As proteínas LipL32, OmpA76, LipL23, LipL22 e AnkB apresentaram elevados títulos de IgG específicos. As proteínas foram reconhecidas pelos soros dos animais imunizados com as salmonelas recombinantes após reforço com proteína purificada (exceto a SphH e Sph4). Extratos protéicos de *L. interrogans* sorovar Pomona e Copenhageni foram reconhecidos pelos soros anti-LipL32 e anti-OmpA76. O soro anti-LipL23 também reagiu com os extratos do sorovar Pomona.

Palavras-chave: Leptospirose. Clonagem, expressão, purificação e renaturação de proteínas recombinantes. Ensaio de desafio com *Leptospira interrogans*. Salmonelas vacinais recombinantes.

ABSTRACT

FRAGA, T. R. **Study of potential vaccine candidates from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni**. 2009. 149 p. Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Leptospirosis is a widespread zoonosis caused by pathogenic bacteria from the genus *Leptospira*. The best strategy to combat the disease is the prevention. In this context, the development of vaccines is crucial. The genome from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni was analyzed by bioinformatic tools and several proteins, possibly related to its pathogenesis, were identified. Seven proteins were selected to be studied: three lipoproteins (LipL32, LipL22 and LipL23), two hemolysins (SphH and Sph4), an ankyrin like protein (AnkB) and an outer membrane protein (OmpA76). The genes were amplified from the genomic DNA by PCR, cloned in the vectors pDEST17 or pGEM-T Easy and subcloned in the expression vectors, pAE and pAEsox. The recombinant proteins were expressed in *E.coli* BL21(DE3)StarpLysS and in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261, strain that is vaccinal for mice. The seven proteins were expressed in the insoluble form. After the optimization of the induction conditions, the proteins LipL32, LipL22 and LipL23 were recovered in the soluble fraction and purified. The proteins OmpA76, AnkB, Sph4 and SphH were refolded and purified by different methods. Two challenge assays were performed. In the first assay, hamsters were immunized with the salmonella carrying the construction pAEsoxLIC10537, to allow the expression of the protein OmpA76 *in vivo*, and challenged with *L. interrogans* serovar Pomona. There was a survival of around 30% of the animals immunized with the recombinant salmonella, 100% of the commercial vaccine group and 10% of the negative control groups (salmonella pAEsox or PBS). In the second assay, hamsters were immunized with a *pool* of the seven purified recombinant proteins and challenged with *L. interrogans* serovar Copenhageni. All the animals of the negative control group (PBS) died, while 30% of the hamsters immunized with the *pool* of the proteins survived. In the positive control groups, immunization with a commercial vaccine or a bacterin of *L. interrogans* serovar Copenhageni, conferred a protection of 90% and 100%, respectively. The recognition of the seven proteins by sera from hamsters infected with *L. interrogans* serovar Copenhageni or Pomona was analyzed. The protein LipL32 was recognized by all tested sera. The proteins OmpA76, LipL23 and LipL22 reacted with sera that have high MAT titers. The immunogenicity of the proteins and the recombinant salmonellas, carrying the plasmidial constructions to express the proteins *in vivo*, was tested in mouse. The proteins LipL32,

OmpA76, LipL23, LipL22 and AnkB elicited high IgG titers. The proteins were recognized by the sera of the animals immunized with the recombinant salmonellas after the protein booster (except SphH e Sph4). Protein extracts of *L. interrogans* serovar Pomona and Copenhageni were recognized by anti-LipL32 and anti-OmpA76 sera. The anti-LipL23 serum also recognized the serovar Pomona protein extracts.

Key words: Leptospirosis. Cloning, expression, purification and refolding of recombinant proteins. Challenge assay with *Leptospira interrogans*. Recombinant salmonella vaccine.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A leptospirose humana

A leptospirose é uma zoonose mundialmente disseminada causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* (FAINE *et al.*, 1999). Nos países desenvolvidos está associada à prática de esportes aquáticos e nos países em desenvolvimento tem se tornado um grave problema de saúde pública (KO *et al.*, 1999; HAAKE *et al.*, 2002).

A incidência da leptospirose aumenta na época das chuvas, devido à contaminação da água de inundações por leptospiros patogênicas eliminadas na urina de roedores, os principais reservatórios urbanos (SAKATA *et al.*, 1992). É considerada também uma doença ocupacional, pois atinge trabalhadores de serviços de água e esgotos, canaviais, arrozais, tratadores de animais e veterinários (FAINE *et al.*, 1999).

Desde 1985, a leptospirose humana é uma doença de notificação compulsória no Brasil. Segundo o Sistema de Vigilância Epidemiológica, no período de 1985 a 2005 foram confirmados 60.753 casos e 6.778 óbitos (ANEXO A). No estado de Santa Catarina foram confirmados 301 casos de leptospirose, relativos às intensas chuvas que ocorreram na região em novembro de 2008 (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA/CVE).

As variações na incidência da doença podem ser explicadas por um conjunto de fatores como índices pluviométricos, desigualdades sociais e diversidades geográficas. Considerando que parte das infecções não são notificadas e que a apresentação subclínica da leptospirose é com frequência erroneamente diagnosticada como “síndrome viral”, pode-se inferir que o número de casos confirmados reflete apenas uma pequena parcela do número real de casos no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE/MS).

1.2 As leptospiros

As leptospiros pertencem ao gênero *Leptospira*, família *Leptospiraceae* e ordem *Spirochaetales* (FAINE *et al.*, 1999).

O gênero *Leptospira* foi primeiramente dividido nas espécies *L. biflexa* e *L. interrogans* pela classificação fenotípica. A *L. biflexa* reunia os sorovares saprófitos, de vida livre e a *L. interrogans* os patogênicos (LEVETT, 2001). A composição antigênica das leptospiros é usada para fins taxonômicos e sua base é o sorovar. A diversidade dos sorovares é resultante da heterogeneidade estrutural dos carboidratos do LPS (lipopolissacarídeo) da membrana da

bactéria. Os sorovares antigenicamente relacionados são agrupados em sorogrupos (BHARTI *et al.*, 2003).

Em 1987 foi proposta uma classificação genotípica por Yasuda e colaboradores, com base em hibridação por homologia de DNA, para a determinação das espécies de *Leptospira*. Atualmente há 17 espécies genômicas: *L. interrogans*, *L. biflexa*, *L. alexandrei*, *L. fainei*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. inadai*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. kirshneri*, *L. meyeri*, *L. wolbachii*, e as geno-espécies 1, 2, 3, 4 e 5, ainda sem denominação (BHARTI *et al.*, 2003).

As leptospirosas são bactérias espiroquetas aeróbias. Possuem membrana citoplasmática e parede celular, sendo esta envolta por uma membrana externa contendo proteínas como lipoproteínas e porinas, as quais permitem troca de solutos entre o espaço periplasmático e o meio ambiente. A movimentação do microrganismo está associada a dois flagelos periplasmáticos localizados em extremidades opostas da bactéria. Álcoois e ácidos graxos são utilizados como fontes de carbono e energia (MURRAY *et al.*, 2000). O LPS das leptospirosas possui composição semelhante ao das bactérias gram-negativas, contudo com baixa atividade endotóxica (FAINE *et al.*, 1999).

1.3 Características clínicas e tratamento da leptospirose

As leptospirosas geralmente causam infecções assintomáticas em seus hospedeiros de manutenção, nos quais colonizam os túbulos renais proximais, sendo eliminadas na urina (FAINE *et al.*, 1999).

As leptospirosas são bactérias finas e altamente móveis, o que possibilita sua penetração em membranas mucosas intactas e na pele lesada. Quando há contato prolongado com água contaminada, também pode ocorrer penetração na pele íntegra. As bactérias se disseminam pela circulação sanguínea e linfática para todos os tecidos e se multiplicam no fígado, pulmão e baço (FAINE *et al.*, 1999; LEVETT, 2001).

A leptospirose pode se apresentar como uma infecção subclínica, com sintomas semelhantes à gripe, como febre, dor de cabeça e muscular, ou evoluir para doença sistêmica grave (síndrome de Weil), caracterizada por insuficiência renal e hepática, extensa vasculite, miocardite e meningite (LEVETT, 2001). Essas diferentes manifestações da doença podem ser explicadas, em parte, pela virulência das bactérias infectantes. A forma grave da leptospirose é comumente associada ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae (BHARTI *et al.*, 2003). Fatores como a carga bacteriana e o estado de saúde do indivíduo também estão relacionados com a gravidade da infecção (FAINE *et al.*, 1999).

As formas menos graves da leptospirose podem ser tratadas com antibióticos orais como doxaciclina ou eritromicina. Nos casos mais graves, o medicamento de escolha é a penicilina intravenosa. A terapia de suporte, que consiste principalmente na diálise, é importante quando há insuficiência renal, desequilíbrio hidroeletrólítico, e hemorragia (WHO, 2003).

1.4 Diagnóstico laboratorial da leptospirose

A realização de exames laboratoriais para a leptospirose é de grande importância, pois os sintomas clínicos são polimórficos e dificultam o diagnóstico (FAINE *et al.*, 1999). A confirmação laboratorial da doença é baseada na demonstração da presença de leptospiplas, fragmentos de DNA ou detecção de anticorpos específicos (WHO, 2003).

O cultivo de leptospiplas a partir do sangue ou líquido e a reação de polimerase em cadeia (PCR) são positivos na fase de bacteremia (primeira semana). Nesta fase os testes sorológicos podem ser negativos ou apresentarem baixos títulos. A partir da segunda semana da doença as bactérias e fragmentos de DNA são encontrados na urina e os testes sorológicos podem ser positivos (WHO, 2003).

As leptospiplas são isoladas com relativa facilidade em meio Ellinghausen, contudo, como crescimento é lento, o resultado das hemoculturas é frequentemente retrospectivo em relação à evolução da doença (PEREIRA, 2005). As técnicas de PCR são mais sensíveis que o cultivo da espiroqueta, mas dependem de métodos de preparação de amostras, devido à existência de diversos inibidores da reação (ÇETINKAYA *et al.*, 2000).

Os testes sorológicos são os mais comumente empregados para o diagnóstico laboratorial da leptospirose. O teste de referência recomendado pela Organização Mundial da Saúde é o MAT (teste de aglutinação microscópica), no qual o soro do paciente reage com uma suspensão de leptospiplas vivas. Após incubação, observa-se aglutinação em microscópio de campo escuro se houver reação antígeno-anticorpo. O MAT é um ensaio quantitativo e de alta complexidade, pois envolve a manutenção de diversas estirpes de referência (WHO, 2003).

A interpretação dos resultados do MAT é baseada na comparação de amostras sequenciais, colhidas com intervalos de sete a vinte e um dias. O pareamento é importante para verificar a existência de soroconversão, ou seja, variação de quatro vezes nos títulos entre as amostras. Contudo, há dificuldades na interpretação devido ao alto grau de reações cruzadas e paradoxais entre os diferentes sorovares do painel de antígenos, especialmente nas amostras de fase aguda. Nas reações paradoxais, são inicialmente observados títulos mais altos para um sorovar que não é de fato o agente causal. Posteriormente, amostra do paciente coletada na fase

convalescente exibirá títulos mais altos para o sorovar infectante. Há necessidade de isolar as leptospiros em cultura para a identificação conclusiva do agente etiológico (PEREIRA, 2005).

O ELISA-IgM detecta anticorpos mais precocemente que o MAT. Observa-se reação positiva no teste com amostras coletadas de seis a oito dias após o aparecimento dos primeiros sinais clínicos da doença (WHO, 2003). Como antígenos têm sido utilizados extratos de leptospiros, brutos ou sonicados, e proteínas recombinantes como a LipL32, LipL41, LigA, LigB, Lp49, Lp29, MPL17 e MPL21 (FLANNERY *et al.*, 2001; LEVETT, 2002; MARIYA *et al.*, 2006; NEVES *et al.*, 2007; SRIMANOTE *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

1.5 Vacinas contra a leptospirose

As vacinas de uso veterinário, chamadas de bacterinas, são compostas de bactérias inativadas pela ação do calor ou formol (FAINE *et al.*, 1999).

Diversos trabalhos têm sido publicados sobre o desenvolvimento de vacinas contra a leptospirose humana em países como Cuba, Rússia, China e França (MARTÍNEZ SÁNCHEZ *et al.*, 1998; IKOEV *et al.*, 1999; YAN *et al.*, 2003; RODRIGUEZ GONZALES *et al.*, 2004). As preparações testadas são semelhantes às bacterinas veterinárias. Entretanto, sabe-se que vacinas compostas por bactérias inativadas são impuras e não induzem memória imunológica de longa duração, exigindo revacinações anuais ou semestrais. Além disso, as bacterinas protegem apenas contra os sorogrupos presentes na preparação, não conferindo, portanto, proteção cruzada. Atualmente tem sido priorizado o desenvolvimento de vacinas com componente(s) bem definido(s), com o objetivo de alcançar máxima proteção por longo tempo e com o mínimo de efeitos adversos (McBRIDE *et al.*, 2005).

O sequenciamento do genoma de diversos microrganismos aliado aos avanços na bioinformática revolucionaram o campo da vacinologia, possibilitando a identificação de candidatos vacinais sem a necessidade do cultivo do patógeno. Essa abordagem, chamada de vacinologia reversa, permitiu a identificação de potenciais antígenos vacinais em *Neisseria meningitidis*, sorogupo B (PIZZA *et al.*, 2000) e *Streptococcus pneumoniae* (WIZEMANN *et al.*, 2001). Atualmente, essa estratégia está sendo aplicada para a leptospira.

O genoma de três espécies de leptospiros foi sequenciado, sendo duas patogênicas: *L. interrogans* sorovar Lai, *L. interrogans* sorovar Copenhageni, *L. borgpetersenii* sorovar Hardjobovis (duas estirpes), e uma de vida livre: *L. biflexa* sorovar Patoc. As duas espécies patogênicas possuem dois cromossomos circulares, um maior e outro menor, e na de vida livre,

além destes, observa-se também uma terceira unidade de replicação de menor tamanho (REN *et al.*, 2003; NASCIMENTO *et al.*, 2004; BULACH *et al.*, 2006; PICARDEU *et al.*, 2008).

Os genomas dos dois sorovares de *L. interrogans* seqüenciados (Lai e Copenhageni) possuem uma semelhança geral, embora haja uma grande inversão cromossômica (NASCIMENTO *et al.*, 2004). O genoma da espécie *L. borgpetersenii* é cerca de 700 kb menor que o da *L. interrogans*. Os genes ausentes estão principalmente relacionados à detecção de sinais ambientais e ao transporte e utilização de metabólitos, sugerindo uma menor capacidade de sobrevivência da *L. borgpetersenii* fora do hospedeiro. Assim, essa redução estaria relacionada à especialização da bactéria em um ciclo de vida com dependência estrita à transmissão de hospedeiro para hospedeiro, ou seja, sem uma fase de vida livre (BULACH *et al.*, 2006). De fato, o genoma da *L. borgpetersenii* e da *L. biflexa*, que são especializadas em um único ambiente (hospedeiro mamífero e meio aquático, respectivamente), é menor que o da *L. interrogans*, que teria se tornado maior ao adquirir genes necessários à sobrevivência em ambos ambientes (PICARDEAU *et al.*, 2008)

A análise dos dados obtidos nos seqüenciamentos possibilitou a identificação de diversos genes, cujas proteínas codificadas, podem estar envolvidas na patogênese da doença, sendo estas potenciais candidatas vacinais (NASCIMENTO *et al.*, 2004). Assim, a análise dos genomas resultou em projetos de investigação como o temático “Clonagem e expressão de proteínas com potencial uso vacinal e em diagnóstico identificadas no genoma da bactéria *L. interrogans* sorovar Copenhageni” ao qual este trabalho está vinculado.

1.6 Proteínas de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni selecionadas

Foram selecionadas sete proteínas para estudo neste projeto: três lipoproteínas (LipL32, LipL23 e LipL22), duas hemolisinas (SphH e Sph4), uma proteína com domínio OmpA (OmpA76) e uma proteína com domínios anquirina (AnkB).

1.6.1 As lipoproteínas

A identificação de proteínas localizadas na superfície externa da leptospira é de grande importância. São estas proteínas que, provavelmente, estão envolvidas na interação das bactérias com o hospedeiro, podendo ser potenciais alvos do sistema imune (FAINE *et al.*, 1999). Dentre estas proteínas, destaca-se a classe das lipoproteínas. Foram selecionadas para estudo as lipoproteínas LipL32, LipL23 e LipL22.

A LipL32 é a proteína mais abundante de *Leptospira*. Ela é exposta na superfície da bactéria, sendo expressa tanto em cultivo *in vitro* como durante infecção (HAAKE *et al.*, 2000; GUERREIRO *et al.*, 2001; CULLEN *et al.*, 2002, 2005). Foi demonstrado que a LipL32 potencializou a hemólise mediada pela esfingomielinase H (SphH), sendo denominada de Hap-1 (proteína associada à hemólise) (LEE *et al.*, 2000). Ela é conservada entre as espécies patogênicas de *Leptospira* (HAAKE *et al.*, 2000) e não possui ortólogos na saprófita *L. biflexa* (PICARDEAU *et al.*, 2008).

A LipL32 é reconhecida por anticorpos IgM e IgG na primeira semana da infecção (fase aguda) e também na fase de resposta humoral em humanos (GUERREIRO *et al.*, 2001; HAUKE *et al.*, 2008). A proteína conferiu proteção parcial em modelo de gerbil quando veiculada por adenovírus e na forma de vacina de DNA, mas não de proteína purificada (BRANGER *et al.*, 2001, 2005). O mesmo foi observado em modelo de hamster, no qual a LipL32 apresentada na forma de BCG recombinante conferiu proteção parcial e a proteína purificada não (SEIXAS *et al.*, 2007).

Um mutante no gene que codifica para a proteína LipL32 foi construído utilizando transposon. Hamsters inoculados por via sistêmica e de mucosa com estas bactérias apresentaram manifestações da doença semelhantes às estirpes selvagens. Estudos com microarray indicaram uma possível associação entre a LipL32 e a síntese do grupo heme e da vitamina B12 (MURRAY *et al.*, 2008).

O mecanismo central da patogênese da leptospirose consiste na habilidade das leptospiros em se disseminarem amplamente por todos os órgãos do hospedeiro (FAINE *et al.*, 1999). Proteínas expostas na superfície podem estar envolvidas com a adesão da bactéria. Moléculas de adesão celular (CAMs) são receptores de superfície presentes nas células eucarióticas envolvidas em interações célula-célula e célula-matriz extracelular (BOYLE *et al.*, 2003). As proteínas recombinantes rLIC10365, LipL22 e LipL23 de *L. interrogans* promoveram um aumento da expressão de ICAM-1 (moléculas de adesão intercelulares tipo 1) e E-selectina em HUVECS (células endoteliais das veias de cordão umbilical humano), sugerindo um possível papel destas proteínas na adesão celular e patogênese da leptospirose (VIEIRA *et al.*, 2007; GÓMEZ *et al.*, 2008).

As proteínas LipL22 e LipL23 são conservadas entre os seguintes sorovares patogênicos de *L. interrogans*: Canicola, Hardjo, Icterohaemorrhagiae e Copenhageni. A expressão das proteínas LipL22 e LipL23 foi observada *in vivo*, no túbulo renais de porcos da Índia infectados com *L. interrogans* sorovar Copenhageni (GÓMEZ *et al.*, 2008).

Além disso, a proteína LipL23 também é conservada em *L. interrogans* sorovares Bratislava, Autumnalis, Pomona, Pyrogenes e Grippotyphosa, e a proteína recombinante foi reconhecida pelo soro de pacientes diagnosticados com leptospirose (título de MAT 25.000) (GAMBERINI *et al.*, 2005).

1.6.2 As hemolisinas

As hemolisinas e as toxinas citolíticas são encontradas em diversos organismos e podem ser classificadas em três categorias de acordo com o mecanismo de ação nas células alvo, que pode ser pela formação de poros, surfactante e enzimático (ROWE e WELCH, 1994). O mecanismo de lise através da formação de poros envolve a ligação e penetração da toxina na membrana da célula, seguidos de rompimento e alteração da permeabilidade, levando à citólise. As hemolisinas que atuam como surfactantes, são altamente hidrofóbicas e promovem lise pela solubilização da membrana da célula alvo. Já as hemolisinas que causam lise através da clivagem enzimática de componentes da membrana incluem as fosfolipases e as esfingomielinases (LEE *et al.*, 2002).

As leptospiros dependem de ferro para a sua multiplicação e crescimento (FAINE *et al.*, 1999). Contudo, este metal não é encontrado na forma livre no hospedeiro, sendo o ferro complexado com o grupo heme a principal fonte do metal para a bactéria (WANDERSMAN e STOJILKOVIC, 2000).

As hemolisinas de leptospiros foram inicialmente classificadas como fosfolipases (TROWBRIDGE *et al.*, 1981). Bernheimer e Bey (1986) purificaram uma esfingomielinase C com atividade hemolítica de *L. interrogans* sorovar Pomona. As esfingomielinases promovem a hidrólise das esfingomielinas (lipídeos encontrados nas membranas), resultando em fosfocolina e ceramida (GONI e ALONSO, 2002). Na infecção por leptospiros, as esfingomielinases poderiam estar relacionadas à aquisição de ferro e ao uso de lipídeos da membrana como fonte de carbono e energia. Além disso, poderiam também estar associadas à apoptose de células fagocitárias do hospedeiro, pois a ceramida atua como segundo mensageiro da morte celular programada (MERIEN *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 2008).

No genoma da *L. interrogans* sorovar Copenhageni foram identificadas hemolisinas estruturalmente relacionadas às esfingomielinases C, como as proteínas SphH e Sph4, selecionadas para estudo neste projeto (NASCIMENTO *et al.*, 2004).

Os genes que codificam para as proteínas SphH e Sph4 são conservados em *L. interrogans* sorovares Canicola, Harjo, Icterohaemorrhagiae e Pomona, em *L. borgpetersenii*

sorovares Javanica e Tarassovi, e em *L. noguchii* sorovar Panama. Os transcritos dos dois genes foram detectados em culturas de *L. interrogans* sorovar Pomona, recém isolada de hamster infectado, realizadas nas temperaturas de 20 °C, 29 °C e 37 °C. A expressão da proteína SphH também foi observada no extrato total de *L. interrogans* sorovar Pomona, e *in vivo*, no túbulos renais de hamsters infectados com este sorovar (CARVALHO, 2008).

1.6.3 As proteínas com domínio OmpA e com domínios anquirina

Em bactérias, uma das funções do domínio OmpA é promover a ligação entre a membrana externa e a camada de peptídeoglicano que se localiza sob ela (KOIZUMI e WATANABE, 2003). A proteína Loa22, que possui um domínio OmpA-like, foi descrita como o primeiro fator de virulência geneticamente definido da espécie *Leptospira* (RISTOW *et al.*, 2007). Foi selecionada para estudo a proteína OmpA76 que possui domínio pertencente a superfamília OmpA.

As repetições anquirina são frequentemente relacionadas a interações proteína-proteína. Estas repetições são compostas de módulos de 33 aminoácidos dispostos em *tandem* (BORK, 1993). Em eucariotos, tais domínios são encontrados em proteínas do citoesqueleto que ancoram proteínas nas membranas (GORINA e PAVLETICH, 1996). Há poucos exemplos de repetições anquirina em procariotos e vírus, que podem ter resultado de transferência horizontal de genes (BORK, 1993). Quando analisados em conjunto, os genes bacterianos que codificam para proteínas com domínios anquirina estão localizados em regiões próximas aos que codificam para proteínas envolvidas com estresse oxidativo, resistência a antibióticos e aquisição de nutrientes do meio (HOWELL *et al.*, 2000).

Leptospira interrogans sorovar Copenhageni possui 13 genes que codificam proteínas contendo entre 2 a 7 repetições anquirina (NASCIMENTO *et al.*, 2004). Neste projeto, foi escolhida a proteína AnkB, que possui quatro repetições anquirina. A AnkB de *Pseudomonas aeruginosa* foi caracterizada como uma proteína periplasmática associada à membrana interna. A AnkB mostrou-se essencial para a resistência de *P. aeruginosa* à H₂O₂, possivelmente devido a sua capacidade de ligação e estabilização da proteína catalase (KatB) (HOWELL *et al.*, 2000).

1.7 Salmonelas vacinais, promotores de expressão gênica ativados *in vivo* e o vetor pAEsox

Nos últimos anos, o emprego experimental de linhagens atenuadas de salmonela como abordagem vacinal expandiu-se rapidamente, extrapolando o problema das salmoneloses. Dentro da abordagem biotecnológica da produção de vacinas, o desenvolvimento de estirpes atenuadas de salmonela como carregadoras de antígenos heterólogos representa uma grande esperança para a geração de vacinas multivalentes, de fácil administração e de custos reduzidos (McKELVIE *et al.*, 2008).

Diferentes estirpes de salmonelas atenuadas têm sido utilizadas como vacinas vivas (GARMORY *et al.*, 2002). A atenuação baseia-se na manipulação genética para alterar precisamente vias metabólicas que impeçam o microrganismo de se multiplicar no hospedeiro. A capacidade invasiva é mantida e usada para apresentação temporária da bactéria ao sistema imune do hospedeiro (ROSENKRANZ *et al.*, 2003). Mutações em genes envolvidos na biossíntese de compostos aromáticos (*aro*) são freqüentemente empregadas na obtenção de estirpes atenuadas. Dentre as salmonelas vacinais *aro*⁻, destaca-se a estirpe SL3261 de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurim, que possui mutação no gene *aroA* e é vacinal para camundongos (HOISETH e STOCKER, 1981). Novas gerações de salmonelas atenuadas têm se mostrado efetivas e seguras na vacinação de porcos, galinhas e cavalos (KRAMER *et al.*, 1992; CERQUETTI *et al.*, 2000; SHEORAN *et al.*, 2001).

Estirpes vacinais de salmonela podem expressar antígenos heterólogos após receberem genes, sob controle de promotores bacterianos, clonados em plasmídeos ou inseridos no cromossomo. Um dos aspectos vantajosos desses sistemas é a possibilidade de utilização de promotores de expressão ativados *in vivo*, ou seja, induzidos no micro-ambiente hospedeiro. Genes heterólogos codificando antígenos de interesse vacinal são clonados sob controle desses promotores. Com essa finalidade têm sido utilizados os promotores *nirB*, do gene que codifica a enzima nítrito oxidase, induzido por baixa tensão de oxigênio (KHAN *et al.*, 1994; PASETTI *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2000), e o promotor *htrA*, induzível por estresse térmico (ROBERTS *et al.*, 1998).

O regulon *soxRS* é ativado em enterobactérias em resposta ao estresse oxidativo durante a infecção de mamíferos. O regulon é induzido por radicais superóxido e óxido nítrico gerados por macrófagos. Em resposta ao estresse oxidativo, SoxR, uma proteína expressa de forma constitutiva, é ativada e promove uma mudança de conformação no promotor do gene *soxS*

(psoxS), induzindo expressão da proteína SoxS. Esta proteína ativa a transcrição de pelo menos 15 genes relacionados com a defesa ao estresse oxidativo (DEMPLE, 1996).

O vetor pAE foi construído a partir dos vetores comerciais pRSET e pET3-His, para expressão de proteínas em *E. coli* por indução com IPTG (RAMOS *et al.*, 2004). Este vetor foi modificado no laboratório da Dra. Elizabeth Martins por inserção do sistema controlador do regulon *soxRS*, o gene de *soxR* e promotor de *soxS*, mantendo um sítio de múltiplas clonagens que permite a inserção de genes de interesse a serem expressos sob controle do promotor *soxS*. Salmonelas vacinais podem ser transformadas com genes clonados em vetor pAEsox para a expressão de proteínas heterólogas *in vivo* e *in vitro*, por exposição das bactérias a paraquat, uma droga que promove o estresse oxidativo (Figura 1).

A resposta imune na leptospirose é mediada principalmente por anticorpos, pois foi observada proteção passiva de hamsters contra a infecção (FAINE *et al.*, 1999). Contudo, como as leptospirosas são patógenos altamente invasivos, também devem ser considerados os componentes celulares da resposta imunológica (PALANIAPPAN, 2006). De fato, foi demonstrado que leptospirosas patogênicas estimulam a produção de citocinas do tipo Th1 e Th2 *in vivo* (VERNEL-PAUILLAC e MERIEN, 2001). Ensaios clínicos em humanos e estudos realizados em modelos animais têm fornecido evidências da importância da estimulação da imunidade celular no controle de infecções causadas por bactérias, vírus e parasitas (PALANIAPPAN, 2007). A identificação de adjuvantes que promovam a estimulação do sistema imune de forma mais completa, com componentes humorais e celulares, pode ser interessante no desenvolvimento de uma vacina efetiva contra a leptospirose.

Antígenos heterólogos apresentados ao sistema imune por salmonelas atenuadas estimulam respostas humorais e celulares, caracterizadas pela produção de IFN- γ e IL-12 por linfócitos T CD4⁺, estímulo da atividade dos linfócitos citotóxicos T CD8⁺, pela produção de IgG sérico, predominantemente do isótipo IgG2a, e também de IgA de mucosa (ASHBY *et al.*, 2005).

Considerando-se que a imunidade elicitada por antígenos apresentados por salmonelas é bastante completa, uma das etapas deste projeto foi a obtenção de salmonelas recombinantes para a expressão das proteínas de leptospirosas *in vivo*.

Figura 1. O regulon *soxRS* e a construção dos cassetes de expressão das proteínas recombinantes no vetor pAEsox. No regulon *soxRS*, a proteína SoxR é ativada por estresse oxidativo e promove uma mudança na conformação do promotor *psoxS*, induzindo a expressão de SoxS, uma proteína que ativa a transcrição de diversos genes relacionados à proteção anti-oxidante (DEMPLE *et al.*, 1996). No vetor pAEsox o gene *soxS* é substituído pelo gene heterólogo, cuja transcrição pode ser induzida por estresse oxidativo, promovendo a expressão da proteína recombinante.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi investigada a capacidade protetora e imunogênica de sete proteínas recombinantes de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni.

As proteínas recombinantes LipL23, LipL22, LipL32, SphH, Sph4, OmpA76 e AnkB, foram expressas em *E.coli* BL21(DE3)Star[pLysS] nos sistemas de expressão pAE e pAEsox, e na estirpe vacinal *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium SL3261 (construções em pAEsox). As proteínas LipL32, LipL23 e LipL22 foram expressas na fração solúvel partir da qual foram purificadas. As proteínas OmpA76, AnkB, Sph4 e SphH, expressas na fração insolúvel, foram renaturadas e purificadas.

A proteína OmpA76 expressa *in vivo*, quando veiculada pela salmonela carregando a construção pAEsoxLIC10537, e o *pool* das sete proteínas recombinantes conferiram proteção parcial aos hamsters em desafio com *L. interrogans* sorovar Pomona e Copenhageni, respectivamente.

As proteínas LipL32, OmpA76, LipL23 e LipL22 elicitaram a produção de anticorpos específicos em imunizações de hamster, com o *pool* das sete proteínas, e em camundongos, em imunizações individuais. Estas proteínas também reagiram com soros de hamsters infectados com *L. interrogans* sorovares Pomona ou Copenhageni, e com soros de camundongos imunizados com as respectivas salmonelas recombinantes, após reforço com a proteína purificada.

Extratos totais de *L. interrogans* sorovar Pomona e Copenhageni foram reconhecidos pelos soros gerados contra as proteínas LipL32 e OmpA76. O soro anti-LipL23 também reagiu com os extratos do sorovar Pomona.

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que dentre as sete proteínas estudadas a LipL32, OmpA76, LipL23 e a LipL22 são as mais promissoras, pois foram capazes de estimular o sistema imune. Deste modo, novos ensaios de desafio poderiam ser realizados com estes antígenos.

Neste trabalho foi descrita pela primeira vez a utilização de salmonelas atenuadas como veículos para expressão de proteínas de leptospira *in vivo*. Esta forma de apresentação de antígenos foi melhor caracterizada em camundongos, quanto à doses, vias de imunização e respostas imunes elicitadas. O ensaio de desafio com a salmonela carregando o plasmídeo para expressão da proteína OmpA76 *in vivo* constitui o início dessa investigação em hamsters.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PAGE=Proteins&PROGRAM=blastp>. Acesso em: 12 jan. 2006.
- ANDERSON, R.; DOUGAN, G.; ROBERTS, M. Delivery of the Pertactin/P.69 polypeptide of *Bordetella pertussis* using an attenuated *Salmonella typhimurium* vaccine strain: expression levels and immune response. **Vaccine**, v. 14, n. 14, p. 1384-1390, 1996.
- 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.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STHRUL, K. **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley, 1995. 2 v.
- BAILLIE, L. W.; RODRIGUEZ, A. L.; MOORE, S.; ATKINS, H. S.; FENG, C.; NATARO, J. P.; PASETTI, M. F. Towards a human oral vaccine for anthrax: the utility of a *Salmonella Typhi* Ty21a-based prime-boost immunization strategy. **Vaccine**, v. 11, n. 26, p. 6083-6091, 2008.
- BARRY, E. M.; GOMEZ-DUARTE, O.; CHATFIELD, S.; RAPPUOLI, R.; PIZZA, M.; LOSONSKY, G.; GALEN, J.; LEVINE, M. M. Expression and immunogenicity of pertussis toxin S1 subunit-tetanus toxin fragment C fusions in *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 908. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 10, p. 4172-4181, 1996.
- BERNHEIMER, A. W.; BEY, R. F. Copurification of *Leptospira interrogans* serovar Pomona hemolysin and sphingomyelinase C. **Infect. Immun.**, v. 54, p. 262-264, 1986.
- BEUKEN, E; VINK, C.; BRUGGEMAN, C. A. One-step procedure for screening recombinant plasmids by size. **Biotechniques**, v. 24, p. 749-750, 1998.
- BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICARDI, 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.
- BORK, P. Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: mobile modules that cross phyla horizontally? **Proteins**, v. 17, p. 363-374, 1993.

BOYLE, E. C.; FINLAY, B. B. Bacterial pathogenesis: exploiting cellular adherence. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 15, n. 5, p. 633-639, 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-274, 1976.

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

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

CARRIER, M. J.; CHATFIELD, S. N.; DOUGAN, G.; NOWICKA, U. T.; O'CALLAGHAN, D.; BEESLEY, J. E.; MILANO S.; CILLARI, E.; LIEW, F. Y. Expression of human IL-1 beta in *Salmonella typhimurium*. A model system for the delivery of recombinant therapeutic proteins *in vivo*. **J. Immunol.**, v. 148, n. 4, p. 1176-1181, 1992.

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: CVE. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/>. Acesso em: 8 jan. 2009.

CERQUETTI, M. C.; GHERARDI, M. M. Vaccination of chickens with a temperature-sensitive mutant of *Salmonella enteritidis*. **Vaccine**, v. 18, n. 11-12, p. 1140-1145, 2000.

ÇETINKAYA, B.; ERTAS, H. B.; ONGOR, H.; MUZ, A. Detection of *Leptospira* species by polymerase chain reaction (PCR) in urine of cattle. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.**, v. 24, p. 123-130, 2000.

CHANG, Y. F.; CHEN, C. S.; PALANIAPPAN, R. U.; HE, H.; MCDONOUGH, S. P.; BARR, S. C.; YAN, W.; FAISAL, S. M.; PAN, M. J.; CHANG, C. F. Immunogenicity of the recombinant leptospiral putative outer membrane proteins as vaccine candidates. **Vaccine**, v. 25, n. 48, p. 8190-8197, 2007.

CORRÊA, M. O. A.; HYAKUTAKE, S.; NATALE, V.; GALVÃO, P. A.; AGUIAR, H. A. Estudos sobre a *Leptospira wolffii* em São Paulo. **Rev. Inst. Adolfo Lutz.**, v. 25/27, p. 11-25, 1965/67.

COVINI, G.; CHAN, E. K.; COLOMBO, M.; TAN, E. M. Comparison of protocols for depleting anti-*E.coli* antibody in immunoblotting of recombinant antigens. **J. Immunol. Methods**, v. 190, n. 1, p. 143-145, 1996.

CULLEN, P. A.; CORDWELL, S. J.; BULACH, D. M.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 2311-2318, 2002.

CULLEN, P. A.; XU, X.; MATSUNAGA, J.; SANCHEZ, Y.; KO, A. I.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Surfaceome of *Leptospira* spp. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 4853-4863, 2005.

DEMPLE, B. Redox signaling and gene control in *Escherichia coli* soxRS oxidative stress regulon – a review. **Gene**, v. 179, p. 53-57, 1996.

ECHCHANNAOUI, H.; BIANCHI, M.; BAUD, D.; BOBST, M.; STEHLE, J.C.; NARDELLI-HAEFLIGER, D. Intravaginal immunization of mice with recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium expressing human papillomavirus type 16 antigens as a potential route of vaccination against cervical cancer. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 5, p. 1940-1951, 2008.

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

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

FINN, R. D.; MISTRY, J.; SCHUSTER-BÖCKLER, B.; GRIFFITHS-JONES, S.; HOLLICH, V.; LASSMANN, T.; MOXON, S.; MARSHALL, M.; KHANNA, A.; DURBIN, R.; EDDY, S. R.; SONNHAMME, E. L.; BATEMAN, A. Pfam: clans, web tools and services. **Nucleic Acids Res.**, v. 34, p. 247-251, 2006. Available from: <http://pfam.sanger.ac.uk/>. Acesso em: 12 jan. 2006.

FLANNERY, B.; COSTA, D.; CARVALHO, F. P.; GUERREIRO, H.; MATSUNAGA, J.; DA SILVA, E. D.; FERREIRA, A. G.; RILEY, L. W.; REIS, M. G.; HAAKE, D. A.; KO, A. I. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 9, p. 3303-3310, 2001

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.

GARDY, J. L.; LAIRD, M. R.; CHEN, F.; REY, S.; WALSH, C. J.; ESTER, M.; BRINKMAN, F. S. PSORTb v.2.0: expanded prediction of bacterial protein subcellular localization and insights gained from comparative proteome analysis. **Bioinformatics**, v. 21, n. 5, p. 617-623, 2005. Available from: <http://www.psорт.org/psортb/>. Acesso em: 25 mar. 2006.

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.

GASTEIGER, E.; GATTIKER, A.; HOOGLAND, C.; IVANYI, I.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. *Expasy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis*. **Nucleic Acids Res.**, v. 31, p. 3784-3788, 2003. Available from: <http://ca.expasy.org/>. Acesso em: 8 jun. 2007.

GÓMEZ, R. M.; VIEIRA, M. L.; SCHATTNER, M.; MALAVER, E.; WATANABE, M. M.; BARBOSA, A. S.; ABREU, P. A.; DE MORAIS, Z. M.; CIFUENTE, J. O.; ATZINGEN, M. V.; OLIVEIRA, T. R.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. Putative outer membrane proteins of *Leptospira interrogans* stimulate human umbilical vein endothelial cells (HUVECS) and express during infection. **Microb. Pathog.**, v. 45, p. 315-322, 2008.

GÓMEZ-DUARTE, O. G.; GALEN, J.; CHATFIELD, S. N.; RAPPUOLI, R.; EIDELS, L.; LEVINE, M. M. Expression of fragment C of tetanus toxin fused to a carboxyl-terminal fragment of diphtheria toxin in *Salmonella typhi* CVD 908 vaccine strain. **Vaccine**, v. 13, n. 16, p. 1596-1602, 1995.

GOÑI, F. M.; ALONSO, A. Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity. **FEBS Lett.**, v. 531, n. 1, p. 38-46, 2002.

GORINA, S.; PAVLETICH, N.P. Structure of the p53 tumor suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2. **Science**, v. 274, p. 1001-1005, 1996.

GUERREIRO, H.; CRODA, J.; FLANNERY, B.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; GALVÃO REIS, M.; LEVETT, P. N.; KO, A. I.; HAAKE, D. A. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 4958-4968, 2001.

HAAKE, D. A.; CHAO, G.; ZUERNER, R. L.; BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; LEVETT, P. N.; BOLIN, C. A. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 2276-2285, 2000.

HAAKE, D. A.; DUNDOO, M.; CADER, R.; KUBAK, B. M.; HARTSKEERL, R. A.; SEJVAR, J. J.; ASHFORD, D. A. Leptospirosis, water sports, and chemoprophylaxis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 34, n. 9, p. 40-43, 2002.

HE, H. J.; WANG, W. Y.; WU, Z. D.; LV, Z. Y.; LI, J.; TAN, L. Z. Protection of guinea pigs against *Leptospira interrogans* serovar Lai by LipL21 DNA vaccine. **Cell. Mol. Immunol.**, v. 5, n. 5, p. 385-391, 2008.

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.

HOPKINS, S.; KRAEHENBUHL, J. P.; SCHÖDEL, F.; POTTS, A.; PETERSON, D.; DE GRANDI, P.; NARDELLI-HAEFLIGER, D. A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine induces local immunity by four different routes of immunization. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 9, p. 3279-3286, 1995.

HOWELL, M. L.; ALSABBAGH, E.; MA, J. F.; OCHSNER, U. A.; KLOTZ, M. G.; BEVERIDGE, T. J.; BLUMENTHAL, K. M.; NIEDERHOFFER, E. C.; MORRIS, R. E.; NEEDHAM, D.; DEAN, G. E.; WANI, M. A. AnkB, a periplasmic ankyrin-like protein in *Pseudomonas aeruginosa*, is required for optimal catalase B (KatB) activity and resistance to hydrogen peroxide. **J. Bacteriol.**, v. 16, p. 4545-4556, 2000.

IKOEV, V. N.; GORBUNOV, M. A.; VACHAEV, B. F.; IAGOVKIN, E. A.; KONDRATENKO, V. F.; ANAN'INA, I. U. V.; ANSIMOVA, T. I.; KOSTINA, N. I.; IUR'EVA, I. L.; NIKITIN, M. G. The evaluation of the reactogenicity and immunogenic activity of a new concentrated inactivated leptospirosis vaccine. **Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.**, v. 4, p. 39-43, 1999.

JESPERSGAARD, C.; ZHANG, P.; HAJISHENGALLIS, G.; RUSSELL, M. W.; MICHALEK, S. M. Effect of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium expressing a *Streptococcus mutans* antigen on secondary responses to the cloned protein. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 11, p. 6604-6611, 2001.

JONES, D. T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. **J. Mol. Biol.**, v. 292, p. 195-202, 1999. Available from: <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>. Acesso em: 20 out. 2007.

KAPLAN, E. L.; MEIER, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **J. Am. Stat. Assoc.**, v. 53, p. 457-481, 1958.

KASAROV, L. B. Degradation of erythrocyte phospholipids and haemolysis of the erythrocytes of different animal species by leptospirae. **J. Med. Microbiol.**, v. 3, p. 29-37, 1970.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1751, n. 2, p. 119-139, 2005.

KHAN, C. M. A.; VILLAREAL-RAMOS, B.; PIERCE, R. J.; RIVEAU, G.; DEMARCO-HORMAECHÉ, R.; MCNEILL, H.; ALI, T.; FAIRWEATHER, N.; CHATFIELD, S.; CAPRON, A.; DOUGAN, G.; HORMAECHÉ, C. E. Construction, expression, and immunogenicity of the *Schistosoma mansoni* P28 glutathione S-transferase as a genetic fusion to tetanus toxin fragment C in a live Aro attenuated vaccine strain of *Salmonella*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 11261-11265, 1994.

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.

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

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Molecular cloning and characterization of a novel leptospiral lipoprotein with OmpA domain. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 226, p. 215-219, 2003.

KRAMER, T. T.; ROOF, M. B.; MATHESON, R. R. Safety and efficacy of an attenuated strain of *Salmonella choleraesuis* for vaccination of swine. **Am. J. Vet. Res.**, v. 53, n. 4, p. 444-448, 1992.

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.

LEE, S. H.; CARPENTER, J. F.; CHANG, B. S.; RANDOLPH, T. W.; KIM, Y. S. Effects of solutes on solubilization and refolding of proteins from inclusion bodies with high hydrostatic pressure. **Protein Sci.**, v. 15, p. 304-313, 2006.

LEE, S. H.; KIM, S.; PARK, S. C.; KIM, M. J. Cytotoxic activities of *Leptospira interrogans* hemolysin SphH as a pore-forming protein on mammalian cells. **Infect. Immun.**, v. 1, p. 315-322, 2002.

LETUNIC, I.; COPLEY, R. R.; SCHMIDT, S.; CICCARELLI, F. D.; DOERKS, T.; SCHULTZ, J.; PONTING, C. P.; BORK, P. SMART 4.0: towards genomic data integration. **Nucleic Acids Res.**, v. 32, n. 1, p. 142-144, 2004. Available from: <http://smart.embl-heidelberg.de/>. Acesso em: 7 mar. 2007.

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

LEVETT, P. N.; BRANCH, S. L. Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay methods for detection of immunoglobulin M antibodies in acute leptospirosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 66, n. 6, p. 745-748, 2002.

LO, M.; BULACH, D. M.; POWELL, D. R.; HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J.; PAUSTIAN, M. L.; ZUERNER, R. L.; ADLER, B. Effects of temperature on gene expression patterns in *Leptospira interrogans* serovar Lai as assessed by whole-genome microarrays. **Infect. Immun.**, v. 10, p. 5848-5859, 2006.

LONDOÑO-ARCILA, P.; FREEMAN, D.; KLEANTHOUS, H.; O'DOWD, A. M.; LEWIS, S.; TURNER, A. K.; REES, E. L.; TIBBITTS, T. J.; GREENWOOD, J.; MONATH, T. P.; DARSLEY, M. J. Attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi expressing urease effectively immunizes mice against *Helicobacter pylori* challenge as part of a heterologous mucosal priming-parenteral boosting vaccination regimen. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 9, p. 5096-5106, 2002.

LUPAS, A.; VAN DYKE, M.; STOCK, J. Predicting coiled coils from protein sequences. **Science**, v. 252, p. 1162-1164, 1991. Available from: http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html. Acesso em: 20 jun. 2007.

MARIYA, R.; CHAUDHARY, P.; KUMAR, A. A.; THANGAPANDIAN, E.; AMUTHA, R.; SRIVASTAVA, S. K. Evaluation of a recombinant LipL41 antigen of *Leptospira interrogans* serovar

canicola in ELISA for serodiagnosis of bovine leptospirosis. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 29, n. 5-6, p. 269-277, 2006.

MARTIN-GALLARDO, A.; FLEISCHER, E.; DOYLE, S. A.; ARUMUGHAM, R.; COLLINS, P. L.; HILDRETH, S. W.; PARADISO, P. R. Expression of the G glycoprotein gene of human respiratory syncytial virus in *Salmonella typhimurium*. **J. Gen. Virol.**, v. 74, n. 3, p. 453-458, 1993.

MARTÍNEZ SÁNCHEZ, R.; OBREGÓN FUENTES, A. M.; PÉREZ SIERRA, A.; BALLY GIL, A.; DÍAZ GONZÁLEZ, M.; BARÓ SUÁREZ, M.; MENÉNDEZ CAPOTE, R.; RUIZ PÉREZ, A.; SIERRA GONZÁLEZ, G.; LÓPEZ CHÁVEZ, A.U. The reactogenicity and immunogenicity of the first Cuban vaccine against human leptospirosis. **Rev. Cubana Med. Trop.**, v. 50, n. 2, p. 159-166, 1998.

MAYHEW, M.; DA SILVA, A. C.; MARTIN, J.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; HARTL, F. U. Protein folding in the central cavity of the GroEL-GroES chaperonin complex. **Nature**, v. 6564, p. 420-426, 1996.

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

McKELVIE, N. D.; KHAN, S. A.; KARAVOLOS, M. H.; BULMER, D. M.; LEE, J. J., DEMARCO, R.; MASKELL, D. J.; ZAVALA, F.; HORMAECHE, C. E.; KHAN, C. M. Genetic detoxification of an *aroA* *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine strain does not compromise protection against virulent *Salmonella* and enhances the immune responses towards a protective malarial antigen. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 52, n. 2, p. 237-246, 2008.

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. 729-738, 1997.

Ministério da Saúde: Portal da Saúde. Disponível em: http://200.214.130.38/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21740. Acesso em: 14 maio 2007.

MULKERRIN, M.G. Protein structure analysis using circular dichroism. In: HAVEL, H. A. **Spectroscopic methods for determining structure in solution**. New York: VCH, 1996. p. 5-27.

MURRAY, G. L.; SRIKRAM, A.; HOKE, D. E.; WUNDER, E. A. J. R.; HENRY, R.; LO, M.; ZHANG, K.; SERMSWAN, R. W.; KO, A. I.; ADLER, B. The major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*. **Infect. Immun.**, 2008. In press.

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

MYERS, D. M. Manual de métodos para el diagnostico de la leptospirosis. Martinez: **Centro Panamericano de Zoonoses.**, 1985. Nota técnica n.30.

NAKAI, K.; KANEHISA, M. Expert system for predicting protein localization sites in gram-negative bacteria. **Proteins**, v. 10, p. 95-110, 1991. Available from: <http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html>. Acesso em: 17 set. 2006.

NAKAJIMA, E.; ROCHA, M. O.; GATTO, C. G. L. F.; SILVA, M. R.; MARTINS, E. A. L. Cloning of potential vaccine antigens from *L.interrogans* and *S.mansoni* to be expressed in attenuated *Salmonella typhimurium*. In: REUNIÃO CIENTÍFICA ANUAL DO INSTITUTO BUTANTAN, 2005, São Paulo. Memórias do Instituto Butantan. São Paulo: Secretaria do Estado da Saúde, 2005. p. 52.

NALLY, J. E.; WHITELEGGE, J. P.; AGUILERA, R.; PEREIRA, M. M.; BLANCO, D. R.; LOVETT, M. A. Purification and proteomic analysis of outer membrane vesicles from a clinical isolate of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **Proteomics**, v. 5, p. 144–152, 2005.

NARDELLI-HAEFLIGER, D.; RODEN, R. B.; BENYACOB, J.; SAHLI, R.; KRAEHNBUHL, J.P.; SCHILLER, J. T.; LACHAT, P.; POTTS, A.; DE GRANDI, P. Human papillomavirus type 16 virus-like particles expressed in attenuated *Salmonella typhimurium* elicit mucosal and systemic neutralizing antibodies in mice. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 8, p. 3328-3336, 1997.

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.

OLIVEIRA, T.R. **Estudo da resposta imune naturalmente adquirida contra proteínas recombinantes correspondentes a antígenos de estágios assexuados sanguíneos de *Plasmodium vivax***. 106 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

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.

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

PASETTI, M. F.; ANDERSON, R. J.; NORIEGA, F. R.; SZTEIN, M. B. Attenuated *guaBA Salmonella typhi* vaccine strain CVD915 as a live vector utilizing prokaryotic or eukaryotic expression systems to deliver foreign antigens and elicit immune responses. **Clin. Immunol.**, v. 92, p. 76-89, 1999.

PEREIRA, M. M. Leptospirose. In: CORRÊA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 1497-1508.

PIZZA, M.; SCARLATO, V.; MASIGNANI, V.; GIULIANI, M. M.; ARICO, B.; COMANDUCCI, M.; JENNINGS, G. T.; BALDI, L.; BARTOLINI, E.; CAPECCHI, B.; GALEOTTI, C.L.; LUZZI, E.; MANETTI, R.; MARCHETTI, E.; MORA, M.; NUTI, S.; RATTI, G.; SANTINI, L.; SAVINO, S.; SCARSELLI, M.; STORNI, E.; ZUO, P.; BROEKER, M.; HUNDT, E.; KNAPP, B.; BLAIR, E.; MASON, T.; TETTELIN, H.; HOOD, D. W.; JEFFRIES, A. C.; SAUNDERS, N. J.; GRANOFF, D. M.; VENTER, J. C.; MOXON, E. R.; GRANDI, G.; RAPPUOLI, R. Identification of vaccine candidates against serogroup B *meningococcus* by whole-genome sequencing. **Science**, v. 287, p. 1816-1820, 2000.

POLAND, G. A.; JACOBSON, R. M. The prevention of Lyme disease with vaccine. **Vaccine**, v. 19, p. 2303-2308, 2001.

PRICE, M. N.; HUANG, K. H.; ALM, E. J.; ARKIN, A. P. A novel method for accurate operon predictions in all sequenced prokaryotes. **Nucleic Acids Res.**, v.33, n.3, p.880-892. 2005. Available from: <http://www.microbesonline.org/operons/gnc267671.html#GNMinus>. Acesso em: 12 jun. 2006.

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.

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

RIETSCH, A.; BELIN, D.; MARTIN, N.; BECKWITH, J. An in vivo pathway for disulfide bond isomerization in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 13048-13053, 1996.

RISTOW, P.; BOURHY, P.; MCBRIDE, F. W.; FIGUEIRA, C. P.; HUERRE, M.; AVE, P.; GIRONS, I. S.; KO, A. I.; PICARDEAU, M. The OmpA-Like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. **PLoS Pathog.**, v. 3, p. 894-903, 2007.

ROBERTS, M.; LI, J.; BACON, A.; CHATFIELD, S. Oral vaccination against tetanus: comparison of the immunogenicities of *Salmonella* strains expressing fragment C from the nirB and htrA promoters. **Infect. Immun.**, v.7, p. 3080-3087, 1998.

RODRIGUEZ-GONZALEZ, I.; FILLONNEAU, C.; BLANCHET, B.; SUARD, I.; CATILINA, P.; ANDRE-FONTAINE, G. Efficacy of Spirolept vaccine against human leptospirosis as estimated by passive protection of laboratory rodents. **Med. Mal. Infect.**, v. 34, n. 5, p. 196-200, 2004.

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.

ROWE, G. E.; WELCH, R. A. Assays of hemolytic toxins. **Meth. Enzymol.**, v. 235, p. 657-667, 1994.

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.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3 v.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SEIXAS, F. K.; DA SILVA, E. F.; HARTWIG, D. D.; CERQUEIRA, G. M.; AMARAL, M.; FAGUNDES, M. Q.; DOSSA, R. G.; DELLAGOSTIN, O. A. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. **Vaccine**, v. 26, n. 1, p. 88-95, 2007.

SETUBAL, J. C.; REIS, M.; MATSUNAGA, J.; HAAKE, D. A. Lipoprotein computational prediction in spirochaetal genomes. **Microbiology**, v. 152, p. 113-121, 2006. Available from: <http://jcslab.vbi.vt.edu/splip/>. Acesso em: 3 mar. 2007.

SHACKELFORD, G.; KARPLUS, K. Contact prediction using mutual information and neural nets. **Proteins**, v. 69, p. 159-164, 2007. Available from: http://compbio.soe.ucsc.edu/SAM_T08/T08-query.html. Acesso em: 5 mar. 2008.

SHEORAN, A. S; TIMONEY, J. F.; TINGE, S. A.; SUNDARAM, P.; CURTISS R. Intranasal immunogenicity of a Deltacya Deltacrp-pabA mutant of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium for the horse. **Vaccine**, v. 19, n. 25-26, p. 3591-3599, 2001.

SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **J. Biotechnol.**, v. 115, n. 2, p. 113-128, 2005.

SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **Microb. Cell. Fact.**, v. 4, p. 1, 2005.

ST. JOHN, R. J.; CARPENTER, J. F.; BALNY, C.; RANDOLPH, T. W. High pressure refolding of recombinant human growth hormone from insoluble aggregates - structural transformations, kinetic barriers, and energetic. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 46856-46863, 2001.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994. Available from: http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw. Acesso em: 12 jun. 2006.

TROWBRIDGE, A. A.; GREEN, J. B.; BONNET, J. D.; SHOHET, S. B.; PONNAPPA, B. D.; MCCOMBS, W. B. Hemolytic anemia associated with leptospirosis morphologic and lipid studies. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 76, p. 493-498, 1981.

TSUMOTO, K.; EJIMA, D.; KUMAGAI, I.; ARAKAWA, T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. **Protein Expr. Purif.**, v. 28, p. 1-8, 2003.

TSUMOTO, K.; UMETSU, M.; KUMAGAI, I.; EJIMA, D.; PHILO, J. S.; ARAKAWA, T. Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. **Biotechnol. Prog.**, v. 20, n. 5, p. 1301-1308, 2004.

VIEIRA, M. L.; D'ATRI, L. P.; SCHATTNER, M.; HABARTA, A. M.; BARBOSA, A. S.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; ABREU, P. A.; GÓMEZ, R. M.; NASCIMENTO, A. L. A novel leptospiral protein increases ICAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 276, n. 2, p. 172-80, 2007.

VINDURAMPULLE, C. J.; CUBEROS, L. F.; BARRY, E. M.; PASETTI, M. F.; LEVINE, M. M. Recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhi in a prime-boost strategy. **Vaccine**, v. 9, n. 22, p. 3744-3750, 2004.

VON MERING, C.; JENSEN, L. J.; KUHN, M.; CHAFFRON, S.; DOERKS, T.; KRÜGER, B.; SNEL, B.; BORK, P. STRING 7--recent developments in the integration and prediction of protein interactions. **Nucleic Acids Res.**, v. 35, 2007. Available from: <http://string.embl.de/>. Acesso em: 12 jun. 2006.

WANDERSMAN, C.; STOJILJKOVIC, I. Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 3, n. 2, p. 215-220, 2000.

WARD, S. J.; DOUCE, G.; FIGUEIREDO, D.; DOUGAN, G.; WREN, B. W. Immunogenicity of a *Salmonella typhimurium* aroA aroD vaccine expressing a nontoxic domain of *Clostridium difficile* toxin A. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 5, p. 2145-2152, 1999.

World Health Organization. **Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control**. [Geneva]: WHO, 2003. 109 p.

WIZEMANN, T. M.; HEINRICHS, J. H.; ADAMOU, J. E.; ERWIN, A. L.; KUNSCH, C.; CHOI, G. H.; BARASH, S. C.; ROSEN, C. A.; MASURE, H. R.; TUOMANEN, E.; GAYLE, A.; BREWAH, Y. A.; WALSH, W.; BARREN, P.; LATHIGRA, R.; HANSON, M.; LANGERMANN, S.; JOHNSON, S.; KOENIG, S. Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 1593-1598, 2001.

YAN, Y.; CHEN, Y.; LIOU, W.; DING, J.; CHEN, J.; ZHANG, J.; ZHANG, A.; ZHOU, W.; GAO, Z.; YE, X.; XIAO, Y. An evaluation of the serological and epidemiological effects of the outer envelope vaccine to leptospira. **J. Chin. Med. Assoc.**, v. 66, n. 4, p. 224-230, 2003.

YANG, C. W.; WU, M. S.; PAN, M. J.; HSIEH, W. J.; VANDEWALLE, A.; HUANG, C. C. The *Leptospira* outer membrane protein LipL32 induces tubulointerstitial nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 13, p. 2037-2045, 2002.

ZHANG, W.; CARMICHAEL, J.; FERGUSON, J.; INGLIS, S.; ASHRAFIAN, H.; STANLEY, M. Expression of human papillomavirus type 16 L1 protein in *Escherichia coli*: denaturation, renaturation, and self-assembly of virus-like particles in vitro. **Virology**, v. 243, n. 2, p. 423-431, 1998.

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.

ZUERNER, R. L.; KNUDTSON, W.; BOLIN, C. A.; TRUEBA, G. Characterization of outer membrane and secreted proteins of *Leptospira interrogans* serovar pomona. **Microb. Pathog.**, v. 10, p. 311-322, 1991.