

DENIZE MONARIS

Avaliação do potencial imunogênico e vacinal das flagelinas de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni

São Paulo
2015

DENIZE MONARIS

Avaliação do potencial imunogênico e vacinal das flagelinas de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada as Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS)

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada as Zoonoses

Orientadora:

Prof^a. Dra. Patrícia Antonia Estima Abreu de Aniz

São Paulo
2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3094
FMVZ

Monaris, Denize
Avaliação do potencial imunogênico e vacinal das flagelinas de *Leptospira interrogans* sorovar
Copenhageni / Denize Monaris. -- 2015.
98 f. :il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada as Zoonoses.
Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada as Zoonoses.

Orientador: Profª. Dra. Patrícia Antonia Estima Abreu de Aniz.

1. Leptospira. 2. Vacinas. 3. Adjuvantes. 4. Flagelina. 5. Leptospirose. 6. TRL-5. 7. LigAC. I. Título.

ERRATA

MONARIS, D. **Avaliação do potencial imunogênico e vacinal das flagelinas de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni**. 2015. 98 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Página	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
RESUMO	Palavras-chave	acrescentar	Leptospirose
ABSTRACT	Key-words	acrescentar f	Leptospirosis



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação do potencial imunogênico e vacinal das flagelinas de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni", protocolado sob o nº 2151/2011, utilizando 200 (duzentos) hamsters, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Sílvio Arruda Vasconcellos, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 04/5/2011.

We certify that the Research "Evaluation of the immunogenic and vaccinal potential of flagellins of *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni", protocol number 2151/2011, utilizing 200 (two hundred) hamsters, under the responsibility Prof. Dr. Sílvio Arruda Vasconcellos, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/04/2011.

São Paulo, 05 de maio de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MONARIS, Denize

Título: Avaliação do potencial imunogênico e vacinal das flagelinas de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada as Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

A Deus, a minha orientadora, a minha família.

AGRADECIMENTOS

A realização deste Doutorado foi mais uma importante etapa em minha formação profissional e pessoal, neste caminho fui agraciada por trabalhar ao lado de pessoas capacitadas que tornaram este trabalho possível e enriqueceram meus conhecimentos.

Com muito carinho agradeço:

À minha orientadora, *Dra. Patrícia A. E. Abreu de Aniz*, que me acolheu em seu laboratório, acreditou, apostou e sempre me incentivou. A você dedico toda minha admiração e respeito e agradeço profundamente todo o profissionalismo, paciência e carinho. Obrigada por tudo!

À Angela Silva Barbosa, que igualmente me acolheu no laboratório e sempre me proporcionou colaborações em seus projetos, a amizade e os ensinamentos do dia a dia.

À minha família... meus pais *Wilson* e *Cleide*, minhas irmãs *Elaine*, *Márcia* e *Aline*, meus cunhados *Jaime*, *Adriano* e *Marcelo*. É com muito carinho que agradeço o apoio e o amor que me sustenta diariamente.

Aos meus amigos e amigas do laboratório de Bacteriologia, pela presença especial em minha vida. À vocês, *Ludmila*, *Ligia*, *Tati Gotti*, *Lidia*, *Demétria*, *Matilde*, *Larissa*, *Joana*, *Natalia*, *Adriana*, *Tati Fraga*, *Mónica*, *Adriana Martinez*, *Claudia*, *Camila*, *Franciely*, *Afonso*, *Fernando*, *Roberto* e tantos outros nomes que deveriam ser citados aqui, que contribuíram para um dia a dia de trabalho muito prazeroso, onde fui ajudada e pude ajudar. Sou privilegiada por estar na companhia de vocês, admiro e respeito muito cada um. Tenho certeza que formamos um grupo muito especial, de ótimo convívio, conversas, troca de experiências, e muitas, muitas risadas. Que bom ter este espaço para agradecer a amizade... obrigada!

Meus sinceros agradecimentos aos colaboradores deste projeto:

Ao *Dr. Silvio Arruda Vasconcellos*, *Zenaide*, e a *Gisele* do Laboratório de Epidemiologia e Zoonoses Bacterianas (FMVZ-USP), que me permitiram usar as dependências do laboratório, pela manutenção das culturas de leptospira e auxílio no trabalho com os animais.

Ao Prof. *Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira* do Departamento de Microbiologia (ICB-USP), a *Dra. Maria Elisabete Sbrogio-Almeida* do Centro de Biotecnologia (Instituto Butantan), que disponibilizaram a bactéria *S. Thyphimurium* para a obtenção da flagelina *FliCi*, as dependências do laboratório, alunos e equipamentos. À *Dra. Catarina Braga*, *Dr. Wilson Luis* pela colaboração nos experimentos de TLR-5 e à *Dra. Carina B. Lima* pela colaboração e discussões sobre os experimentos com flagelinas e expressão de citocinas.

À Dra. Roxane Maria F. Piazza, Dr. Waldir Elias, Dra. Elizabeth A. L. Martins e Dr. Paulo Lee Ho do Instituto Butantan, que abriram as portas e me permitiram utilizar as dependências e equipamentos de seus laboratórios, obrigada.

À FAPESP – *Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo*, pelo apoio financeiro que tornou possível a realização deste projeto (FAPESP 2010/20525-2) e a *Pró-Reitoria de Pós-Graduação* da USP pelo apoio.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada as Zoonoses (FMVZ-USP) por toda a ajuda, ensinamento e trabalho prestado, sou muito grata.

Aos demais pesquisadores, estudantes e funcionários do Instituto Butantan e da USP que tornaram a convivência diária um grande aprendizado.

“Nunca tenha certeza de nada, porque a sabedoria começa com a dúvida”
Sigmund Freud

*“A fé e a razão são as duas asas com as quais
o espírito humano alça voo para contemplar a verdade”*
Papa João Paulo II

*“Quanto mais eu estudo a natureza mais fico impressionado com a obra do Criador.
Nas menores de suas criaturas Deus colocou propriedades extraordinárias”*
Louis Pasteur

RESUMO

MONARIS, D. **Avaliação do potencial imunogênico e vacinal das flagelinas de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni.** [Evaluation of the immunogenic potential of flagellins *Leptospira* like adjuvant for development of a subunit vaccine against leptospirosis]. 2015. 98 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A leptospirose é uma zoonose de importância global causada por leptospirosas patogênicas, que colonizam os túbulos renais de animais selvagens e domésticos. Vacinas comerciais estão sendo usadas, porém promovem proteção apenas contra os sorovares presentes na preparação e falham em induzir imunidade de longa duração. A porção carboxi-terminal da proteína *immunoglobulin like – A* (LigAC) é capaz de induzir imunoproteção contra a leptospirose. No entanto, a imunização com a LigAC não confere imunidade esterilizante. Flagelinas têm sido consideradas adjuvante promissor para o desenvolvimento de vacinas. As leptospirosas possuem dois flagelos periplasmáticos que são constituídos por duas classes de proteínas (FlaA e FlaB). Somente as proteínas FlaB apresentam homologia com as regiões importantes que ativam as respostas dependentes ao receptor *Toll-like 5* (TLR-5). Neste estudo, avaliou-se a capacidade de indução da atividade do TLR5 das cinco flagelinas de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (FlaB1, FlaB2, FlaB3, FlaB4 e FlaB5) e o potencial vacinal destas flagelinas na imunidade protetora de LigAC contra o desafio letal em hamsters. As flagelinas recombinantes foram expressas em *E. coli* e purificadas por cromatografia de afinidade com níquel. Os hamsters foram imunizados por via subcutânea com as flagelinas purificadas e LigAC. Dados experimentais demonstram que todas as flagelinas foram capazes de ativar o receptor TLR5 e a secreção de citocinas em macrófagos estimulados de maneira similar. Nos ensaios de desafio, a maioria dos animais imunizados com as flagelinas e LigAC sobreviveram ao desafio letal entretanto, não foram protegidos contra a colonização renal. Os animais do grupo controle vacinados com PBS morreram com sintomas de leptospirose e hamsters imunizados com a vacina comercial sobreviveram após o desafio.

Palavras-chave: *Leptospira*. Vacinas. Adjuvantes. Flagelina. TLR-5.

ABSTRACT

MONARIS, D. **Evaluation of the immunogenic potential of flagellins *Leptospira* like adjuvant for development of a subunit vaccine against leptospirosis.** [Avaliação do potencial imunogênico e vacinal das flagelinas de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni]. 2015. 98 p. (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Leptospirosis is a zoonosis of global importance caused by pathogenic leptospires that colonize the renal tubules of wild and domestic animals. Commercial vaccines are being used, but only to promote protection against the serovar in the preparation; they have failed to induce short-term immunity. The C-terminal portion of immunoglobulin-like protein A (LigAC) is able to induce immunoprotection against leptospirosis. However, immunization with LigAC did not confer sterilizing immunity. Flagellins have been considered a promising adjuvant for vaccine development. Leptospires have two periplasmic flagella that are formed by two classes of proteins (FlaA and FlaB); only FlaB proteins show homology with important regions that elicit TLR5-dependent responses. In the present study, we have evaluated their ability to induce the TLR5 activity and the protective activity of five *L. interrogans* sorovar Copenhageni flagellins (FlaB1, FlaB2, FlaB3, FlaB4 and FlaB5) in the protective immunity of LigAC against lethal challenge in hamsters. The recombinant flagellins expressed in *E. coli* were purified by nickel affinity chromatography. Hamsters were immunized subcutaneously with purified flagellins with LigAC. Experimental data showed that all flagellins activated both the TLR-5 receptor and the secretion of cytokines in stimulated macrophages, similarly. In challenge assays, the majority of hamsters immunized with the flagellins and LigAC survived the lethal challenge. However, they were not protected against kidney colonization. The control animals vaccinated with PBS died with symptoms of leptospirosis and hamsters vaccinated with commercial vaccine survived after challenge.

Key-words: *Leptospira*. Vaccine. Adjuvants. Flagellin. TLR-5.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - O alinhamento das sequências de aminoácidos das regiões amino e carboxi-terminais conservadas das cinco flagelinas de <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Copenhageni codificadas pelos genes LIC11531, LIC11532, LIC11889, LIC11890 e LIC12947 e de outras bactérias.....	25
Figura 2 - Representação esquemática do plano de ensaio de imunoproteção em hamsters.....	36
Figura 3 - Proteína purificada do flagelo de <i>S. enterica</i> sorovar Thyphimurium.	46
Figura 4 - Análise dos produtos obtidos por PCR a partir do DNA genômico de <i>Leptospira interrogans</i>	47
Figura 5 - Análise dos produtos obtidos por PCR para construção do plasmídeo pAE.....	48
Figura 6 - Análise de expressão, solubilidade e purificação das flagelinas recombinantes de <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni.....	51
Figura 7 - Flagelinas recombinantes de <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni purificadas	52
Figura 8 - Obtenção de lisado total, frações subcelulares por extração com Triton X-114 e proteínas secretadas.....	53
Figura 9 - Localização celular de flagelinas de leptospiros por <i>Western Blot</i>	54
Figura 10 - Expressão, conservação e detecção de flagelinas expressas em em diferentes sorovares de <i>Leptospira spp</i> , com soro de camundongos hiperimunes por <i>Western Blotting</i>	55
Figura 11 - Análise de ausência ou presença de colonização renal por leptospiros, através de passagem em meio de cultura	57
Figura 12 - Índice de sobrevivência dos hamsters após ensaio de imunoproteção.....	59

Figura 13 - Análise da resposta humoral de hamsters por <i>ELISA</i>	61
Figura 14 - Análise da resposta humoral de hamsters por <i>ELISA</i> em placas sensibilizadas com LigAC recombinante.....	64
Figura 15 - Obtenção de anticorpo policlonal em camundongos BALB/c.....	67
Figura 16 - Análise das flagelinas recombinantes e LigAC recombinante de <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni por Anti-His.....	68
Figura 17 - Detecção das flagelinas recombinantes e LigAC recombinante com soro de hamsters por <i>W. blotting</i>	70
Figura 18 - Detecção de flagelinas expressas em diferentes temperaturas, com soro de camundongos hiperimunes por Western Blotting.....	72
Figura 19 - Avaliação da expressão <i>in vitro</i> e reconhecimento por soro hiperimune de flagelinas de <i>Leptospira</i>	74
Figura 20 - Secreção de IL-8 pelas células Hek293 transfectadas com TRL5 (EXP 1 e EXP2) e não transfectadas (Hek293) e estimuladas com as flagelinas recombinantes de leptospira e FliCi (controle positivo).....	76
Figura 21 - Quantificação de IL-6 <i>in vivo</i> induzidas por flagelinas recombinantes de leptospira.....	77
Figura 22 - Quantificação de citocinas (Th1/Th2) mediada por flagelinas recombinantes de leptospira em cultura de macrófagos de C57BL/6.....	80

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Ensaio piloto de imunoproteção em modelo animal. Proteção conferida pela imunização de hamsters desafiados com *L. interrogans* Copenhageni..... 61
- Tabela 2 - Ensaio de imunoproteção em modelo animal. Proteção conferida pela imunização de hamsters desafiados com *L. interrogans* Copenhageni..... 62
- Tabela 3 - Resumo de todos os ensaios de imunoproteção em modelo animal realizados. Proteção conferida pela imunização de hamsters desafiados com *L. interrogans* Copenhageni..... 65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Oligonucleotídeos usados nas clonagens e acesso no GenBank.....	29
Quadro 2 -	Preparação das doses para o ensaio piloto de imunoproteção.....	35
Quadro 3 -	Preparação das doses para o ensaio de imunoproteção	38
Quadro 4 -	Tamanho dos insertos obtidos através da dupla digestão das construções em pGEMT correspondentes às clonagens dos genes das flagelinas de <i>Leptospira interrogans</i>	48
Quadro 5 -	Características das flagelinas nativas e recombinantes de <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni codificadas pelos genes LIC11531, LIC11532, LIC11889, LIC11890, LIC12947 e características da proteína de membrana LigAC, codificada pelo gene LIC10465	49
Quadro 6 -	Resumo dos resultados obtidos neste trabalho.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
amp	Ampicilina
BSA	Albumina bovina sérica
CD	Dicroísmo circular
cDNA	DNA complementar
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
DO	Densidade óptica
EDTA	Ácido etileno diamino tetra-ácido
ELISA	<i>Enzyme linked immunossorbent assay</i>
EMJH	<i>Ellinghausen McCullough Johnson Harris</i>
FlaA	Proteína constituinte da bainha do flagelo bacteriano
FlaB	Proteína constituinte do núcleo do flagelo bacteriano
IgG	Imunoglobulina G
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactosídeo
kDa	kilo Dalton
LB	Luria Bertani
LB-amp	Luria Bertani suplementado com ampicilina
LIC	<i>Leptospira interrogans</i> sorovar Copenhageni
Lig	<i>Leptospiral Ig-like protein</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
m/v	massa/volume
MAT	<i>Microscopic Agglutination Test</i>
OPD	o-dihidrocloreto de fenilenodiamina
OMP	<i>outer membrane protein</i>
pb	Pares de bases
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PBS-T	Tampão fosfato contendo Tween 20

PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PMSF	<i>Phenilmetilsulfonyl fluoride</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA _m	Ácido Ribonucléico mensageiro
rpm	rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
T7	Promotor do fago T7
TAE	Tampão Tris-acetato e EDTA
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
Th1	Célula T auxiliadora tipo 1 (resposta imune celular)
Th2	Célula T auxiliadora tipo 2 (resposta imune humoral)
TLR-5	<i>Toll Like Receptor type 5</i>
Tris	Hidroxidometil amino-metano
v/v	volume/volume
DOTAP	dioleoyl trimethylammonium propane

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	OBJETIVO.....	26
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1	OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS PURIFICADAS.....	27
3.1.1	Obtenção e purificação da flagelinas nativa FliCi de Salmonella enterica sorovar Thyphimurium.....	27
3.1.2	Clonagem, expressão e purificação de flagelinas recombinantes de Leptospira interrogans sorovar Copenhageni.....	27
3.2	CULTIVO, OBTENÇÃO, ANÁLISE DA CONSERVAÇÃO, EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO CELULAR DE FLAGELINAS DE LEPTOSPIRA	31
3.2.1	Cultivo e manutenção de culturas de Leptospira.....	31
3.2.2	Cultura e obtenção do extrato total de Leptospira.....	32
3.2.3	Cultura e obtenção de proteínas secretadas de Leptospira.....	32
3.2.4	Ensaio de localização celular de flagelinas de Leptospira com Triton X-114.....	33
3.2.5	Estudo da expressão e conservação das flagelinas de Leptospira.....	33
3.3	IMUNIZAÇÃO, DESAFIO, OBTENÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL E AVALIAÇÃO DE RESPOSTA HUMORAL EM MODELO ANIMAL	34
3.3.1	Ensaio piloto de imunoproteção em hamsters.....	34
3.3.2	Avaliação do potencial adjuvante das flagelinas de leptospira na indução da resposta imunoprotetora contra a leptospirose em hamsters.....	37
3.3.3	Avaliação da Resposta Humoral em hamsters.....	38
3.3.4	Obtenção de anticorpo policlonal em camundongos BALB/c.....	39
3.4	ANÁLISE E DETECÇÃO DE FLAGELINAS DE LEPTOSPIRA ATRAVÉS DE WESTERN BLOTTING	40
3.4.1	Análise da expressão e detecção de flagelinas recombinantes de leptospira com Anti-His.....	40
3.4.2	Detecção de flagelinas recombinantes de leptospira com soros hiperimunes de hamsters imunizados	41

3.4.3	Análise da expressão das flagelinas nativas de leptospira em contanto com macrófagos, linhagem J774.....	41
3.5	CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE FLAGELINAS DE LEPTOSPIRA ATRAVÉS DA ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE CITOCINAS	42
3.5.1	Análise da expressão in vitro de IL-8 mediada por flagelinas recombinantes de leptospira através de ensaios de ativação do TLR5 em cultura celular, linhagem Hek293.....	42
3.5.2	Análise da expressão in vivo de IL-6 mediada por flagelinas recombinantes de leptospira em camundongos BALB/c	43
3.5.3	Análise da expressão in vitro de citocinas (Th1/Th2) mediada por flagelinas recombinantes de leptospira em cultura celular de macrófagos de C57BL/6.....	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1	OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS PURIFICADAS.....	46
4.1.1	Obtenção da flagelina FliCi de Salmonella enterica sorovar Thyphimurium.....	46
4.1.2	Clonagem de flagelinas recombinantes de Leptospira.....	47
4.1.3	Expressão e purificação das flagelinas recombinantes de Leptospira.....	49
4.1.4	Obtenção de anticorpo policlonal em camundongos.....	52
4.1.5	Análise da expressão e detecção de flagelinas recombinantes de leptospira com Anti-His.....	53
4.2	LOCALIZAÇÃO CELULAR E CONSERVAÇÃO EM DIFERENTES ESPÉCIES E SOROVARES.....	54
4.2.1	Localização celular das flagelinas de Leptospira interrogans.....	54
4.2.2	Expressão e conservação das flagelinas de Leptospira em diferentes espécies e sorovares de Leptospira	57
4.3	IMUNIZAÇÃO, DESAFIO, OBTENÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL E AVALIAÇÃO DE RESPOSTA HUMORAL EM MODELO ANIMAL.....	59
4.3.1	Ensaio piloto de imunoproteção em hamsters.....	59
4.3.2	Avaliação do potencial adjuvante das flagelinas de leptospira na indução da resposta imunoprotetora contra a leptospirose em hamsters.....	62
4.3.3	Avaliação da resposta humoral, detecção da imunogenicidade dos soros de hamsters dos experimentos do desafio por ELISA.....	66
4.4	ANÁLISE E DETECÇÃO DE FLAGELINAS DE LEPTOSPIRA ATRAVÉS DE WESTERN BLOTTING.....	69
4.4.1	Detecção de flagelinas recombinantes de leptospira com soros hiperimunes de hamsters imunizados.....	69
4.4.2	Detecção das flagelinas com soros hiperimunes de camundongos	71

4.4.3	Análise da expressão in vitro de flagelina nativa de leptospira em cultura de macrófagos, linhagem J774.....	72
4.5	CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE FLAGELINAS DE LEPTOSPIRA ATRAVÉS DA ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE CITOCINAS.....	75
4.5.1	Análise da expressão in vitro de IL-8 mediada por flagelinas recombinantes de leptospira através de ensaios de ativação do TLR5 em cultura celular, linhagem Hek293.....	75
4.5.2	Análise da expressão in vivo de IL-6 mediada por flagelinas recombinantes de leptospira em camundongos BALB/c.....	76
4.5.3	Análise da expressão in vitro de citocinas (Th1/Th2) mediada por flagelinas recombinantes de leptospira em cultura celular de macrófagos de C57BL/6.....	78
5	CONCLUSÃO.....	83
6	ATIVIDADES COMPLEMENTARES.....	84
	REFERÊNCIAS.....	91
	APÊNDICES.....	96

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de importância mundial causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, que colonizam os túbulos renais de animais silvestres ou domésticos e são liberadas no ambiente externo pela urina. A transmissão ocorre por meio de contato direto com animais infectados ou, mais frequentemente, pela exposição à água, alimentos e solo contaminados com sua urina (FARR, 1995; BHARTI et al., 2003; EVANGELISTA, COBURN, 2010).

Até 1989, o gênero *Leptospira* era dividido em duas espécies. A espécie *L. interrogans* (senso lato) que compreendia todas as estirpes patogênicas, e a *L. biflexa* (senso lato) com as cepas saprófitas (LEVETT, 2001). Posteriormente, o gênero foi reclassificado, com base em análises de sequenciamento do gene 16S, constituindo diferentes espécies genômicas, sendo nove espécies patogênicas, cinco intermediárias e sete espécies saprófitas (YASUDA et al., 1987; BRENNER et al., 1999, FAINE et al., 1999; KO et al., 2009 LEHMANN et al., 2014).

As leptospirosas também são classificadas em sorovares definidos por reações de aglutinação após absorção dos soros com antígenos homólogos. Os sorovares antigenicamente relacionados são reunidos num mesmo sorogrupo. Esta variedade antigênica se deve a heterogeneidade da estrutura na composição do LPS (lipopolissacarídeo). A classificação fenotípica em sorovar é amplamente utilizada devido à sua importância epidemiológica e clínica, embora, não se correlacione com a classificação genética (LEVETT, 2001; LEHMANN et al., 2014)

Cada sorovar de leptospira está, geralmente, adaptado a uma espécie particular de hospedeiro, conhecido como hospedeiro de manutenção (reservatório), neste, a doença manifesta-se de maneira subclínica e crônica com eliminação de leptospirosas pela urina (FAINE et al., 1999).

Em áreas urbanas, os principais reservatórios de leptospirosas são os roedores sinantrópicos das espécies *Rattus norvegicus* (rato de esgoto), *Rattus rattus* (rato de telhado) e *Mus musculus* (camundongo). Os seres humanos são hospedeiros acidentais e a transmissão entre pessoas é rara (LEVETT, 2001).

No Brasil, a leptospirose é considerada um problema de saúde pública. É bastante disseminada principalmente em épocas de chuvas, pois muitas áreas estão sujeitas a alagamentos e possuem saneamento básico deficiente. São relatados mais de 10.000 casos de

leptospirose grave todo ano (REIS et al., 2008; SUS, 2013). Na pecuária, a leptospirose tem causado grandes perdas econômicas por influenciar o potencial reprodutivo do rebanho. Nos bovinos, por exemplo, provoca infertilidade, mastites, abortos, natimortalidade e decréscimo na produção de leite e de carne (FAINE et al., 1999).

As leptospirosas patogênicas invadem os tecidos do hospedeiro através da penetração pela pele lesada ou mucosas da boca, narina e olhos. Espalham-se pelo organismo pela corrente sanguínea e causam lesões, principalmente, no fígado e rins, onde produzem hemorragia e necrose tecidual, resultando na disfunção desses órgãos (FAINE et al., 1999; ADLER, 2014; PICARDEAU, 2013).

As manifestações clínicas da leptospirose humana ocorrem em duas fases distintas. Na fase aguda ou septicêmica, o paciente apresenta febre alta, dores de cabeça, mialgias. Posteriormente, a fase imune inicia-se com estado febril, produção de anticorpos aglutinantes e excreção de leptospirosas pela urina. A leptospirose grave inicia-se com sintomas bastante intensos, como dor nas panturrilhas e febre e evolui para doença icterica com insuficiência renal e hemorragia pulmonar, representando 5 a 10% do número total de casos, podendo chegar a 40% de letalidade (LEVETT, 2001; VINETZ, 2001).

O tratamento do paciente com leptospirose é feito com antibióticos (doxiciclina e penicilinas) que reduzem as chances de evolução para a forma grave. (BHARTI et al., 2003; LEVETT, 2003). O diagnóstico clínico da doença não é fácil, devido à variedade de sintomas e ao fato de serem semelhantes aos de outras doenças tropicais, mas pode ser confirmado por meio de testes sorológicos como o MAT (*microscopic agglutination test*), técnica de referência indicada pela Organização Mundial da Saúde (LEVETT, 2001; 2003).

O controle da leptospirose envolve medidas difíceis de serem adotadas, como a eliminação de roedores e a melhoria das condições de moradia da população, o que têm contribuído para um aumento da incidência da leptospirose em países tropicais e reforçam a necessidade de desenvolvimento de uma vacina eficiente (FAINE et al., 1999).

As vacinas comerciais disponíveis, até o momento, consistem em preparações de culturas de leptospirosas de diferentes sorovares de *L. interrogans* inativadas pela ação do calor e/ou formol (bacterinas). São amplamente usadas na pecuária e licenciadas para uso humano somente em Cuba, Rússia, China e Argentina. Todas apresentam baixa eficiência, pois promovem proteção usualmente contra os sorovares presentes na preparação e falham em induzir imunidade de longa duração, o que requer administração anual ou semestral (FAINE et al., 1999; BHARTI et al., 2003). Além disso, contêm uma série de contaminantes oriundos

do processo de obtenção, como componentes do meio e LPS, que têm sido associados a efeitos adversos (VERMA et al., 2013).

Como alternativa, tem sido proposto o desenvolvimento de uma vacina multivalente com o emprego de proteínas de membrana de *Leptospira*, que além de estarem envolvidas na interação das bactérias com as células do hospedeiro, também são bastante conservadas entre as diferentes espécies e sorovares. Entre as proteínas avaliadas, destacam-se: a OmpL1 e a lipoproteína LipL41 que conferiram imunoproteção parcial em hamsters (HAAKE et al., 1999; BRANGER et al., 2001; 2005).

As proteínas Lig (*Leptospiral immunoglobulin-like*) pertencentes à família de proteínas bacterianas que se caracterizam pela presença de domínios Big repetidos também tem sido estudadas. Três genes *lig* (*ligA*, *ligB* e *ligC*) já foram descritos e só estão presentes em espécies patogênicas (KOIZUMI, WATANABE, 2004; MATSUNAGA et al., 2003, PALANIAPPAN et al., 2002).

LigA e LigB estão localizadas na membrana externa da bactéria e participam dos processos de adesão das leptospiros às células do tecido do hospedeiro e são considerados os candidatos vacinais mais promissores testados, até o momento. Resultados obtidos por vários grupos mostraram que estas proteínas foram capazes de induzir proteção contra leptospirose em camundongos C3H/HeJ e hamsters (KOIZUMI, WATANABE, 2004; PALANIAPPAN et al., 2007; SILVA et al., 2007; FAISAL et al., 2008). Mais recentemente, como vacina de DNA, as proteínas LigA e LigB foram capazes de induzir 100% de proteção contra a morte e proteção contra a colonização dos órgãos em 80% de hamsters imunizados e desafiados (FOSTER et al., 2013)

O fragmento C-terminal da LigA foi capaz de conferir imunoproteção contra desafio letal em hamsters em experimentos que utilizaram a proteína recombinante com adjuvante de Freund (67 a 100% de proteção), com hidróxido de alumínio (50% de proteção), em sistemas carreadores formados por lipossomos (87,5% de proteção) e microesferas (75% proteção). Da mesma maneira, os fragmentos N-terminal da LigB (71% de proteção) e C-terminal da LigB (54% de proteção) recombinantes com hidróxido de alumínio como adjuvantes foram capazes de induzir proteção contra leptospirose em hamsters. Entretanto, em todos estes experimentos, os animais sobreviventes foram positivos no isolamento de leptospiros em amostras dos rins e fígado (SILVA et al., 2007; FAISAL et al., 2008; YAN et al., 2009).

Por outro lado, estudos utilizando bacterinas preparadas a partir de culturas de *L. interrogans* sorovar *autumnalis* inativadas pela ação do calor ou formol em hamsters mostraram que estas vacinas também não foram eficientes na prevenção da colonização dos

rins, embora tenham apresentado altas taxas de proteção (90-100%) e diminuição dos danos nos órgãos-alvo (SRIKRAM et al., 2008).

Os mecanismos de imunidade contra a leptospirose ainda não são completamente compreendidos. Sempre se acreditou que a resposta humoral fosse o principal mecanismo de defesa contra a leptospirose, entretanto, há relatos na literatura que indicam uma importante participação da resposta celular na imunidade adquirida contra a leptospirose (JOST et al., 1986; FAINE, 1999; DELLAGOSTIN et al., 2011).

Talvez a combinação de vários antígenos protéicos purificados com novas abordagens vacinais seja um caminho mais promissor para o desenvolvimento de uma vacina contra leptospirose capaz de induzir mecanismos imunológicos (humoral e celular) envolvidos na proteção e colonização dos órgãos-alvo. Entretanto, antígenos constituídos por subunidades e proteínas recombinantes purificadas possuem baixa imunogenicidade e requerem a adição de adjuvantes para melhorar a resposta imune. A identificação e desenvolvimento de novos adjuvantes são necessários porque há poucos licenciados para uso humano, entre eles o hidróxido de alumínio que induz o aumento na migração macrófágica e neutrófila para o sítio de inoculação e estimula a imunidade humoral (RESENDE et al., 2004).

O sistema imune dos mamíferos é formado pela imunidade inata e adaptativa. O desenvolvimento adequado dos mecanismos efetores da resposta imune adaptativa depende da ativação inicial de componentes da imunidade inata (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002). Os receptores *Toll-like* (TLRs) constituem uma importante família de receptores do sistema imune inato que reconhecem padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs). A ativação desses receptores por PAMPs induz a fagocitose e a liberação de citocinas e mediadores químicos. Estes eventos são fundamentais no desenvolvimento da resposta imune adaptativa subsequente (TAKEDA et al., 2003; AKIRA; TAKEDA, 2004).

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

As leptospirosas possuem dois flagelos localizados no espaço periplasmático que contribuem para a forma helicoidal espiralada e são responsáveis pelos movimentos de rotação e translação. Os filamentos destes flagelos são formados por duas classes de proteínas. As proteínas FlaA que formam a bainha e as proteínas FlaB que constituem o núcleo do

filamento. Entretanto, somente as proteínas FlaB apresentam homologia com as flagelinas de outras bactérias (CHARON; GOLDSTEIN, 2002; WOLGEMUTH et al., 2006).

O sequenciamento completo do genoma de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni permitiu a identificação de cinco genes que codificam possíveis flagelinas FlaB (NASCIMENTO et al., 2004a,b). O alinhamento das sequências de aminoácidos codificados por estes genes mostrou a presença de regiões importantes para a indução da atividade do TRL5 nas extremidades amino e carboxi-terminais conservadas (Figura 1).

2 OBJETIVO

O objetivo geral deste projeto foi avaliar a capacidade de indução da atividade do TLR5 das cinco flagelinas de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. E, também, o potencial vacinal destas flagelinas na indução de resposta imunoprotetora juntamente com uma proteína de membrana externa de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni recombinante LigAC (porção carboxi-terminal da proteína LigA) quando utilizadas como vacina de subunidade contra leptospirose.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Obter os insertos correspondentes aos genes que codificam as flagelinas (LIC11531, LIC11532, LIC11889, LIC11890 e LIC12947). O gene que codifica a porção LigAC já foi clonado em vetor de expressão por nossa equipe.
- b. Clonar os insertos no vetor de expressão (pAE) de *Escherichia coli*;
- c. Induzir a expressão das proteínas recombinantes;
- d. Purificar as proteínas recombinantes utilizando cromatografia de afinidade a metal;
- e. Avaliar a capacidade de ligação das proteínas de flagelo de leptospira recombinantes ao TLR5 utilizando células Hek293 transfectadas com o plasmídeo que codifica o TLR5 humano, através da quantificação da produção de IL-8 por ELISA;
- f. Analisar a expressão de IL-6 mediada por flagelinas recombinantes de leptospira em camundongos BALB/c
- g. Analisar a expressão de citocinas (Th1/Th2) mediadas por flagelinas recombinantes de leptospira em cultura celular de macrófagos de C57BL/6
- h. Avaliar o potencial adjuvante das flagelinas de leptospira na indução de resposta imunoprotetora das proteínas LigAC recombinante em hamsters.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS PURIFICADAS

3.1.1 Obtenção e purificação da flagelinas nativa FliCi de *Salmonella enterica* sorovar Thyphimurium

A obtenção da flagelina FliCi foi realizada segundo protocolo descrito em Braga et al. (2008) a partir da estirpe de *Salmonella enterica* sorovar Thyphimurium SL3261, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira (Departamento de Microbiologia, ICB-USP). Uma colônia isolada foi inoculada em 50 mL de meio LB suplementado com 100 µg/mL de canamicina e a cultura foi incubada a 37 °C com agitação de 80 rpm durante 16 horas. As células foram coletadas por centrifugação a 6.000x g por 15 minutos, e ressuspensas em 2 mL de PBS. A suspensão bacteriana foi agitada em vórtex em quatro ciclos de 2 minutos com intervalos de 1 minuto no gelo. Posteriormente, para obtenção da fração contendo a flagelinas, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 8.000x g por 15 minutos a 4 °C e o sedimento celular descartado. O sobrenadante foi coletado e precipitado com quatro volumes de acetona gelada por 16 horas a -20 °C. O material foi centrifugado a 13.000x g por 15 minutos a 4 °C e o precipitado foi ressuspendido em 0,5 mL de PBS. A fração contendo flagelinas purificada foi submetida a aquecimento a 65 °C por 30 minutos para promover a despolimerização do filamento flagelar.

3.1.2 Clonagem, expressão e purificação de flagelinas recombinantes de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni

O vetor pGEM-T (*Promega*) foi utilizado para subclonar os produtos de PCR e dessa maneira otimizar as reações de digestão com as enzimas específicas da clonagem. O vetor pAE foi desenvolvido para a expressão de proteínas heterólogas em fusão com seis resíduos de histidina na extremidade amino-terminal, o que possibilita a purificação da proteína recombinante através de colunas de afinidade a metal. Este vetor possui a origem de replicação de *E.coli*, promotor do fago T7, sítio de ligação ao ribossomo (RBS), códon ATG

de iniciação, sequência codificante para seis histidinas, sítio de múltipla clonagem e gene de resistência a ampicilina (RAMOS et al., 2004a). A expressão de proteínas recombinantes só ocorre na presença da T7 RNA polimerase. Para isto, foi utilizada a linhagem *E.coli* BL21-C43 que possuem o gene da T7 RNA polimerase sob o controle do promotor *LacUV5*, induzível por isopropil-tiogalactosídeo (IPTG).

As regiões dos genes LIC11531, LIC11532, LIC11889, LIC11890 e LIC12947 que codificam as sequências maduras (sem peptídeo sinal) de flagelinas de *L. interrogans* sorovar Copenhageni foram clonadas no vetor de expressão pAE. O número LIC representa a nomenclatura dos genes empregada no genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (<http://bioinfo03.ibi.unicamp.br/leptospira/>). As flagelinas foram nomeadas como FlaB1 (LIC11531), FlaB2 (LIC11532), FlaB3 (LIC11889), FlaB4 (LIC11890) e FlaB5 (LIC12947).

A clonagem do gene LIC10465 correspondente à região carboxi-terminal da proteína LigAC de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, também foi clonado no vetor pAE por nosso grupo (CASTIBLANCO et al., 2012).

Os oligonucleotídeos utilizados nas clonagens e os números de acesso no GenBank das sequências estão descritos no quadro 1.

Quadro 1 - Oligonucleotídeos usados nas clonagens e acesso no GenBank.

Nomenclatura do Genoma*	GenBank	Oligonucleotídeos
LIC11531	YP_001490	F: <u>CTCGAG</u> ATTATCAACCATAATATC R: <u>AAGCTTTT</u> ACTTCAGCAACTGTAG
LIC11532	YP_001491	F: <u>CTCGAG</u> ACAATGATCATCAATC R: <u>AAGCTTTT</u> AACCAAATCTGTGCGC
LIC11889	YP_001838	F: <u>CTCGAG</u> ATTATCAATCACAACC R: <u>CCATGGTT</u> AGATCTGCTGC
LIC11890	YP_001839	F: <u>CTCGAG</u> ATCATTAATCACAAC R: <u>AAGCTTTT</u> ATCTAAGAAGCTGCAG
LIC12947	YP_002861	F: GG <u>CTCGAG</u> AATCAAAAACTC R: <u>GCCATGGT</u> TAAATATATATTGAC
LIC10465	YP_000449	F: <u>CTCGAG</u> CTTACCGTTTCCAACACAAAC R: <u>CCATGGTT</u> TATGGCTCCGTTTTAATAGAG

*LIC: *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni - Fiocruz L1-130.

Primeiramente, os fragmentos foram amplificados por PCR, isolados do gel de agarose (SAMBROOK et al., 1989) e purificados utilizando-se o *kit* PureLink – gel extraction, conforme instruções do fabricante (Invitrogen). Os produtos de PCR purificados foram clonados no vetor pGEM-T (Promega).

As misturas de ligação dos produtos de PCR e pGEM-T foram usadas na transformação da linhagem *E.coli* DH5 α por CaCl₂ (SAMBROOK et al., 1989). As colônias recombinantes foram selecionadas em meio contendo ampicilina. Posteriormente, para confirmar a presença dos insertos, foram feitas preparações plasmidiais utilizando *Kit* PureLink – Plasmid miniprep (Invitrogen). O DNA obtido foi digerido com enzimas de restrição apropriadas e analisado em géis de agarose. Os clones positivos foram sequenciados pelo método da terminação da cadeia (SANGER et al., 1977), utilizando sequenciador automático 3100 Genetic Analyzer da Applied Biosystems (Hitachi) e os oligonucleotídeos específicos M13 *forward* e *reverse*.

Os insertos clonados no pGEM-T foram digeridos com as enzimas de restrição específicas para cada gene. Os fragmentos de interesse foram isolados do gel de agarose (SAMBROOK et al., 1989), purificados utilizando-se o *kit* PureLink – gel extraction (Invitrogen) e subclonados no vetor pAE, previamente digerido com as mesmas enzimas.

O produto de ligação dos fragmentos correspondentes aos genes e o pAE digeridos foram usadas na transformação da linhagem *E.coli* DH5 α por CaCl₂ (SAMBROOK et al., 1989). As colônias recombinantes foram selecionadas em meio contendo ampicilina. Para

verificar a presença de inserto, foram feitas preparações plasmidiais das colônias obtidas da transformação utilizando-se o *kit* PureLink – Plasmid miniprep (Invitrogen). O DNA obtido foi digerido com enzimas de restrição apropriadas e analisado em géis de agarose. Os clones positivos foram sequenciados utilizando-se os oligonucleotídeos sintéticos T7 *forward* e pAE *reverse*.

Bactérias *E. coli* BL21-C43 competentes foram obtidas segundo o protocolo descrito em Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). Para expressar as proteínas recombinantes, bactérias competentes foram transformadas com as construções pAE-LIC11531, pAE-LIC11532, pAE-LIC11889, pAE-LIC11890, pAE-LIC12947 e pAE-LIC10465. Colônias isoladas foram inoculadas em meio LB-amp e a expressão da proteína recombinante foi induzida com 1 mM IPTG.

Para purificar as proteínas recombinantes colônias isoladas foram inoculadas em 20 mL de meio LB suplementado com ampicilina (LB-amp) e incubadas a 37 °C sob agitação, durante 16 horas. Posteriormente os 20 mL de cultura foram transferidos para 400 mL de meio LB-amp até $DO_{600nm} = 0,8-1,0$. Neste momento, retirou-se 1 mL de cultura bacteriana (controle não induzido) e ao volume restante, adicionou-se 1 mM de IPTG mantendo a incubação por mais 3 horas a 37 °C sob agitação. As células foram coletadas por centrifugação (2.057x g por 15 minutos a 4 °C), e o sedimento bacteriano foi armazenado a -20 °C até o momento do uso.

Posteriormente, o sedimento bacteriano foi ressuspenso em 5 volumes (p/v) de tampão PBS acrescido de 1 mM PMSF (*Phenylmethylsulfonyl Fluoride*) e lisado através da passagem pelo *French Pressure Cell Press* (SLM Aminco). A suspensão resultante da lise foi centrifugada a 12.857x g por 15 minutos, a 4 °C. O sobrenadante (fração solúvel) foi coletado, mantido a 4 °C até o momento da purificação e uma amostra analisada foi em gel SDS-PAGE.

As proteínas recombinantes foram purificadas a partir da fração insolúvel utilizando cromatografia de afinidade a metal (*Fast Flow Chelating Sepharose™*, GE Healthcare). Para tanto, o sedimento de corpúsculos de inclusão foi ressuspenso em 10 volumes (p/v) de Tampão A, (PBS, uréia 8 M, pH 7,4 e 5 mM imidazol). Foi mantido a temperatura ambiente por 2 horas com agitação e posteriormente, o solubilizado foi adsorvido (fluxo 1 mL/min) à coluna de afinidade a metal, previamente carregada com cinco volumes de 100 mM NiSO₄ e equilibrada com 3 volumes de Tampão A, com de 5 mM imidazol. Para eliminação das proteínas contaminantes, a resina foi lavada com 10 volumes de Tampão A e concentrações crescentes de imidazol (5 mM, 40 mM e 60 mM). As proteínas recombinantes foram eluídas

com 10 volumes de tampão A e 1 M imidazol. As proteínas purificadas foram dialisadas contra tampão PBS e concentrações decrescentes de Uréia (8 M a zero), pH 7,4. Frações de todas as etapas da purificação foram coletadas e analisadas em gel SDS-PAGE com 15% acrilamida. As eletroforeses foram feitas segundo protocolos descritos por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989).

3.2 CULTIVO, OBTENÇÃO, ANÁLISE DA CONSERVAÇÃO, EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO CELULAR DE FLAGELINAS DE LEPTOSPIRA

3.2.1 Cultivo e manutenção de culturas de *Leptospira*

As culturas de *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130, *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe 10A, *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagie, *L. interrogans* sorovar Canicola, *L. interrogans* sorovar Pomona estirpe 13A, *L. interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm, *L. interrogans* sorovar Hardjo, *L. biflexa* sorovar Patoc, *L. noguchii* sorovar Panamá, *L. borgpetersenni* sorovar Javanica, *L. borgpetersenni* sorovar Tarassovi, *L. santarosai* sorovar Shermani, *L. kirsheneri* sorovar Cynopteri foram fornecidas pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (USP).

A virulência das bactérias *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe Fiocruz L1-130 e *Leptospira interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm foi mantida através da passagem em hamsters experimentalmente infectados, segundo protocolo descrito em Faine et al. (1999). Animais recém-desmamados foram inoculados intraperitonealmente com 500 µl (10^8 células/mL) de cultura de *L. interrogans*. Os animais foram monitorados diariamente para acompanhamento de sintomas clínicos de leptospirose como perda de peso, anorexia e mobilidade. Após a morte dos animais, que ocorreu entre 5-10 dias, as bactérias foram recuperadas a partir do macerado do fígado ou rim e cultivadas em meio EMJH modificado ou meio semi-sólido de *Fletcher* (*Difco*TM *Laboratories*) por uma passagem *in vitro*.

As estirpes bacterianas foram cultivadas em meio EMJH completo (*Difco*TM *Laboratories*) composto por EMJH base (0,23%) enriquecido com 10% albumina bovina, 1,25% Tween 80, vários sais minerais e vitaminas, cuja composição completa encontra-se

descrita em Haake (2006). As culturas foram mantidas a uma temperatura de 29 °C sem agitação durante cinco dias (segunda passagem *in vitro*). O crescimento bacteriano foi monitorado em microscópio de campo escuro e a contagem celular foi realizada em câmara de *Petroff-Hausser*.

3.2.2 Cultura e obtenção do extrato total de *Leptospira*

Para a preparação dos extratos proteicos, 40 mL de uma cultura de *Leptospira* foram centrifugados a temperatura ambiente, por 30 minutos a 5.400 x g e o sedimento bacteriano foi ressuscitado em 40 mL de meio EMJH completo. A cultura foi dividida em 2 tubos contendo 20 mL cada, um tubo foi mantido a 29 °C e outro tubo de cultura mantido a 37°C durante cinco horas. Após este período as culturas foram centrifugadas a temperatura ambiente, por 30 minutos a 5.400 x g e o sedimento bacteriano foi lavado uma vez com PBS. O sedimento lavado foi ressuscitado em 250 µl de PBS e tampão de aplicação SDS-PAGE com β-mercaptoetanol, as amostras foram fervidas por 10 minutos a 96°C e aplicadas em gel 15% poliacrilamida.

3.2.3 Cultura e obtenção de proteínas secretadas de *Leptospira*

As leptospiras foram cultivadas em meio EMJH completo, alíquotas de 20 mL das duas estirpes de leptospira, estas foram transferidas para um Erlenmeyer contendo 180 ml de meio de cultivo, na proporção de 1:10 entre cultura e meio, para obtenção de 200 mL de cultura bacteriana, até atingirem $1-2,5 \times 10^8$ células/ml contadas em câmara de *Petroff-Hausser* em microscópio de campo escuro. As culturas foram centrifugadas a 5.5000 x g, 20 °C, por 25 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento bacteriano ressuscitado cuidadosamente em solução PBS estéril, o procedimento foi realizado três vezes.

Posteriormente, o sedimento bacteriano foi ressuscitado em um volume de 20 ml de solução de PBS estéril e mantido durante 5 horas à 37 °C para secreção das proteínas, com agitação suave e manual a cada uma hora. Após este período as amostras foram centrifugadas a 9.000 x g, 4 °C, por 30 minutos, filtradas (0,22 µm) para remoção das células residuais, dialisadas (membrana de diálise 3.5 kDa) contra PBS 100X diluído e liofilizadas (PIASSI-RICARDI, 2013).

3.2.4 Ensaio de localização celular de flagelinas de *Leptospira* com Triton X-114

Para a avaliação da localização celular das flagelinas expressas em *Leptospira* foi utilizado o protocolo de extração com o detergente Triton X-114 (TX-114). As frações de lisado total, de sedimentos insolúveis (membrana interna e proteínas citoplasmáticas), fração aquosa (periplasma), fração solúvel ao Triton x-114 (membrana externa) foram obtidas.

Neste método, 100 mL de uma cultura de *Leptospira interrogans* sorovar kennewicki estirpe Pomona Fromm foram centrifugados a 10.000 x g por 15 minutos a 20 °C. O sedimento bacteriano foi lavado em PBS acrescido de 5 mM MgCl₂ e centrifugado novamente. O sedimento bacteriano lavado foi ressuspensionado em 1 mL de solução contendo 1% Triton X-114, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), e 1 mM EDTA, e a amostra foi mantida sob leve agitação por uma hora a 4 °C.

Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 15.000 x g por 10 minutos a 4 °C para a remoção do material insolúvel. E, ao sobrenadante foi adicionado 20 mM CaCl₂ e as fases foram separadas por aquecimento a 37° C, seguido de centrifugação a 2.000 x g por 10 minutos. As fases detergente e aquosa foram precipitadas com 10 volumes de acetona gelada e os precipitados protéicos foram recuperados por centrifugação a 12.600 x g por 30 minutos a 4° C, seguido de secagem a vácuo (HAAKE et al. 2000).

As amostras foram solubilizadas em tampão de aplicação SDS-PAGE com β-mercaptoetanol, fervidas por 3 minutos a 96°C, aplicadas em gel 12% poliacrilamida e transferidas para uma membrana de nitrocelulose para análise por *western blotting* contra soros policlonais hiperimunes anti-flagelinas produzidos em camundongos BALB/c.

3.2.5 Estudo da expressão e conservação das flagelinas de *Leptospira*

Com o objetivo de confirmar a presença das flagelinas recombinantes codificadas pelos genes LIC11531, LIC11532, LIC11889, LIC11890 e LIC12947, nas diferentes *Leptospira spp* (patogênicas) e na espécie saprófita *L. biflexa*, extratos totais de diferentes sorovares foram submetidos à eletroforese SDS-PAGE 15% poliacrilamida e transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema úmido.

Os sítios inespecíficos foram bloqueados, incubando-se a membrana com 10% leite desnatado liofilizado (Molico[®]) em PBS-T (PBS com 0,05 % Tween-20) por uma noite a 4°C.

Posteriormente, a membrana foi lavada três vezes de 10 em 10 minutos com PBS-T para retirar o excesso de solução de bloqueio. A reação com o primeiro anticorpo foi realizada com soro policlonal produzido em camundongo, contra cada flagelina recombinante (diluição 1:500) por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação lenta, em seguida, a membrana foi lavada três vezes com PBS-T. A reação com o segundo anticorpo foi feita com IgG anti-camundongo conjugado com peroxidase (diluição 1:5.000) por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação lenta, em seguida, a membrana foi lavada três vezes com PBS-T. A detecção foi realizada através da utilização do kit ECL. A membrana foi exposta a um filme de Raio-X e em seguida o filme foi revelado.

3.3 IMUNIZAÇÃO, DESAFIO, OBTENÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL E AVALIAÇÃO DE RESPOSTA HUMORAL EM MODELO ANIMAL

3.3.1 Ensaio piloto de imunoproteção em hamsters

Para a realização do ensaio de imunoproteção em modelo animal, fez-se necessário o cultivo e a manutenção da virulência da *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe Fiocruz L1-130 através da passagem em hamsters experimentalmente infectados segundo protocolo descrito em Faine et al. (1999), para tanto, este estirpe foi cultivada em meio EMJH modificado (ALVES et al., 1996) ou em meio EMJH completo (*Difco™ Laboratories*) (HAAKE, 2006).

Para o isolamento de leptospiros, a partir do macerado dos rins de animais infectados utilizou-se meio semissólido de *Fletcher* (*Difco™ Laboratories*). A cultura foi mantida a uma temperatura de 29 °C sem agitação. O crescimento bacteriano foi monitorado em microscópio de campo escuro e a contagem celular foi realizada em câmara de *Petroff-Hausser*.

Animais recém-desmamados foram inoculados intraperitonealmente com 500 µl (10^8 células/mL) de cultura de *L. interrogans*. Os animais foram monitorados diariamente para acompanhamento de sintomas clínicos de leptospirose como perda de peso, anorexia e mobilidade. Após a morte dos animais, que ocorreu entre 5-10 dias, as bactérias foram recuperadas a partir do macerado do fígado ou rim e cultivadas em meio EMJH modificado ou meio semissólido de *Fletcher* (*Difco™ Laboratories*) por uma passagem.

Os ensaios de imunização e desafio foram realizados no Biotério do Laboratório de Zoonoses Bacterianas coordenado pelo Prof. Dr. Sílvio Arruda Vasconcellos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

Grupos de 10 hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos recém-desmamados, com 4-5 semanas de idade e 80-100 g, foram imunizados subcutaneamente com LigAC recombinante (50 µg). As preparações continham 5 µg de flagelina e/ou hidróxido de alumínio (5 µg de Al(OH₃) para cada 1 µg de proteína total na mistura), por dose. Como controles negativos, animais foram imunizados com PBS acrescido de flagelina ou hidróxido de alumínio, nas mesmas quantidades usadas nos grupos experimentais. Como controles positivos, animais foram imunizados com bacterina. Como controle do inóculo, um grupo de animais não foi imunizado. Todas as preparações continham PBS como diluente. Foram realizadas duas imunizações com intervalo de 15 dias. O quadro 2 mostra um resumo de todos os grupos utilizados no ensaio piloto.

Quadro 2 - Preparação das doses para o ensaio piloto de imunoproteção.

Grupos	Composição por dose
01- Controle do inóculo*	-
02- PBS + FliCi	5 µg de Flagelina FliCi
03- PBS + Al(OH ₃)	875 µg de Al(OH ₃)
04- Bacterina + FliCi	10 ⁸ células + 5 µg de Flagelina FliCi
05- Bacterina + Al(OH ₃)	10 ⁸ células + 875 µg de Al(OH ₃)
06- LigAC+ FliCi	50 µg de LigAC + 5 µg de Flagelina FliCi
07- LigAC + Al(OH ₃)	50 µg de LigAC + 250 µg de Al(OH ₃)

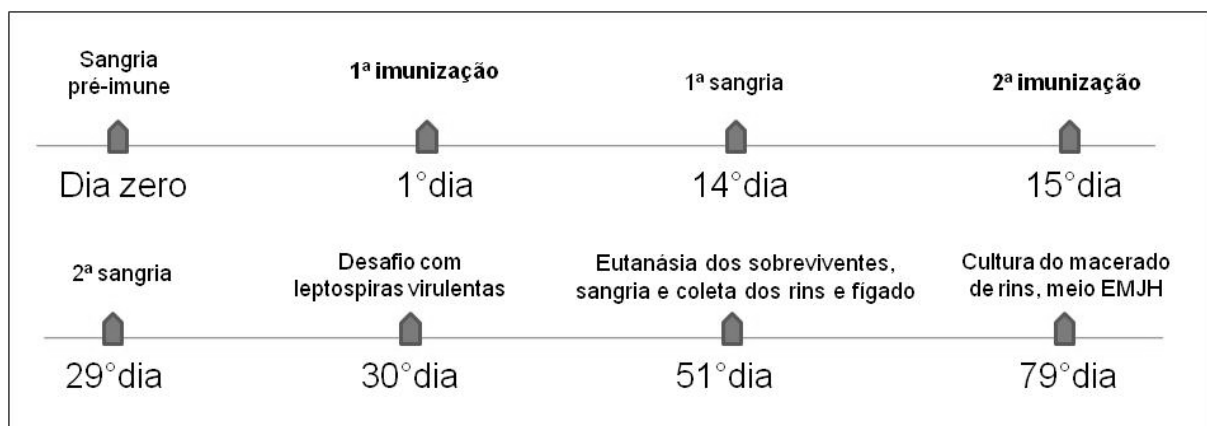
*Grupo não imunizado

A preparação da bacterina foi realizada segundo protocolo descrito por Silva et al. (2007). Para tanto, a estirpe *L. interrogans* sorovar Copenhageni (Fiocruz L1-130) foi cultivada em meio EMJH modificado a 29 °C sem agitação, por sete dias. Posteriormente, a cultura foi centrifugada, por 30 minutos, a 11.000x g e o sedimento bacteriano foi lavado duas vezes com PBS. O sedimento bacteriano lavado foi ressuscitado em PBS e inativado, por 20 minutos, a 56 °C e armazenado a -20 °C até o momento do uso. Os hamsters foram imunizados com a dose de 10⁸ leptospiras inativadas em 200 µl.

Os animais imunizados foram desafiados intraperitonealmente, quinze dias após a última imunização, com 200 µl (1000 vezes a DL₅₀) de uma cultura de *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe Fiocruz L1-130 virulenta. Os hamsters foram monitorados diariamente para acompanhamento de sinais clínicos de leptospirose, como hemorragia externa, desidratação, anorexia e diminuição da atividade. Os animais que sobreviveram após o 21º dia do desafio foram sacrificados e necropsiados, os rins foram coletados para a avaliação do estado de portador renal, através da detecção de *Leptospira* em meio semissólido. Para tanto, um dos rins, de cada animal sobrevivente foi macerado assepticamente em 1 mL de solução tamponada de Sörensen. A suspensão resultante foi diluída 100x e 1000x em solução tamponada de Sörensen. Cem microlitros de cada diluição foram semeados em 5 mL de meio semissólido de *Fletcher*, dois tubos por diluição e mantidos a 29 °C, por 42 dias, com observações semanais para a formação do anel de crescimento sub-superficial de leptospiras no meio (Figura 10).

Para a determinação da DL₅₀ foram utilizados hamsters da mesma idade e sexo, machos entre 8 e 9 semanas. Uma cultura de *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe Fiocruz L1-130 virulenta, na primeira passagem, foi diluída em PBS (10¹ a 10⁶ células/dose) e injetada em 5 animais para cada diluição. Um grupo controle foi injetado somente com PBS. Foi utilizada via intraperitoneal com volume de 200 µl. Os animais foram monitorados por 21 dias e a DL₅₀ foi calculada através do método de Reed-Muench (1938). O esquema do ensaio de imunização e desafio realizado está representado na figura 2.

Figura 2 - Representação esquemática do plano de ensaio de imunoproteção em hamsters.



Fonte: Monaris (2015)

3.3.2 Avaliação do potencial adjuvante das flagelinas de leptospira na indução da resposta imunoprotetora contra a leptospirose em hamsters

Os ensaios de imunização e desafio foram realizados no Biotério do Laboratório de Zoonoses Bacterianas coordenado pelo Prof. Dr. Sílvio Arruda Vasconcellos da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

Grupos de 10 hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos recém-desmamados, com 4-5 semanas de idade e 80-100 g, foram imunizados subcutaneamente com as flagelinas de leptospiras recombinantes, coadministradas com a proteína LigAC recombinante como modelo de antígeno (50 µg). As preparações continham 5 µg de flagelina e/ou hidróxido de alumínio (5 µg de Al(OH₃) para cada 1 µg de proteína total na mistura), por dose (Al(OH₃, fornecido pela produção do Instituto Butantan). Como controles negativos, animais foram imunizados com PBS acrescido de flagelina ou hidróxido de alumínio, nas mesmas quantidades usadas nos grupos experimentais. Como controle positivo, animais foram imunizados com vacina comercial e como controle do inóculo, um grupo de animais não foi imunizado. Todas as preparações continham PBS como diluente. Foram realizadas duas imunizações com intervalo de 15 dias, conforme esquema de imunização e desafio representado na figura 2, o quadro 3 demonstra os grupos utilizados.

Os animais imunizados foram desafiados intraperitonealmente, quinze dias após a última imunização, com 200 µl de uma cultura de *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe Fiocruz L1-130 virulenta. Os hamsters foram monitorados diariamente para acompanhamento de sinais clínicos de leptospirose, como hemorragia externa, desidratação, anorexia e diminuição da atividade. Os animais que sobreviveram após o 21º dia do desafio foram sacrificados e necropsiados, os rins foram coletados para a avaliação do estado de portador renal, através da detecção de *Leptospira* em meio semissólido. Para tanto, um dos rins, de cada animal sobrevivente foi macerado assepticamente em 1 mL de solução tamponada de Sörensen. A suspensão resultante foi diluída 100x e 1000x em solução tamponada de Sörensen. Cem microlitros de cada diluição foram semeados em 5 mL de meio semissólido de *Fletcher*, dois tubos por diluição e mantidos a 29 °C, por 42 dias, com observações semanais para a formação do anel de crescimento sub-superficial de leptospiras no meio.

Quadro 3- Preparação das doses para o ensaio de imunoproteção.

Grupos	Composição por dose
01- Controle do inóculo ^a	-
02- PBS + Al(OH ₃)	875 µg de Al(OH ₃)
03- LigAC + Al(OH ₃)	50 µg de LigAC + 250 µg de Al(OH ₃)
04- PBS + <i>Pool</i> de flagelinas ^b	5 µg de cada flagelina
05- Vacina Comercial	-
06- FlaB1 + LigAC	5 µg de flagelina + 50 µg de LigAC
07- FlaB2 + LigAC	5 µg de flagelina + 50 µg de LigAC
08- FlaB3 + LigAC	5 µg de flagelina + 50 µg de LigAC
09- FlaB4 + LigAC	5 µg de flagelina + 50 µg de LigAC
10- FlaB5 + LigAC	5 µg de flagelina + 50 µg de LigAC

a - Grupo não imunizado

b - Flagelinas FlaB1 + FlaB2 + FlaB3 + FlaB4 + FlaB5.

3.3.3 Avaliação da Resposta Humoral em hamsters

A titulação dos soros foi feita por *ELISA*. Para a adsorção dos antígenos, placas de micro-diluição de 96 poços de poliestireno de alta afinidade (Corning Brasil, São Paulo, Brasil) foram expostas a uma solução de 5 µg/mL de cada flagelina recombinante purificada em tampão 0,1 M carbonato/bicarbonato pH 9,6 e incubadas, por 16 horas, a 4 °C. Os sítios inespecíficos foram bloqueados incubando-se a placa com solução de bloqueio (10% leite desnatado liofilizado em PBS com 0,05% Tween-20), por 1 hora, a 37 °C. Posteriormente, a placa foi lavada, mais uma vez, com PBS-T (PBS com 0,05% Tween-20) para retirar o excesso de solução de bloqueio.

Após as lavagens, foram realizadas diluições seriadas dos soros dos animais em tampão de diluição (1% leite desnatado liofilizado em PBS com 0,01% Tween-20). A placa foi incubada, por 16 horas, a 4 °C. Posteriormente, os poços foram lavados três vezes com PBS-T e a reação com o segundo anticorpo anti-hamster, produzido em coelho (*Sigma*) diluído 1:5000 em tampão de diluição, foi realizada, por 1 hora, a 37 °C. Em seguida, a placa foi lavada três vezes com PBS-T. O terceiro anticorpo, anti-coelho conjugado com peroxidase

(Sigma) foi então, adicionado na diluição 1:5000 em tampão de diluição e a placa foi incubada, por 1 hora, a 37 °C, seguido de lavagens como descrito anteriormente.

O reconhecimento foi realizado através de reação, com o substrato orto-fenilenodiamina (OPD), em tampão citrato-fosfato na presença de traços de H₂O₂, por 10 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 2 N de H₂SO₄. A intensidade da reação foi determinada pela leitura da DO em 492 nm (*Multiskan EX*, Thermo Fisher Scientific, Rockford, EUA). Para a obtenção da curva padrão foi utilizada a imunoglobulina IgG de hamster (*Hamster IgG Isotype Control* - SouthernBiotech, Birmingham, Al, EUA).

3.3.4 Obtenção de anticorpo policlonal em camundongos BALB/c

Para a produção de soros hiperimunes, grupos de cinco camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados subcutaneamente com 10 µg de proteínas recombinantes purificadas (FlaB1, FlaB2, FlaB3, FlaB4 e FlaB5), com quatro reforços em intervalos de 15 dias. Os animais foram sangrados via plexo retro-orbital antes das imunizações (sangria pré-imune), foi realizado uma sangria intermediária, após 2 imunizações (1^a sangria) e uma sangria final, após 4 imunizações (2^a sangria). O sangue coletado foi mantido a 37 °C por 30 minutos e a 4°C por 1 hora. Posteriormente, o coágulo foi deslocado da parede do tubo e centrifugado a 800 g por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante coletado foi armazenado a -20 °C.

A titulação dos soros foi feita por ELISA. Para a adsorção dos antígenos, placas de micro-diluição de 96 poços de poliestireno foram expostas a uma solução de 5 µg/mL de flagelina recombinante purificada em tampão 0,1 M carbonato/bicarbonato pH 9,6 e incubadas por 16 horas a 4 °C. Os sítios inespecíficos foram bloqueados (10% leite desnatado liofilizado em PBS com 0,05% Tween-20) por 1 hora a 37 °C. Posteriormente, a placa foi lavada uma vez com PBS-T (PBS com 0,05% Tween-20) para retirar o excesso de solução de bloqueio.

Após as lavagens, foram realizadas diluições seriadas dos soros (a partir de 1:20) em tampão de diluição (1% leite desnatado liofilizado em PBS-T) e em seguida incubada por 1 hora a 37 °C. Lavou-se 3 vezes com PBS-T e incubou-se com anti-camundongo conjugado com peroxidase (Sigma) 1:5000 em PBS-T por 1 hora a 37 °C. A placa foi lavada 3 vezes e a

revelação foi realizada através da adição de OPD por 10 minutos na presença de traços de H₂O₂. Em seguida, a reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ e realizada a leitura em espectrofotômetro a 492 nm (Labsystems iEMS).

3.4 ANÁLISE E DETECÇÃO DE FLAGELINAS DE LEPTOSPIRA ATRAVÉS DE WESTERN BLOTTING

3.4.1 Análise da expressão e detecção de flagelinas recombinantes de leptospira com Anti-His

As proteínas recombinantes purificadas, foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE 15% e transferidas por sistema úmido (*BioRad Laboratories*, Hercules, EUA) para uma membrana de nitrocelulose (*Hybond-ECL - GE Healthcare*), durante uma hora a 0,65 mA/cm de gel, imersos em tampão de transferência. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S e digitalizada para monitorização da transferência (BURNETTE, 1981).

Os sítios inespecíficos foram bloqueados incubando-se a membrana com solução de bloqueio (10% leite desnatado liofilizado em PBS com 0,05% Tween-20) por 16 horas, a 4 °C. Posteriormente, a membrana foi lavada três vezes com PBS-T (PBS com 0,05% Tween-20) sob agitação por 15 minutos .

Foi feita uma incubação com a diluição de 1:3000 do anticorpo monoclonal Anti-His (*GE Helthcare*), seguido de incubação com o segundo anticorpo anti-camundongo conjugado com peroxidase (*Sigma*) na diluição 1:5000. Os soros e anticorpos foram diluídos em PBS-T e as incubações foram realizadas por 1 hora a temperatura ambiente com agitação. Depois de cada incubação, a membrana foi lavada três vezes com PBS-T, por 15 minutos, à temperatura ambiente com agitação. A detecção foi realizada através da utilização da solução substrato ECL (*GE Healthcare*). A revelação foi feita em câmara escura, a membrana foi exposta a filme de raios-X (*Hyperfilm - GE Healthcare*) por dois segundos, o filme foi revelado e digitalizado.

3.4.2 Detecção de flagelinas recombinantes de leptospira com soros hiperimunes de hamsters imunizados

Os títulos dos soros obtidos foram utilizados como referência na diluição dos mesmos nos experimentos de *Western-Blotting*. As flagelinas recombinantes e a LigAC purificadas foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE (15%) e transferidas por sistema úmido (*BioRad Laboratories*, Hercules, EUA) para uma membrana de nitrocelulose (*Hybond-ECL - GE Healthcare*), durante uma hora a 0,65 mA/cm de gel, imersos em tampão de transferência (48 mM Tris-Base, 39 mM Glicina, 20% etanol e 0,037% SDS, pH 8,3). Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S (0,1% Ponceau em 10% ácido acético), O excesso de corante foi lavado com água destilada e digitalizada para monitorização da transferência (BURNETTE, 1981).

Os sítios inespecíficos foram bloqueados incubando-se a membrana com solução de bloqueio (10% leite desnatado liofilizado em PBS com 0,05% Tween-20) sob agitação, por 16 horas a 4 °C. Posteriormente, a membrana foi lavada três vezes com PBS-T (PBS com 0,05% Tween-20) sob agitação por 15 minutos.

A reação com o primeiro anticorpo foi feita com soro dos animais imunizados diluído 1:500, seguido de incubação com o segundo anticorpo anti-hamster, produzido em coelho (*Sigma*) diluído 1:5000 e por último, com terceiro anticorpo, anti-coelho conjugado com peroxidase (*Sigma*) na diluição 1:5000. Os soros e anticorpos foram diluídos em PBS-T e as incubações foram realizadas por 1 hora a temperatura ambiente com agitação. Depois de cada incubação, a membrana foi lavada três vezes com PBS-T, por 15 minutos, à temperatura ambiente com agitação. A detecção foi realizada através da utilização de “kit” ECL (*GE Healthcare*). A membrana foi exposta a filme de raios-X (*Hyperfilm - GE Healthcare*) por tempos curtos (30 segundos a 2 minutos), o filme foi revelado e digitalizado.

3.4.3 Análise da expressão das flagelinas nativas de leptospira em contanto com macrófagos, linhagem J774

A expressão *in vitro* das flagelinas nativas de leptospira foi avaliada em células de mamíferos, macrófagos da linhagem J774, infectadas com *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 (FAZOLO, 2014; KASSENE *et al.* 2014). As células foram cultivadas

em meio MEM (Gibco – Life Technologies, Grand Island, NY, USA), suplementado com 10% SFB (Gibco – Life Technologies) a 37 °C, 5% CO₂.

O ensaio de infecção da cultura celular por leptospiras foi realizada após a formação de uma camada confluyente de macrófagos, visivelmente saudáveis. As células foram ressuspendidas em meio de cultura, coletadas e centrifugadas a 250 x g por 5 minutos a 4 °C. Em seguida, foram contadas e semeadas em placas de 24 poços (Corning), adicionando 1 mL de meio contendo 2×10^5 células em cada poço e incubadas por 24 horas a 37 °C, 5% de CO₂. Após 24 horas de incubação, a cultura celular foi infectada com 2×10^8 (MOI de 100) de *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130 (2ª passagem) suspensas em meio MEM enriquecido com 10% de SFB e incubadas em diferentes tempos, isto é, por 1, 2, 4, 6, 24 e 36 horas. Como controle negativo foi utilizado uma cultura de macrófagos não infectada com leptospira.

Posterior às incubações, o meio de cultura foi retirado e as células foram recuperadas e lisadas com solução de PBS + 0,05% Desoxicolato de Sódio gelado. Os lisados foram centrifugados a 1.500 x g por 1 minuto a 4 °C para remover os fragmentos celulares, em seguida o sobrenadante foi centrifugado novamente a 17.200 x g por 15 minutos a 4 °C para sedimentar e recuperar as leptospiras, este sedimento bacteriano foi ressuspendido em 100µL de PBS 1x, lisado por pressão. A expressão de flagelina *in vitro* foi analisada por *western blotting*, utilizando 3µg do lisado bacteriano e soro policlonal 1:500 contra cada flagelinas recombinante, produzido em camundongos.

Em paralelo foi cultivada *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130 em meio EMJH a 29 °C para compararmos as diferentes condições de expressão.

3.5 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE FLAGELINAS DE LEPTOSPIRA ATRAVÉS DA ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE CITOCINAS

3.5.1 Análise da expressão *in vitro* de IL-8 mediada por flagelinas recombinantes de leptospira através de ensaios de ativação do TLR5 em cultura celular, linhagem Hek293

A avaliação da capacidade de ligação das flagelinas de leptospira ao receptor *Toll-like 5* (TLR-5) foi realizada através da quantificação de IL-8, utilizando células de rim de

embrião humano Hek293, transfectadas com um plasmídeo que codifica o TLR-5 humano (pUNO-hTLR5 - Invitrogen) originando a linhagem celular Hek293/TLR5 (HULEATT et al., 2008).

As linhagens celulares Hek293 e Hek293/TRL5 foram mantidas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% SFB (soro fetal bovino), na presença ou ausência do antibiótico blasticidina (1µg/mL), respectivamente.

Para realização de cada ensaio, essas células foram cultivadas em placas de 96 poços, na densidade 5×10^4 células por poço (100 µl de meio) por 12 horas, a 37 °C e 5% CO₂. Posteriormente, as proteínas de flagelo recombinantes foram adicionadas em concentrações decrescentes a partir de 10 µg/mL e as culturas serão mantidas nas mesmas condições anteriores por 5 horas. Como controle positivo da ativação do TRL5, foi utilizado a flagelina FliCi de *Salmonella enterica* sorovar Thyphimurium purificada. Após o período de ativação, os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados e a expressão de IL-8 foi avaliada por ELISA utilizando-se o Kit Human IL-8 ELISA Set (BD OptEIA™, San Diego, CA).

3.5.2 Análise da expressão *in vivo* de IL-6 mediada por flagelinas recombinantes de leptospira em camundongos BALB/c

Com o objetivo de investigar se as propriedades imunoestimuladoras das flagelinas recombinantes de leptospira foram preservadas, foi realizada a caracterização da atividade biológica das flagelinas *in vivo*, através da análise da expressão da citocina IL-6, que é produzida principalmente por macrófagos em resposta à ligação de PAMPS aos TLRs. A expressão de IL-6 foi detectada no soro de camundongos BALB/c (três animais por grupo) inoculados (i.p.) com apenas uma dose de 5 µg de cada flagelina.

Como controle positivo, 5 µg de flagelina FliCi de *Salmonella enterica* purificada foram utilizados e para os grupos experimentais foram utilizadas as flagelinas de leptospira (FlaB1, FlaB2, FlaB3, FlaB4, FlaB5). As proteínas foram diluídas em 200 µl de PBS por dose. Amostras de soro destes animais foram coletadas em diferentes tempos (30 minutos, 2 horas, 4 horas, 6 horas e 24 horas) e armazenado -20 °C. A concentração de IL-6 foi determinada utilizando o kit ELISA IL-6/ mouse (BD Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante.

Para garantir a veracidade de nossos resultados, foram utilizados outros controles. As flagelinas recombinantes não foram incubadas com polimixina antes da inoculação, pois a quantificação dos níveis de endotoxinas realizada com o Kit *Limulus amoebocyte lysate assay* (Lonza) mostrou níveis abaixo de 2 unidades/ μg de proteína recombinante purificada. Mesmo assim, foi incluído um controle negativo, que se constituiu da flagelina FlaB2 incubada com tripsina durante 18 horas. E, também, foi realizado o controle da contaminação por DNA, com a incubação da flagelina FlaB2 com DNase antes da inoculação nos animais e PBS.

3.5.3 Análise da expressão *in vitro* de citocinas (Th1/Th2) mediada por flagelinas recombinantes de leptospira em cultura celular de macrófagos de C57BL/6

Em colaboração com o Departamento de Microbiologia (ICB-USP), sob supervisão do Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira e a Dra Carina B. Lima, foram realizados os experimentos para detecção da expressão de citocinas (Th1/Th2) IL-2, IL-4, IL-6, $\text{INF}\gamma$, TNF, IL-17A e IL-10 com a finalidade de analisar as concentrações fisiologicamente relevantes (pg/mL) de proteínas específicas de citocinas nos sobrenadantes de cultura de macrófagos. Para tanto, foram utilizados dois camundongos da linhagem C57BL/6 com 6-8 semanas de idade e obtidos os macrófagos destes animais através da inoculação (i.p) de amido de batata, denominado “*starch*” 1% (Sigma). A suspensão celular foi obtida após 4 dias, as células foram removidas por lavagem com 5 mL de PBS estéril e gelado na cavidade peritoneal dos animais. A suspensão de células foi centrifugada a 250 g por 5 minutos, ressuspensa com 5 mL de meio RPMI e suplementado com 3 % de SBF (Sigma). Foi realizada a contagem das células em câmara de Neubauer e plaqueadas em uma placa de 96 poços (Costar), na concentração de 1×10^6 células por poço, em meio RPMI + 3 % de SBF durante uma noite a 37°C , 5 % de CO_2 .

As flagelinas recombinantes purificadas de leptospira e a FliCi de *S. Typhimurium* foram inseridas em vesículas lipídicas catiônicas 34 DOTAP (Roche), de acordo com as instruções do fabricante. Para tanto, foi utilizada a seguinte proporção, $1\mu\text{g}$ de flagelina para cada $5\mu\text{l}$ de DOTAP, homogeneizado gentilmente por 1 minuto, seguida de uma incubação por 15 minutos a temperatura ambiente para promover a formação espontânea de complexos estáveis. Após a incubação, adicionou-se meio de cultura a esses complexos de Flagelina/DOTAP, posteriormente adicionou-se essa mistura às culturas de macrófagos para que desta forma pudessemos encaminhar as flagelinas ao citosol celular (LIMA, 2014).

A seguir, os macrófagos aderentes foram estimuladas com flagelinas de leptospira recombinantes purificada e como controle positivo foi utilizado a flagelina *FliCi* de *S. Typhimurium*. Foram usadas duas formas de apresentação, em sua forma livre (FlaB1, FlaB2, FlaB3, FlaB4, FlaB5 e *FliCi*) ou inserida em vesículas lipídicas (FlaB1+ DOTAP, FlaB2+ DOTAP, FlaB3+ DOTAP, FlaB4+ DOTAP, FlaB5+ DOTAP e *FliCi*+ DOTAP). Como controle negativo, os macrófagos foram incubadas apenas com meio de cultura DMEM e com a vesícula DOTAP vazia.

A expressão das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, INF γ , TNF, IL-17A e IL-10 nos sobrenadantes das culturas foram determinadas por citometria de fluxo, utilizando o kit “BD CBA (Cytometric Bead Array) mouse Th1/Th2/Th17” (*BD Biosciences*), de acordo com as instruções do fabricante. As dosagens foram realizadas em duplicata.

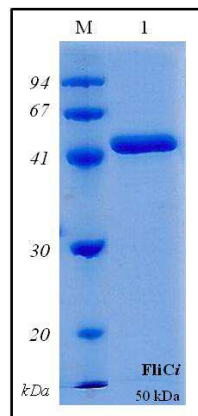
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS PURIFICADAS

4.1.1 Obtenção da flagelina FliCi de *Salmonella enterica* sorovar Thyphimurium

A flagelina FliCi de *S. enterica* sorovar Thyphimurium foi obtida a partir do sobrenadante de cultura precipitado com acetona. A fração de flagelina foi submetida a aquecimento a 65 °C, por 30 minutos, para promover a despolimerização do filamento flagelar. Na figura 3, é possível observar uma banda única (50 kDa) correspondente ao monômero de flagelina em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%. A concentração da amostra foi determinada através de método colorimétrico (Bradford) e a estimativa do rendimento da flagelina FliCi purificada foi de 20 mg/L.

Figura 3 - Proteína purificada do flagelo de *S. enterica* sorovar Thyphimurium.



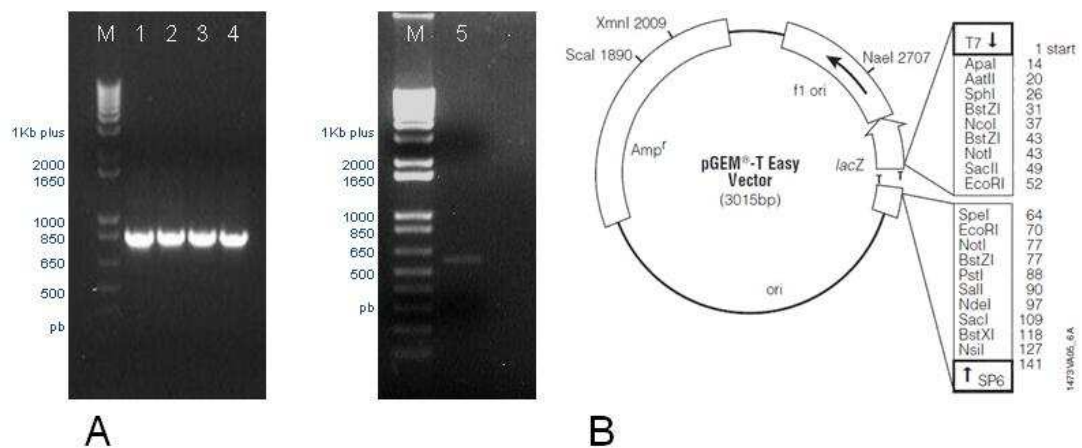
Fonte: Monaris (2015)

Legenda: Gel SDS-PAGE 15%. M) Marcador de peso molecular LMW (BioRad); 1) Flagelina FliCi.

4.1.2 Clonagem de flagelinas recombinantes de *Leptospira*

As sequências maduras (sem peptídeo sinal) dos genes que codificam as flagelinas foram amplificadas por PCR a partir do DNA genômico da *L. interrogans* sorovar Copenhageni, utilizando-se os oligonucleotídeos do quadro 1. Cada fragmento amplificado foi purificado e clonado no vetor pGEMT. A figura 4 mostra que os tamanhos dos fragmentos amplificados por PCR estão de acordo com o esperado: 858 pb para LIC11531 (poço 1), 867 pb para LIC11532 (poço 2), 861 pb para LIC11889 (poço 3), 855 pb para LIC11890 (poço 4) e 567 pb para LIC12947 (poço 5).

Figura 4 - Análise dos produtos obtidos por PCR a partir do DNA genômico de *Leptospira interrogans*.



Fonte: Monaris (2015)

Legenda: A) Gel de agarose 1%; M) Padrão de Peso Molecular 1 Kb plus ladder; 1) LIC11531; 2) LIC11532; 3) LIC11889; 4) LIC11890; 5) LIC12947. B) Esquema do vetor pGEM-T easy utilizado para clonagem dos fragmentos obtidos

A seleção dos clones positivos de cada clonagem em vetor pGEMT foi feita em placas contendo IPTG, X-Gal e ampicilina e também através de análise de restrição. Todas as construções positivas foram sequenciadas completamente, utilizando-se os oligonucleotídeos M13 (*forward*) e o M13 (*reverse*) (dados não mostrados). A análise dos cromatogramas mostrou que as sequências dos genes são as mesmas obtidas no projeto genoma (NASCIMENTO et al., 2004a).

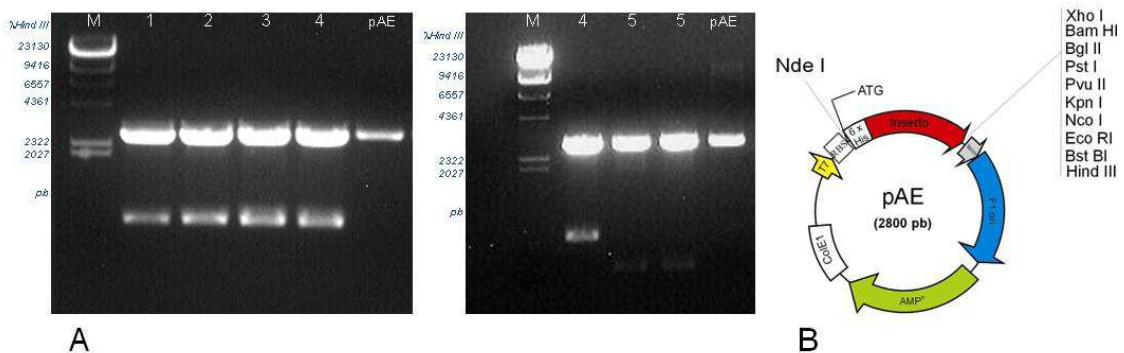
Cada construção em pGEMT foi usada na preparação do inserto, através da digestão com as enzimas apropriadas (Quadro 4). Os fragmentos foram purificados e subclonados no

vetor pAE, previamente digerido com as mesmas enzimas, originando as construções pAE-LIC11531, pAE-LIC11532, pAE-LIC11889, pAE-LIC11890 e pAE-LIC12947 que possibilitam a expressão das proteínas de interesse. As colônias recombinantes foram selecionadas em meio contendo ampicilina e através de PCR de colônia utilizando os oligonucleotídeos de clonagem (dados não mostrados). As reações de digestão dos clones positivos originaram fragmentos de tamanhos esperados, conforme demonstra a figura 05. Estes dados foram confirmados por sequenciamento, utilizando-se os oligonucleotídeos T7 (*forward*) e o pAE (*reverse*). A análise dos cromatogramas mostrou que nas construções em pAE, tanto a orientação (5' → 3') quanto o quadro de leitura estavam corretos (dados não mostrados).

Quadro 4 - Tamanho dos insertos obtidos através da dupla digestão das construções em pGEMT correspondentes às clonagens dos genes das flagelinas de *Leptospira interrogans*.

Gene clonado no pGEMT	Tamanho dos insertos	
LIC11531	<i>XhoI/HindIII</i>	858 pb
LIC11532	<i>XhoI/HindIII</i>	867 pb
LIC11889	<i>XhoI/NcoI</i>	861 pb
LIC11890	<i>XhoI/HindIII</i>	855 pb
LIC12947	<i>XhoI/NcoI</i>	564 pb

Figura 5 – Análise dos produtos obtidos por PCR para construção do plasmídeo pAE.



Fonte: Monaris (2015)

Legenda: A) Digestão com as enzimas *Xho I* e *Hind III* das construções pAE-LIC11531, pAE-LIC11532 e pAE-LIC11890; Digestão com as enzimas *Xho I* e *Nco I* das construções pAE-LIC11889 e pAE-LIC12947; M) Padrão de peso molecular 1 Kb plus ladder; 1) pAE-LIC11531 digerido; 2) pAE-LIC11532 digerido; 3) pAE-LIC11889 digerido; 4) pAE-LIC11890 digerido; 5) pAE-LIC12947 digerido; pAE) vetor pAE-vazio não digerido. Gel de agarose 1%. B) Esquema do vetor de expressão pAE utilizado.

4.1.3 Expressão e purificação das flagelinas recombinantes de *Leptospira*

Para a expressão das proteínas recombinantes, bactérias da linhagem *E.coli* BL21-C43 competente foram transformadas com os seguintes plasmídeos: pAE-LIC11531, pAE-LIC11532, pAE-LIC11889, pAE-LIC11890, pAE-LIC12947 e pAE-LigAC. Colônias isoladas, obtidas destas transformações, foram inoculadas em meio LB-ampicilina, a cultura foi incubada a 37°C sob agitação até OD_{600nm} = 0,8-1,0. Neste momento, 1 mM IPTG foi adicionado, mantendo a incubação por mais 3 horas. As massas moleculares das proteínas recombinantes foram calculadas a partir da composição de aminoácidos, utilizando programa disponível em servidor público (<http://web.expasy.org/protparam/>). Os valores obtidos e as características de cada proteína recombinante foram descritos no quadro 5.

A análise de cada amostra do lisado bacteriano induzido, em gel de poliácridamida SDS-PAGE 15%, mostrou que houve a expressão das proteínas recombinantes com o tamanho esperado (Figura 6, A, B, C, D, E e F, poço 2).

Quadro 5 - Características das flagelinas nativas e recombinantes de *L. interrogans* sorovar Copenhageni codificadas pelos genes LIC11531, LIC11532, LIC11889, LIC11890, LIC12947 e características da proteína de membrana LigAC, codificada pelo gene LIC10465.

Proteína	Gene	Proteína nativa			Proteína recombinante		
		kDa ¹	aa ²	pI ³	kDa ¹	aa ²	pI ³
FlaB1	LIC 11531	31,47	282	7,04	32,53	290	6,88
FlaB2	LIC 11532	31,55	285	6,86	32,61	293	6,77
FlaB3	LIC 11889	31,25	283	8,71	32,32	291	7,07
FlaB4	LIC 11890	31,30	281	6,54	32,37	289	6,60
FlaB5	LIC 12947	24,28	207	9,17	22,53	192	7,94
LigAC	LIC 10465	62,22	594	8,34	63,43	603	7,82

¹ kilo Dalton; ² número de aminoácidos; ³ ponto isoelétrico.

Para se determinar a solubilidade das proteínas expressas em pAE foram realizadas preparações do sobrenadante e precipitado de uma alíquota de 1ml de uma cultura induzida com 1 mM de IPTG, após lise e centrifugação. O precipitado foi ressuscitado em 100 µl de tampão de aplicação em gel SDS-PAGE 1X e em 80 µl do sobrenadante foram adicionados

20 µl do mesmo tampão de aplicação, concentrado 5X (volume final 100 µl). No gel, foram aplicados 20 µl de cada amostra. A figura 6 mostra que todas as proteínas recombinantes foram expressas majoritariamente na forma insolúvel, pois as bandas são visualizadas nas frações dos sedimentos correspondentes aos corpúsculos de inclusão (poços 4). Também são observadas as amostras do lisado total induzido (poços 2) e do sobrenadante (poços 3). Outros protocolos de expressão e várias estirpes bacterianas foram testados para tentar a expressão na fração solúvel (dados não mostrados). Entretanto, em nenhum caso houve mudança no padrão da expressão das proteínas recombinantes.

O acúmulo de proteínas em forma de corpúsculo de inclusão é uma característica do sistema de expressão de *E. coli*. Os fatores que contribuem para a formação de corpúsculo de inclusão não são completamente entendidos. Evidências indiretas sugerem que as altas concentrações de proteínas produzidas por promotores fortes levariam a um acúmulo de cadeias polipeptídicas nascentes com conformação não nativa, favorecendo a agregação e, portanto, a formação de corpúsculo (MARSTON, 1986).

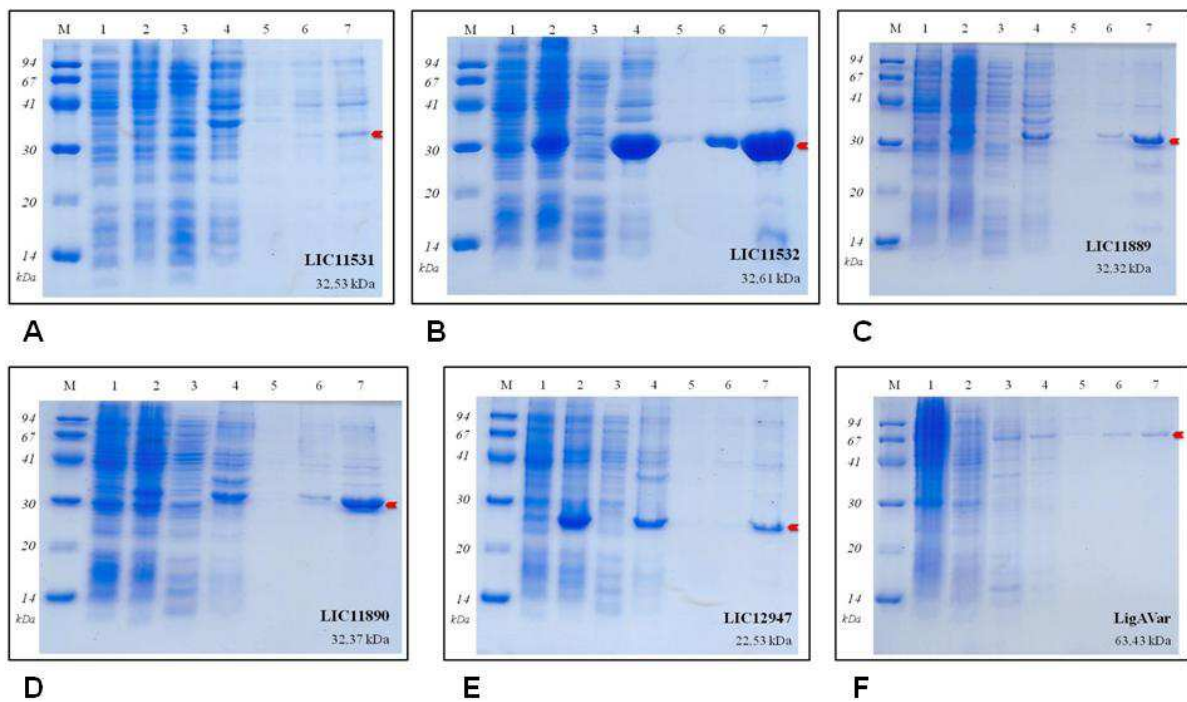
Portanto, a maioria das proteínas presentes nestes corpúsculos está desnaturada implicando na solubilização da proteína recombinante e recuperação da sua atividade. Este procedimento pode envolver a utilização de agentes desnaturantes, como a uréia. Conseqüentemente podem resultar em problemas com a correta renaturação da proteína e a recuperação de suas atividades biológicas (MARSTON, 1986; WETZEL, 1994). Por estas razões, vários protocolos de purificação das proteínas recombinantes foram testados e um protocolo adequado foi estabelecido.

Para tanto, os sedimentos de corpúsculos de inclusão obtidos de 400 mL de cultura induzida foram solubilizados em PBS contendo uréia 8M. O solubilizado (50 mL) foi lentamente adsorvido à resina de afinidade a metal previamente carregada com níquel. Para eliminação das proteínas contaminantes, a resina foi lavada sucessivamente utilizando-se o mesmo tampão contendo concentrações crescentes de imidazol (5, 40 e 60 mM). Posteriormente, as frações da eluição com 1M imidazol foram reunidas e dialisadas contra tampão PBS em etapas onde as concentrações de imidazol e uréia foram diminuídas lentamente. Na figura 6, é possível observar que o protocolo de purificação foi eficiente para a obtenção das proteínas recombinantes codificadas pelos genes LIC11532, LIC11889, LIC11890, LIC12947 e LigAC (Figura 6, poço 7). Durante as lavagens da coluna, com baixas concentrações de imidazol, não houve grande perda de proteínas. Na figura 7, podemos observar bandas majoritárias das flagelinas recombinantes purificadas, em cada poço foi

aplicado 2 µg de cada proteína em gel SDS-PAGE 15%. As concentrações das proteínas foram determinadas através de método colorimétrico (Bradford) e a estimativa do rendimento das flagelinas recombinantes de leptospira foi de 5 mg/L.

Outros protocolos de purificação foram testados, utilizando-se 20mM Tris-HCl pH 8,0 e 0,5M NaCl no lugar de PBS, diluição do solubilizado antes da adsorção à resina, diferentes linhagens bacterinas (dados não mostrados), entretanto, não melhoraram a eficiência da purificação. Mesmo com baixo rendimento, o melhor resultado foi obtido com o protocolo descrito.

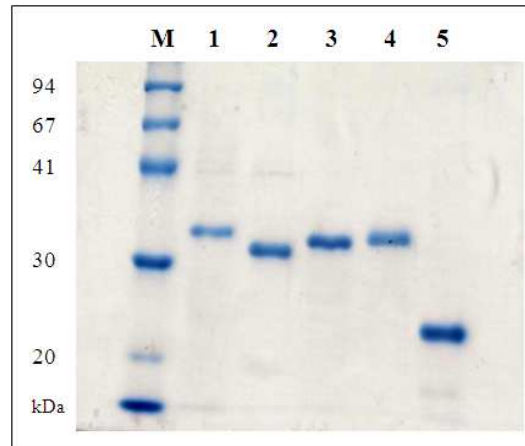
Figura 1 - Análise de expressão, solubilidade e purificação das flagelinas recombinantes de *L. interrogans* sorovar Copenhageni



Fonte: Monaris (2015)

Legenda: Gel SDS-PAGE (15%). A) LIC11531; B) LIC11532; C) LIC11889; D) LIC11890; E) LIC12947 F) LigAC. M) padrão de peso molecular LMW; 1) lisado total não induzido; 2) lisado total induzido por IPTG; 3) sobrenadante após lise por pressão e centrifugação; 4) sedimento de corpúsculo de inclusão após lise por pressão e centrifugação; 5) lavagem da resina com tampão PBS com 40 mM imidazol; 6) lavagem da resina com tampão PBS com 60 mM imidazol; 7) eluição da proteína com PBS e 1 M imidazol. As setas vermelhas indicam a banda das proteínas recombinantes purificadas com peso molecular correspondente.

Figura 7 - Flagelinas recombinantes de *L. interrogans* sorovar Copenhageni purificadas.



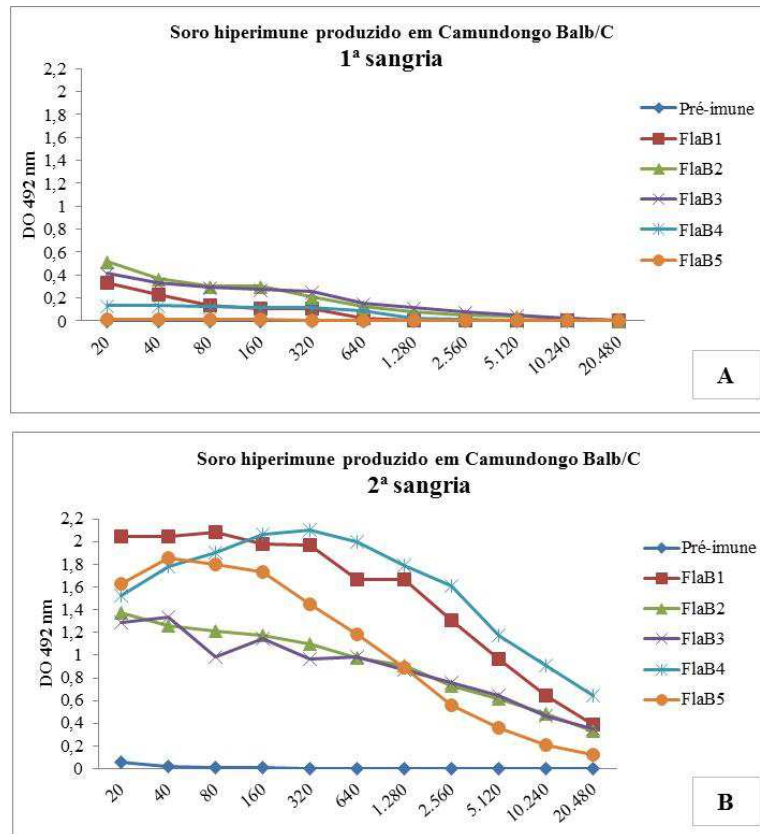
Fonte: Monaris (2015)

Legenda: Gel SDS-PAGE (15%) M) padrão de peso molecular LMW; 1) FlaB1; 2) FlaB2; 3) FlaB3; 4) FlaB4; 5) FlaB5.

4.1.4 Obtenção de anticorpo policlonal em camundongos

Para a produção de soros hiperimunes, grupos de cinco camundongos BALB/c fêmeas (20 a 23 g) foram imunizados subcutaneamente com 10 µg de proteínas recombinantes purificadas (FlaB1, FlaB2, FlaB3, FlaB4, FlaB5) na presença de hidróxido de alumínio como adjuvante, com dois reforços em intervalos de 15 dias. A figura 8 mostra as curvas de titulação dos soros obtidos da 1ª sangria, com baixos títulos de anticorpos contra as flagelinas recombinantes, quando comparado com as curvas de titulação dos soros obtidos da 2ª sangria, com altos títulos de anticorpos contra as flagelinas recombinantes. As curvas de titulação dos soros pré-imune (controle negativo) são próximas à zero, demonstrando a especificidade do soro policlonal. Estes soros foram utilizados para a confirmação da localização celular das flagelinas no espaço periplasmático e na avaliação da presença das flagelinas em diferentes sorovares *Leptospira* spp. por *Western blotting*.

Figura 08: Obtenção de anticorpo policlonal em camundongos BALB/c



Fonte: Monaris (2015)

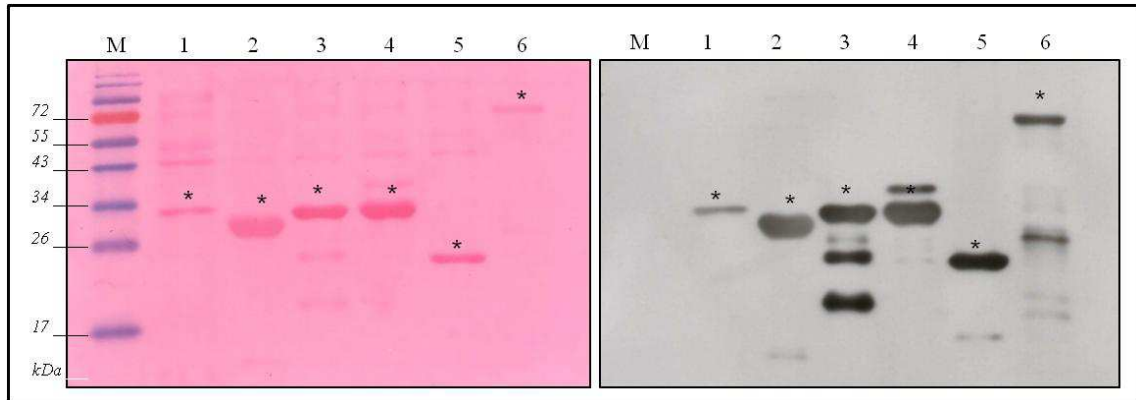
Legenda: Anticorpo policlonal em camundongos, determinados por ELISA. Placas sensibilizadas com proteínas recombinantes purificadas (FlaB1, FlaB2, FlaB3, FlaB4, FlaB5) primeira (A) e segunda sangria (B).

4.1.5 Análise da expressão e detecção de flagelinas recombinantes de leptospira com Anti-His

Para determinar a presença da cauda de histidina presente nas flagelinas recombinantes, as proteínas foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE 15% e transferidas para membranas de nitrocelulose em sistema úmido. A reação com o primeiro anticorpo (anti-His - *GE Healthcare*) foi realizada com uma diluição de 1:3000 por uma hora, seguido de incubação com o segundo anticorpo (IgG anti-mouse - *Sigma*) conjugado com peroxidase (diluição 1:5000), por uma hora. A detecção foi realizada através da utilização de kit ECL (*GE Healthcare*). As membranas foram expostas a filmes (*Hyperfilm ECL*) por tempo curto e o filme revelado. A figura 9 mostra que o anticorpo anti-His foi capaz de reconhecer especificamente as bandas correspondentes às flagelinas recombinantes. É possível observar

que houve degradação das proteínas recombinantes FlaB3, FlaB4 e LigAC, provavelmente devido à presença de proteases durante o processo de purificação.

Figura 9 - Análise das flagelinas recombinantes e LigAC recombinante de *L. interrogans* sorovar Copenhageni por Anti-His.



Fonte: Monaris (2015)

Legenda: À esquerda, membrana de nitrocelulose corada com Ponceau S e à direita filme de raio X. As proteínas com seu peso molecular correspondente estão indicadas por um asterisco. M) Marcador de peso molecular Rainbow; 1) FlaB1; 2) FlaB2; 3) FlaB3; 4) FlaB4; 5) FlaB5 6) LigAC.

4.2 LOCALIZAÇÃO CELULAR E CONSERVAÇÃO EM DIFERENTES ESPÉCIES E SOROVARES

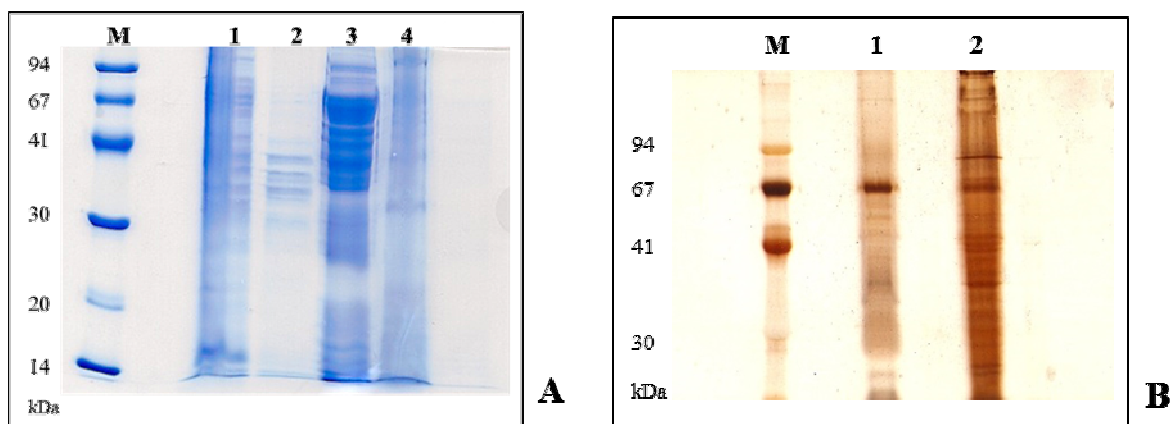
4.2.1 Localização celular das flagelinas de *Leptospira interrogans*

As leptospiros possuem dois flagelos localizados no espaço periplasmático, os filamentos destes flagelos são formados por duas classes de proteínas, as proteínas FlaA que formam a bainha e as proteínas FlaB, chamadas de flagelinas, que constituem o núcleo do filamento. O sequenciamento do genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni identificou cinco genes que codificam possíveis flagelinas [LIC11531 (FlaB1), LIC11532 (FlaB2), LIC11889 (FlaB3), LIC11890 (FlaB4) e LIC12947 (FlaB5)]. Análises *in silico* utilizando o programa PSORT disponível no servidor público (<http://psort.nibb.ac.jp/>) confirmaram que estas proteínas provavelmente estão localizadas no espaço periplasmático da *L. interrogans*. Para confirmar esta predição, experimentos de localização celular foram realizados utilizando frações de membrana externa, membrana interna e espaço periplasmático obtidas pela

extração com triton X-114. Este detergente aniônico solubiliza seletivamente proteínas de membrana externa, mas não proteínas citoplasmáticas.

A figura 10A mostra o perfil eletroforético das amostras obtidas com a extração utilizando o Triton X-114: lisado total (poço 1); fração de sedimentos insolúveis (membrana interna e proteínas citoplasmáticas - poço 2), fração aquosa (periplasma, poço 3), fração solúvel ao Triton x-114 (membrana externa, poço 4). O extrato de proteínas secretadas é observado na figura 10B.

Figura 10 – Obtenção de lisado total, frações subcelulares por extração com Triton X-114 e proteínas secretadas.



Fonte: Monaris (2015)

Legenda: A) Extração com Triton X-114: M) marcador de peso molecular LMW; 1) LT - Lisado total de *Leptospira interrogans*; 2) fração de sedimentos insolúveis (membrana interna e proteínas citoplasmáticas); 3) FA - Fração aquosa; 4) FD - fração detergente; B) M) marcador de peso molecular LMW; 1 e 2) Proteínas secretadas.

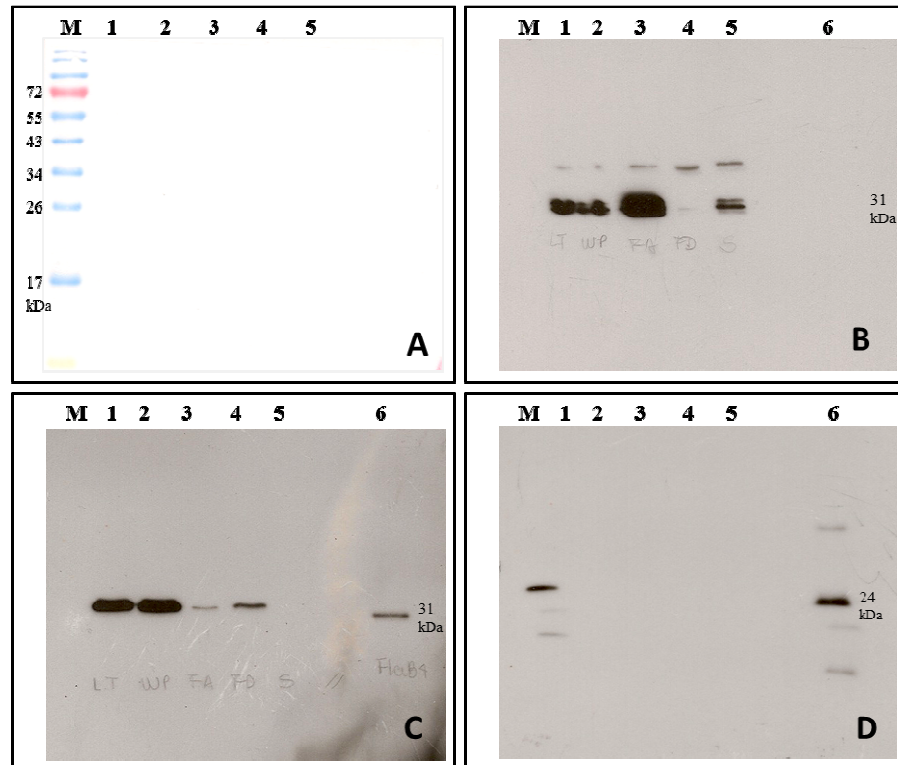
Posteriormente, as amostras foram submetidas à eletroforese e transferidas para membrana de nitrocelulose em sistema úmido. As membranas foram bloqueadas com leite desnatado liofilizado 10% em PBS-T durante a noite a 4°C. A reação com o primeiro anticorpo foi realizada com soro policlonal hiperimune de camundongos BALB/c (2º sangria), na diluição 1:500 por 1 hora em temperatura ambiente e leve agitação, em seguida foram incubadas com o segundo anticorpo IgG anti-camundongo conjugado com peroxidase diluído 1:5000, por uma hora a temperatura ambiente e leve agitação. A detecção foi realizada através da utilização de kit ECL (Amershan). A membrana foi exposta a filme de raios-X (Kodak) e o filme revelado.

Na figura 11 observamos que os soros policlonais feitos em camundongo contra as flagelinas recombinantes foram capazes de reconhecer especificamente as bandas correspondentes a estas proteínas. A figura 11-B demonstra que FlaB1 foi reconhecida no

lisado total, na fração de sedimentos insolúveis, fração aquosa e no extrato de proteínas secretadas, o soro não reconheceu o controle positivo, provavelmente a quantidade de proteína aplicada deve ser ajustada. A figura 11-C demonstra que FlaB4 foi reconhecida no lisado total, na fração de sedimentos insolúveis, fração aquosa, fração detergente e no controle positivo. E, a figura 11-D demonstra que FlaB5 não foi encontrada nos diferentes extratos, sendo reconhecida apenas no controle positivo. Estes resultados comprovam a localização das flagelinas FlaB1 e FlaB4 no espaço periplasmático (fração aquosa) da *L. interrogans*. Não foi possível a detecção das flagelinas FlaB2 e FlaB3 por este método (dados não mostrados).

A presença da proteína FlaB1 no meio extracelular obtido a partir do cultivo de espécies de leptospiros patogênicos já tinha sido observada em trabalho realizado por nosso grupo (PIASSI-RICARDI, 2013). A secreção de proteínas para o ambiente extracelular é uma característica importante de patógenos microbianos, pois as proteínas extracelulares podem mediar interações com as células do hospedeiro durante a infecção. A presença de periplasmáticas nos extratos de proteínas secretadas pode ser resultado da lise celular, mas no nosso caso, isto é pouco provável, pois foram adotados vários procedimentos para minimizar a contaminação citoplasmática, como a coleta das proteínas na fase logarítmica do cultivo e a filtração das células residuais. E, também, não foi detectada a presença de uma proteína conhecida citoplasmática (LipL31) nem por *western-blotting* nem por análise proteômica. É conhecido que algumas proteínas, que possuem função citoplasmática podem desempenhar também função extracelular e muitas vezes diferente, estas proteínas têm sido denominadas proteínas *moonlighting*. E, são capazes de desempenhar funções adicionais não relacionadas ao seu papel metabólico descrito (JEFFERY, 1999). Um exemplo é a enolase de *Streptococcus pneumoniae*, cuja função primária é catalisar a conversão de fosfoglicerato em fosfopiruvato na glicólise, podendo desempenhar funções *moonlighting* na interação patógeno-hospedeiro, pois também está localizada na superfície celular e capaz de se ligar ao plasminogênio (BERGMANN et al., 2001).

Figura 11 – Localização celular de flagelinas de leptospiros por *Western Blot*.



Fonte: Monaris (2015)

Legenda: A) Membrana de nitrocelulose. B) FlaB1; C) FlaB4; D) FlaB5; M- marcador de peso molecular *page ruler*, 1 – LT: lisado total; 2 – fração de sedimentos insolúveis; 3 – FA: fração aquosa; 4 – FD: fração detergente; 5 – PS: proteína secretada; 6 – PR: proteína recombinante.

4.2.2 Expressão e conservação das flagelinas de *Leptospira* em diferentes espécies e sorovares de *Leptospira*

Com o objetivo de confirmar a presença e distribuição das flagelinas codificadas pelos genes LIC11531, LIC11532, LIC11889, LIC11890 e LIC12947 nas diferentes espécies patogênicas de *Leptospira* (*L. noguchii* sorovar Panamá, *L. borgpetersenni* sorovar Javanica, *L. borgpetersenni* sorovar Tarassovi, *L. santarorai* sorovar Shermani, *L. kirsheneri* sorovar Cynopteri), nos diferentes sorovares patogênicos de *L. interrogans* (*L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe LI-130, *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe 10A, *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagie, *L. interrogans* sorovar Canicola, *L. interrogans* sorovar Pomona, *L. interrogans* sorovar Hardjo) e na espécie saprófita (não patogênica) *L. biflexa* sorovar Patoc, extratos totais de diferentes sorovares de *Leptospira spp* foram obtidos, submetidos à eletroforese SDS-PAGE 15% poliacrilamida e transferidos para membrana de nitrocelulose

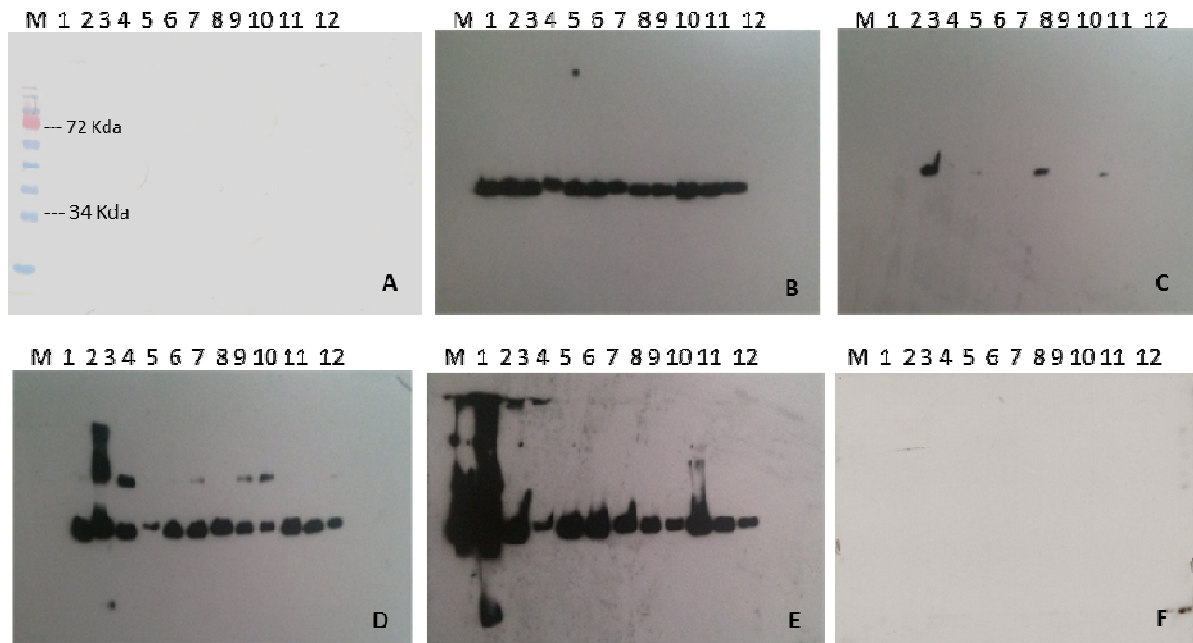
em sistema úmido. As membranas foram bloqueadas com leite desnatado liofilizado 10% em PBST durante a noite a 4°C. A reação com o primeiro anticorpo foi realizada com soro policlonal contra as flagelinas recombinante (diluição 1:500) por 1 hora, em seguida foram incubadas com o segundo anticorpo IgG anti-camundongo conjugado com peroxidase (diluição 1:5000), por 1 hora. A detecção foi realizada através da utilização de kit ECL (*Amershan*). A membrana foi exposta a filme de raios-X (*Kodak*) e o filme revelado.

A figura 12 demonstra que os soros policlonais feitos em camundongo contra as flagelinas recombinantes foram capazes de reconhecer especificamente as bandas correspondentes às proteínas nativas em extratos totais nos sorovares da *Leptospira spp.* Além disso, foi observado que as bandas correspondentes à FlaB1, FlaB2 e FlaB4 estão presentes em todos os sorovares analisados (FlaB1, Figura 12-B; FlaB3, Figura 12-D e FlaB4, Figura 12-E). Para a FlaB2 (Figura 12-C), observou-se a presença da proteína em apenas nas estirpes a *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe 12A e *L. noguchii* sorovar Panamá.

Dessa forma, os resultados apresentados mostraram que as flagelinas FlaB1, FlaB3 e FlaB4 estão presentes nos principais sorovares da *Leptospira spp.*, demonstrando que estas proteínas possam ter papel importante na bactéria, promovendo sua mobilidade e também patogenicidade e podem ser candidatos a adjuvantes vacinais.

A existência de pelo menos quatro flagelinas (FlaB1 até FlaB4) sugere que a inativação específica de uma flagelina não resultaria na diminuição da motilidade ou perda da virulência, pois esta poderia ser substituída por outra. Esta redundância na funcionalidade das flagelinas também é observada em outras espiroquetas, como a *Treponema spp.* que também contém três flagelinas diferentes (FlaB1, FlaB2 and FlaB3) (RUBY et al., 1997; FRASER et al., 1998).

Figura 12 – Expressão, conservação e detecção de flagelinas expressas em em diferentes sorovares de *Leptospira spp.*, com soro de camundongos hiperimunes por *Western Blotting*.



Fonte: Monaris (2015)

Legenda: **A)** Membrana de nitrocelulose; **B)** Soro policlonal anti-FlaB1; **C)** Soro policlonal anti-FlaB2; **D)** Soro policlonal anti-FlaB3; **E)** Soro policlonal anti-FlaB4; **F)** Soro policlonal anti-FlaB5. Soros produzidos em camundongo BALB/c. **M)** Marcador de peso molecular *Page Ruler*; **1)** *L. interrogans* sorovar *Copenhageni* estirpe *L1-130*; **2)** *L. interrogans* sorovar *Copenhageni* estirpe *10A*; **3)** *L. interrogans* sorovar *Icterohaemorrhagiae*; **4)** *L. interrogans* sorovar *Canicola*; **5)** *L. interrogans* sorovar *Pomona*; **6)** *L. interrogans* sorovar *Hardjo*; **7)** *L. biflexa* sorovar *Patoc*; **8)** *L. noguchii* sorovar *Panamá*; **9)** *L. borgpetersenii* sorovar *Javanica*; **10)** *L. borgpetersenii* sorovar *Tarassovi*; **11)** *L. santarosai* sorovar *Shermani*; **12)** *L. kirsheneri* sorovar *Cynopteri*

4.3 IMUNIZAÇÃO, DESAFIO, OBTENÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL E AVALIAÇÃO DE RESPOSTA HUMORAL EM MODELO ANIMAL

4.3.1 Ensaio piloto de imunoproteção em hamsters

Primeiramente, foi realizado um ensaio piloto para avaliar o potencial adjuvante da flagelina *FliCi* de *S. enterica* sorovar *Thyphimurium* na indução de resposta imunoprotetora em uma formulação vacinal composta pela proteína *LigAC*, proteína recombinante de *L. interrogans* sorovar *Copenhageni*, descrita pela literatura, como capaz de induzir uma proteção de 60 a 100% em hamsters imunizados. Foi realizado um ensaio de desafio com grupos de 10 hamsters imunizados subcutaneamente com as preparações vacinais, conforme descrito no quadro 02. Foram testados como adjuvantes a flagelina *FliCi* ou o hidróxido de

alumínio. Os animais dos grupos controle negativos foram imunizados com PBS acrescido de FliCi ou hidróxido de alumínio, nas mesmas quantidades usadas nos grupos experimentais. Como controles positivos, animais foram imunizados com a bacterina. As preparações vacinais contendo LigAC e bacterina foram acrescidas de FliCi ou hidróxido de alumínio. Como controle do inóculo, um grupo de animais não foi imunizado. Todas as preparações foram diluídas em PBS. Foram realizadas duas imunizações com intervalo de 15 dias.

Os animais imunizados foram desafiados, intraperitonealmente, quinze dias após a última imunização com 1000 vezes a DL_{50} de uma cultura de *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe Fiocruz L1-130 virulenta. Os hamsters foram monitorados diariamente para acompanhamento de sinais clínicos de leptospirose. Os animais que sobreviveram após o 21º dia do desafio, foram sacrificados e necropsiados. Os rins foram coletados para a detecção de *Leptospira* em meio EMJH modificado, semissólido de *Fletcher*. A determinação da DL_{50} foi feita paralelamente ao experimento de desafio.

Animais dos grupos controle negativos infectados morreram entre 6 e 10 dias após o desafio e apresentaram sintomas clínicos de leptospirose como desidratação, anorexia e diminuição da atividade. Considerando o número total de sobreviventes, o grupo controle do inóculo, PBS + $Al(OH)_3$ e PBS + FliCi apresentaram 0% de sobrevivência, enquanto os grupos imunizados com a bacterina + $Al(OH)_3$, bacterina + FliCi, LigAC + $Al(OH)_3$ LigAC + FliCi apresentaram 100% de sobrevivência (Tabela 1).

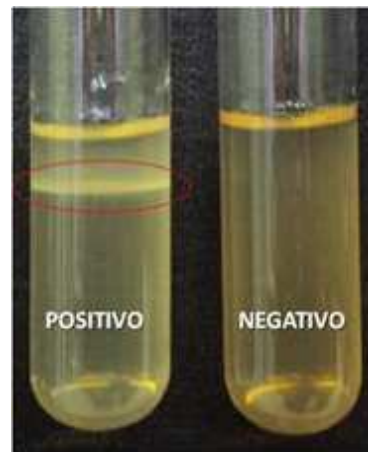
Os animais que sobreviveram após o 21º dia do desafio foram sacrificados e necropsiados, os rins foram coletados para a detecção de *Leptospira* em meio semi-sólido de *Fletcher*, as culturas foram monitoradas por 42 dias e aquelas que apresentaram crescimento visível foram consideradas positivas, como é possível observar na figura 13.

Tabela 1 - Ensaio piloto de imunoproteção em modelo animal. Proteção conferida pela imunização de hamsters desafiados com *L. interrogans* Copenhageni.

Grupos	Total de animais sobreviventes	Índice de sobrevivência	% de culturas negativas em relação aos sobreviventes
01- Controle do inóculo	0/10	0	-
02- PBS + Al(OH) ₃	0/10	0	-
03- PBS + FliCi	9/10	10 %	ND*
04- Bacterina + Al(OH) ₃	10/10	100 %	100 %
05- Bacterina + FliCi	10/10	100 %	100 %
06- LigAC + Al(OH) ₃	10/10	100 %	0 %
07- LigAC + FliCi	10/10	100 %	30 %

*ND – não determinado (contaminação do meio de cultura).

Figura 13 – Análise de ausência ou presença de colonização renal por leptospiros, através de passagem em meio de cultura.



Fonte: Monaris (2015)

Legenda: Amostra de cultivo de rim macerado de hamsters, sobreviventes ao ensaio de desafio, em meio semissólido de *Fletcher*. O círculo vermelho indica o anel de crescimento bacteriano após o 42º dia do inóculo.

4.3.2 Avaliação do potencial adjuvante das flagelinas de leptospira na indução da resposta imunoprotetora contra a leptospirose em hamsters

Durante o período, foram realizados dois experimentos de imunização e desafio utilizando grupos de dez hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos recém-desmamados, com 4-5 semanas de idade e 80-100 g, imunizados subcutaneamente com as preparações vacinais descritas no quadro 3. Todas as amostras foram diluídas em PBS e foram realizadas duas imunizações com intervalo de 15 dias.

Os animais imunizados foram desafiados intraperitonealmente, quinze dias após a última imunização, com 200 µl de uma cultura de *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe Fiocruz L1-130 virulenta. Os hamsters foram monitorados diariamente para acompanhamento de sinais clínicos de leptospirose, como hemorragia, desidratação, anorexia e diminuição da atividade. Os animais que sobreviveram após o 21º dia do desafio foram sacrificados e necropsiados, os rins foram coletados para a avaliação do estado de portador renal, através da detecção de leptospiras em meio semissólido. Para tanto, um dos rins, de cada animal sobrevivente foi macerado assepticamente em 1 mL de solução tamponada de Sørensen. A suspensão resultante foi diluída 100x e 1000x em solução tamponada de Sørensen. Cem microlitros de cada diluição foram semeados em 5 mL de meio semissólido de Fletcher, dois tubos por diluição e mantidos a 29 °C, por 42 dias, com observações semanais para a formação do anel de crescimento sub-superficial das leptospiras no meio.

No primeiro experimento de imunoproteção, os animais dos grupos controles negativos (controle do inóculo e PBS) não morreram com o desafio (dados não mostrados). O principal critério de validação do ensaio de desafio é a ocorrência de no máximo 30% de sobrevivência nestes grupos. Este problema ocorreu, provavelmente, porque os animais foram desafiados com uma cultura de leptospiras na diluição 1:1. Em experimentos anteriores utilizamos culturas sem diluição. Esta mudança no protocolo foi realizada em função do cálculo da DL50 e do número de leptospiras das culturas. Como os valores da DL50 das culturas utilizadas nos ensaios foram muito próximos (DL50 de ~100 leptospiras), foi utilizado o mesmo número de leptospiras dos experimentos anteriores (2×10^5 leptospiras). Desta maneira, houve a necessidade de diluir a cultura utilizada que estava mais concentrada, o que pode ter resultado em menor virulência. Portanto, os resultados de sobrevivência deste ensaio não foram considerados para avaliar a proteção conferida pelas preparações vacinais

testadas e um novo experimento foi realizado e será descrito a seguir. Entretanto, utilizamos os soros obtidos antes do desafio para avaliação da resposta humoral por ELISA.

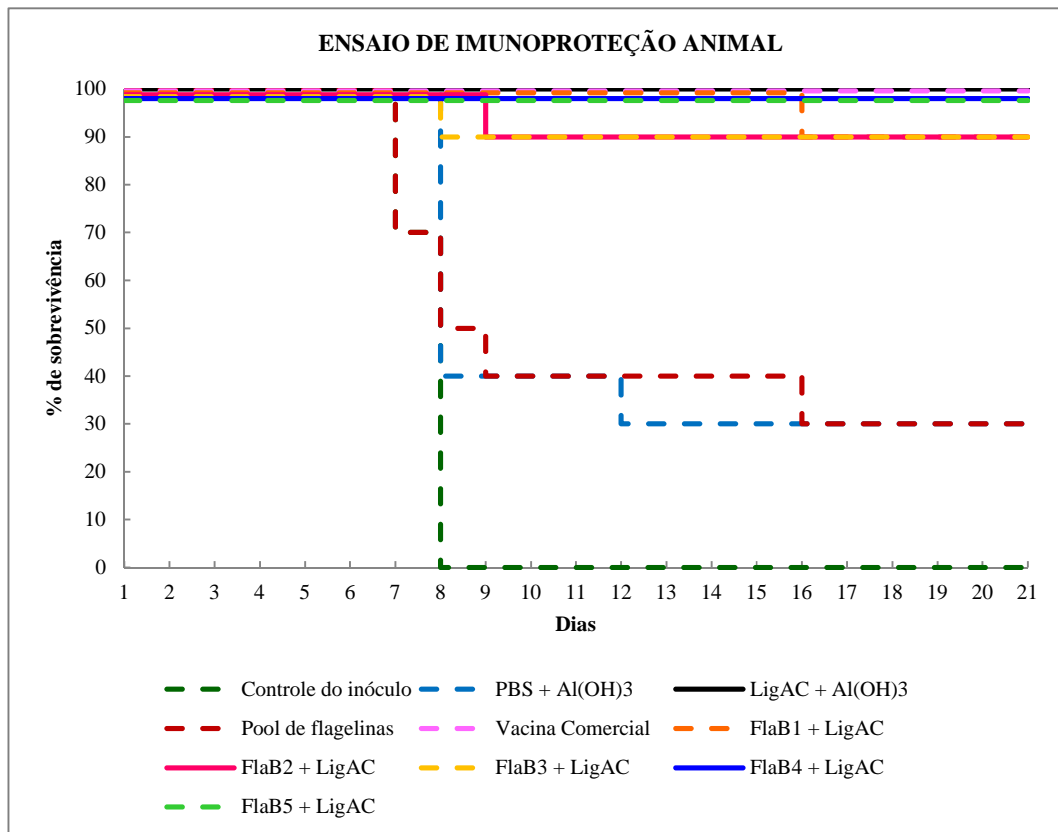
O segundo ensaio foi realizado utilizando os mesmos grupos descritos anteriormente. Neste caso, a cultura não foi diluída no desafio. Como pode ser observado na tabela 2 e figura 14, a maioria dos animais dos grupos controles negativos morreu entre 8 e 12 dias após o desafio com sintomas clínicos de leptospirose. Os animais imunizados com a vacina comercial sobreviveram ao desafio, não apresentaram sintomas e as culturas foram negativas para leptospiras. No grupo imunizado com LigAC e hidróxido de alumínio todos os animais sobreviveram, mas foram positivos quanto à cultura do macerado dos rins. Somente três animais imunizados com o *pool* das flagelinas sobreviveram ao desafio com as leptospiras, confirmando os resultados obtidos anteriormente, em que as flagelinas sozinhas não são capazes de induzir imunoproteção contra a leptospirose. A maioria dos animais imunizados com a proteína LigAC e as flagelinas como adjuvante sobreviveram ao desafio. Entretanto, não houve redução significativa na colonização renal nos grupos imunizados com LigAC e as flagelinas de leptospira quando comparado com o grupo imunizado com LigAC e hidróxido de alumínio.

Tabela 02 – Ensaio de imunoproteção em modelo animal. Proteção conferida pela imunização de hamsters desafiados com *L. interrogans* Copenhageni.

Grupos	Animais sobreviventes/total de animais	Índice de sobrevivência	Animais com culturas positivas/ total de sobreviventes (%)
01- Controle do inóculo	0/10	0%	-
02- PBS + Al(OH ₃)	3/10	30%	1/3 (33%)
03- LigAC + Al(OH ₃)	10/10*	100%	9/10 (90%)
04- <i>Pool</i> de flagelinas	3/10	30%	0/3 (0%)
05- Vacina Comercial	10/10*	100%	0/10 (0%)
06- FlaB1 + LigAC	9/10*	90%	9/9 (100%) ^{ns}
07- FlaB2 + LigAC	9/10*	90%	8/9 (88%) ^{ns}
08- FlaB3 + LigAC	9/10*	90%	8/9 (88%) ^{ns}
09- FlaB4 + LigAC	10/10*	100%	10/10 (100%) ^{ns}
10- FlaB5 + LigAC	10/10*	100%	10/10 (100%) ^{ns}

* Indica diferença estatisticamente significativa no número de animais sobreviventes dos grupos experimentais em relação aos animais dos grupos controle-negativos (controle do inóculo e PBS); ^{ns} Indica diferença estatisticamente não significativa na colonização renal dos grupos experimentais em relação ao grupo imunizado com LigAC + Al(OH)₃; (Teste exato de Fisher; $p \leq 0,005$).

Figura 14: Índice de sobrevivência dos hamsters após ensaio de imunoproteção.



Fonte: Monaris (2015)

Legenda: Porcentagem de animais sobreviventes durante 21 dias após desafio com uma cultura de *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130.

Considerando todos os resultados obtidos, nenhum grupo inoculado com as flagelinas recombinantes e LigAC apresentaram redução na colonização renal significativamente estatística, como pode ser observado na tabela 3, que mostra um resumo de todos os resultados obtidos.

Tabela 03: Resumo de todos os ensaios de imunoproteção em modelo animal realizados. Proteção conferida pela imunização de hamsters desafiados com *L. interrogans* Copenhageni.

Grupos	Animais sobreviventes / total de animais			Índice de sobrevivência total	Animais com culturas positivas / total de sobreviventes
	1ºEnsaio	2ºEnsaio	3ºEnsaio		
01- Controle do inóculo	0/5	1/5	0/10	1/20 (5%)	1/1 (100%)
02- PBS + Al(OH ₃)	2/5	1/5	3/10	6/20 (30%)	2/6 (33%)
03- LigAC + Al(OH ₃)	5/5	5/5	10/10	20/20 (100%)*	19/20 (95%)
04- Pool de flagelinas	1/5	1/5	3/10	5/20 (25%)	0/5 (0%)
05- Vacina Comercial	5/5	5/5	10/10	20/20 (100%)*	0/20 (0%)
06- FlaB1 + LigAC	5/5	5/5	9/10	19/20 (95%)*	18/19 (94%) ^{ns}
07- FlaB2 + LigAC	5/5	4/5	10/10	19/20 (95%)*	14/19 (73%) ^{ns}
08- FlaB3 + LigAC	4/5	5/5	9/10	18/20 (90%)*	14/18 (83%) ^{ns}
09- FlaB4 + LigAC	5/5	5/5	10/10	20/20 (100%)*	20/20 (100%) ^{ns}
10- FlaB5 + LigAC	5/5	5/5	10/10	20/20 (100%)*	20/20 (100%) ^{ns}

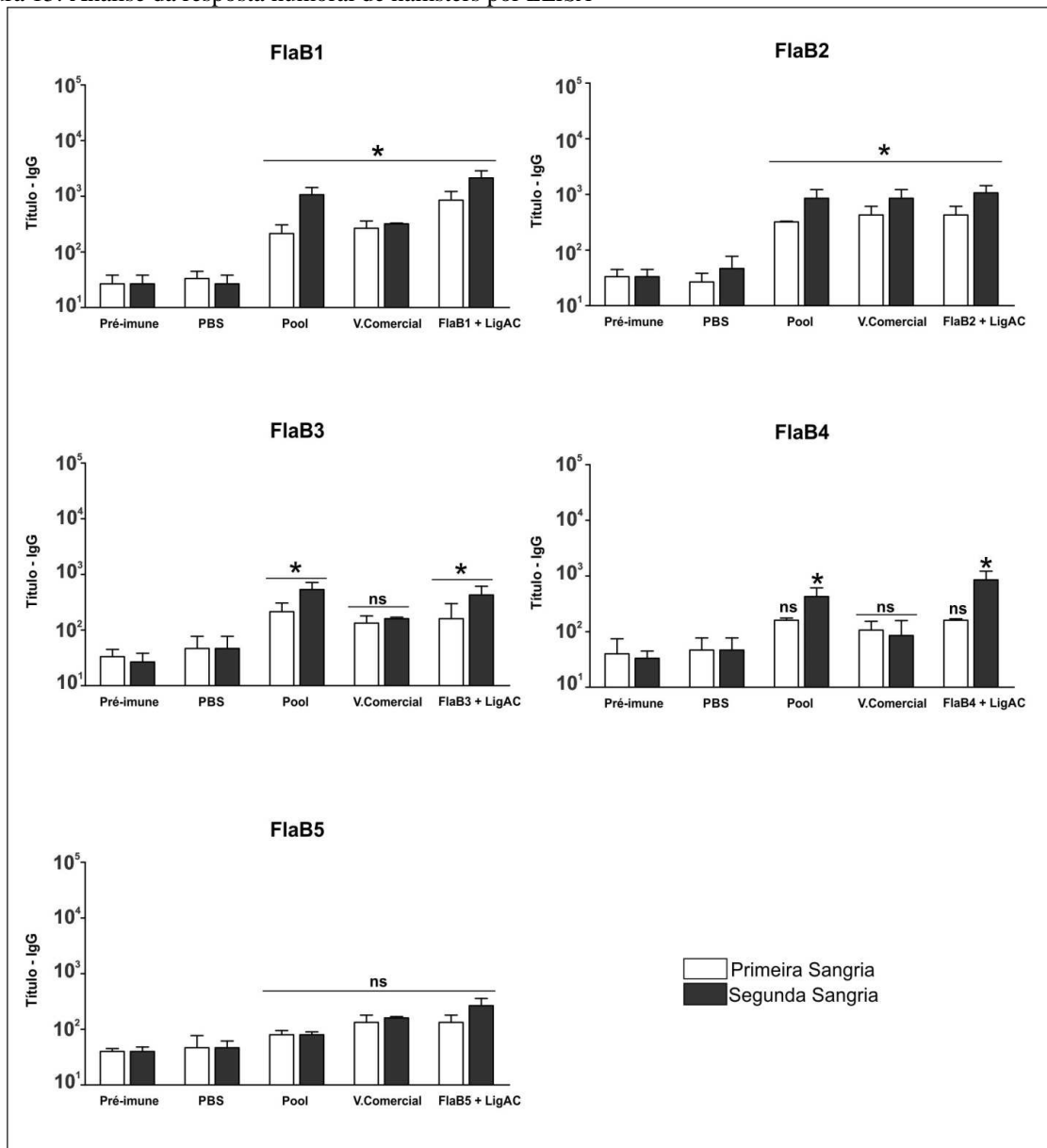
* Indica diferença estatisticamente significativa no número de animais sobreviventes dos grupos experimentais em relação aos animais dos grupos controle-negativos (controle do inóculo e PBS); ^{ns} Indica diferença estatisticamente não significativa na colonização renal dos grupos experimentais em relação ao grupo imunizado com LigAC + Al(OH)₃; (Teste exato de Fisher $p \leq 0,005$).

Apesar de todo o esforço, as vacinas, contendo as flagelinas de leptospira ou FliCi de *Salmonella* em combinação com a proteína LigAC, não foram capazes de promover uma resposta imunoprotetora comparável à obtida pela imunização com a vacina comercial, que protege 100% dos animais contra a colonização renal. A vacina comercial utilizada é composta pelas culturas inativadas de seis sorovares de *L. interrogans* e também, contém hidróxido de alumínio como adjuvante.

4.3.3 Avaliação da resposta humoral, detecção da imunogenicidade dos soros de hamsters dos experimentos do desafio por ELISA

Os soros dos hamsters da primeira e da segunda sangria, obtidos dos experimentos de imunização realizados, foram utilizados na avaliação da resposta humoral. Os gráficos da figura 15 mostram os resultados obtidos com os ELISAs realizados com as placas adsorvidas com as flagelinas recombinantes. Pode-se observar que os soros pré-imune e os soros dos animais imunizados com PBS apresentaram pouca reatividade inespecífica. Os soros dos animais imunizados com o *pool* de flagelinas recombinantes sem adjuvante apresentaram anticorpos específicos contra as flagelinas FlaB1, FlaB2, FlaB3 e FlaB4 (na segunda sangria) e não reagiram com a flagelina FlaB5 de maneira significativamente diferente dos grupos controle-negativos (pré-imune e PBS). A vacina comercial foi capaz de induzir anticorpos específicos somente contra as flagelinas FlaB1 e FlaB2, sugerindo que as flagelinas FlaB3, FlaB4 e FlaB5 não estão presentes ou são expressas em baixos níveis nos seis sorovares de *L. interrogans* (Bratislava, Canicola, Grippytyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae e Pomona) utilizados na produção desta vacina.

De maneira geral, a imunização com o *pool* de flagelinas recombinantes sem adjuvante e com cada flagelina separadamente na presença de LigAC induziram títulos baixos contra cada flagelina, sugerindo pouca imunogenicidade. Estes resultados são esperados, pois os animais foram imunizados na ausência de hidróxido de alumínio. É desejável que as composições vacinais que contenham as flagelinas como adjuvantes não induzam altos níveis de anticorpos contras às próprias flagelinas.

Figura 15: Análise da resposta humoral de hamsters por *ELISA*

Fonte: Monaris (2015)

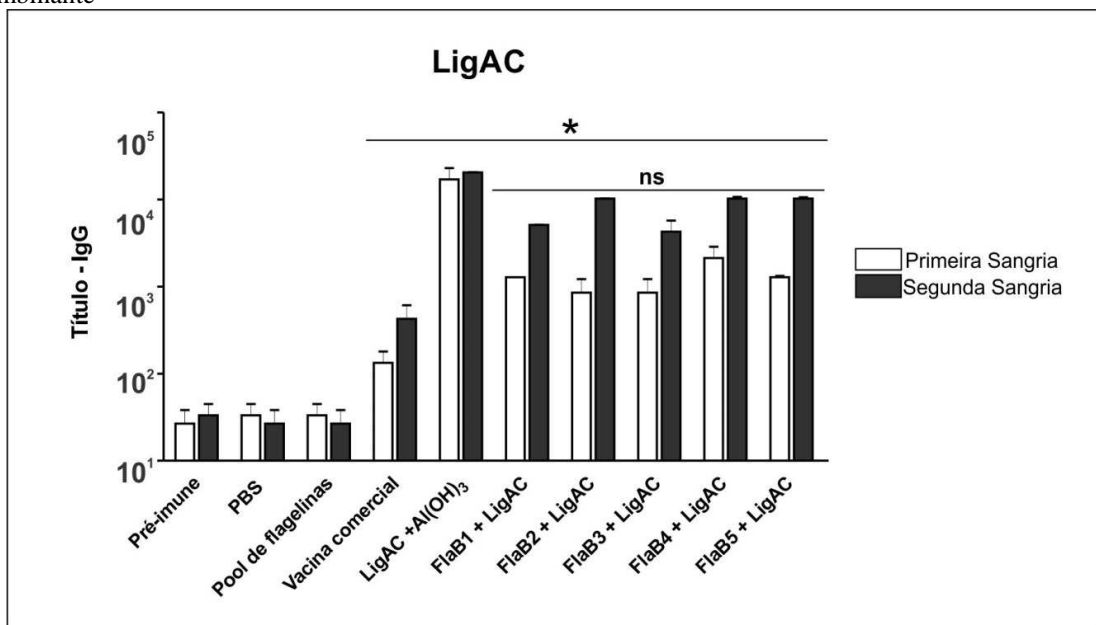
Legenda: Resposta humoral de hamsters detectado por *ELISA* em placas sensibilizadas com as flagelinas recombinantes e incubadas com os soros da primeira e da segunda sangrias. Os gráficos foram gerados a partir da média dos títulos de quatro ensaios independentes. * Indica diferença estatisticamente significativa, ns Indica diferença estatisticamente não significativa em relação aos animais dos grupos controle-negativos (Pré-imune e PBS); (teste *t* de Student; $p \leq 0,005$).

Os gráficos da figura 16 mostram os resultados obtidos com o *ELISA* realizado com as placas adsorvidas com a proteína LigAC. Os animais imunizados com a proteína LigAC com hidróxido de alumínio ou com as diferentes flagelinas apresentaram altos títulos de anticorpos e aumento do título na segunda imunização, não houve diferença estatística entre os grupos imunizados com LigAC e hidróxido de alumínio e cada uma das flagelinas. Estes resultados

demonstram que a presença da flagelina não alterou o nível de anticorpos específicos para o antígeno LigAC.

Em conjunto, os resultados obtidos pelo ELISA indicam que os soros dos animais imunizados com as diferentes preparações vacinais apresentaram baixos títulos de anticorpos contra as flagelinas. A proteína recombinante LigAC foi reconhecida pelos soros dos animais imunizados com a formulação vacinal que contém LigAC e hidróxido de alumínio e quando co-administrada com cada flagelina recombinante.

Figura 16: Análise da resposta humoral de hamsters por *ELISA* em placas sensibilizadas com LigAC recombinante



Fonte: Monaris (2015)

Legenda: Resposta humoral de hamsters por *ELISA* em placas sensibilizadas com LigAC recombinante e incubadas com os soros da primeira e da segunda sangrias. Os gráficos foram gerados a partir da média dos títulos de quatro ensaios independentes. * Indica diferença estatisticamente significativa dos grupos experimentais em relação aos animais dos grupos controle-negativos (pré-imune e PBS); ^{ns} Indica diferença estatisticamente não significativa entre os grupos imunizados com LigAC e as diferentes flagelinas e o grupo imunizado com LigAC + Al(OH)₃; (teste *t* de Student; $p \leq 0,005$).

4.4 ANÁLISE E DETECÇÃO DE FLAGELINAS DE LEPTOSPIRA ATRAVÉS DE WESTERN BLOTTING

4.4.1 Detecção de flagelinas recombinantes de leptospira com soros hiperimunes de hamsters imunizados

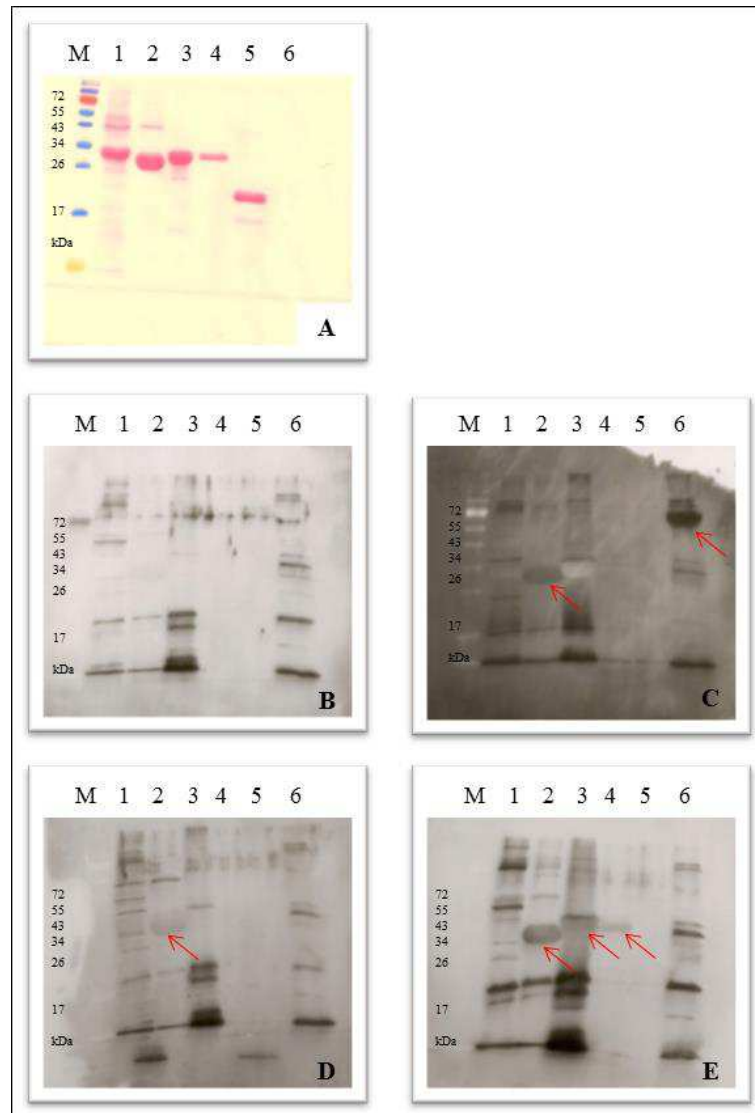
Com o intuito de conhecer a especificidade do reconhecimento das proteínas recombinantes pelos soros dos animais imunizados com PBS + Al(OH)₃, vacina comercial e *pool* de flagelinas foram realizados experimentos de *Western Blotting* utilizando soros da segunda sangria e soros de hamsters infectados por *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130.

As flagelinas recombinantes purificadas (FlaB1, FlaB2, FlaB3, FlaB4, FlaB5) e a proteína recombinante LigAC foram submetidas à eletroforese, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e coradas com Ponceau (Figura 17-A). Foram preparadas quatro membranas iguais e cada uma foi incubada com um soro diferente (Figura 17-B, C, D e E).

A figura 17-B mostra que os soros dos hamsters imunizados com PBS + Al(OH)₃ não reconheceu as bandas de nenhuma proteína, mas são observados ruídos de reconhecimentos inespecíficos. A figura 17-C, mostra que os soros dos hamsters infectados por *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130 reconheceu a flagelina FlaB2 e a proteína recombinante LigAC. Observamos na figura 17-D que os soros dos animais imunizados com vacina comercial reconhece apenas a FlaB2 e na figura 17- E é demonstrado que apenas as bandas correspondentes a FlaB2, FlaB3 e FlaB4 são reconhecidas pelos soros dos animais imunizados com o *pool* das cinco flagelinas, exceto a proteína LigAC, como era esperado, já que não faz parte desta composição vacinal.

Estes resultados demonstram que há especificidade no reconhecimento de algumas proteínas recombinantes pelos soros dos animais imunizados com o *pool* de flagelinas, vacina comercial e infecção induzida por leptospiros.

Figura 17 - Detecção das flagelinas recombinantes e LigAC recombinante com soro de hamsters por *W. blotting*.



Fonte: Monaris (2015)

Legenda: **A)** Membrana de nitrocelulose corada com Ponceau S; **B)** soro de hamsters imunizados com PBS + Al(OH)₃; **C)** soro de hamsters infectados por *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130; **D)** soro de hamsters imunizados com vacina comercial; **E)** soro de hamsters imunizados com pool de flagelinas. **M)** Marcador de peso molecular; 1) FlaB1; 2) FlaB2; 3) FlaB3; 4) FlaB4; 5) FlaB5; 6) LigAC.

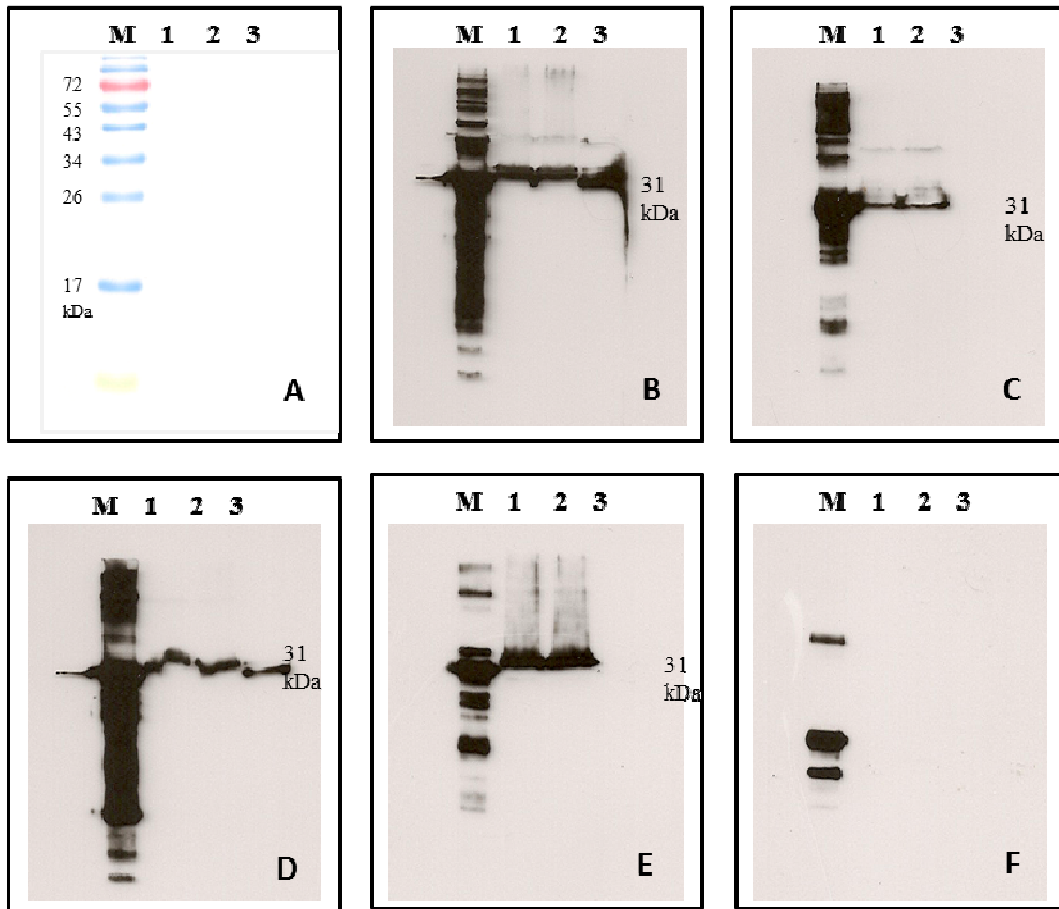
4.4.2 Detecção das flagelinas com soros hiperimunes de camundongos

Com o intuito de conhecer a especificidade do reconhecimento das flagelinas nativas pelos soros hiperimunes produzidos em camundongos BALB/c, foram realizados ensaios por *Western Blotting*, para detectar a expressão das flagelinas em duas temperaturas de crescimento bacteriano (29 e 37 °C). O aumento da temperatura para 37 °C foi utilizado para mimetizar a temperatura do hospedeiro.

Na figura 18, extratos de leptospira foram submetidos à eletroforese e transferidos para uma membrana de nitrocelulose, 10 µl de cada lisado e 20 ng de flagelina recombinante como controle positivo. Foram preparadas cinco membranas iguais e cada uma foi incubada com um soro diferente. Os soros anti-FlaB1, anti-FlaB2, anti-FlaB3 e anti-FlaB4 foram capazes de reconhecer em lisado total as flagelinas nativas expressas em diferentes temperaturas (29 e 37 °C), conforme figura 18-B, C, D e E. Estes resultados demonstram que com o aumento da temperatura não alterou a expressão destas flagelinas.

Entretanto, o soro anti-FlaB5 não foi capaz de reconhecer a flagelina nativa em lisado total, o que sugere que este gene não é expresso *in vitro* e nos abre a perspectiva de explorar em que condição este gene é expresso. Em geral, estes resultados demonstram que há especificidade no reconhecimento de flagelinas pelos soros dos camundongos imunizados e corroboram com os *ELISAS* e confirmam a produção e reconhecimento de anticorpos.

Figura 18 – Detecção de flagelinas expressas em diferentes temperaturas, com soro de camundongos hiperimunes por Western Blotting.



Fonte: Monaris (2015)

Legenda: **A)** membrana de nitrocelulose; **B)** soro anti-FlaB1; **C)** soro anti-FlaB2; **D)** soro anti-FlaB3; **E)** soro anti-FlaB4; **F)** soro anti-FlaB5. **M)** marcador de peso molecular page ruler; **1)** Lisado total de cultura a 29 °C; **2)** Lisado total de cultura a 37 °C ; **3)** flagelina recombinante.

4.4.3 Análise da expressão *in vitro* de flagelina nativa de leptospira em cultura de macrófagos, linhagem J774

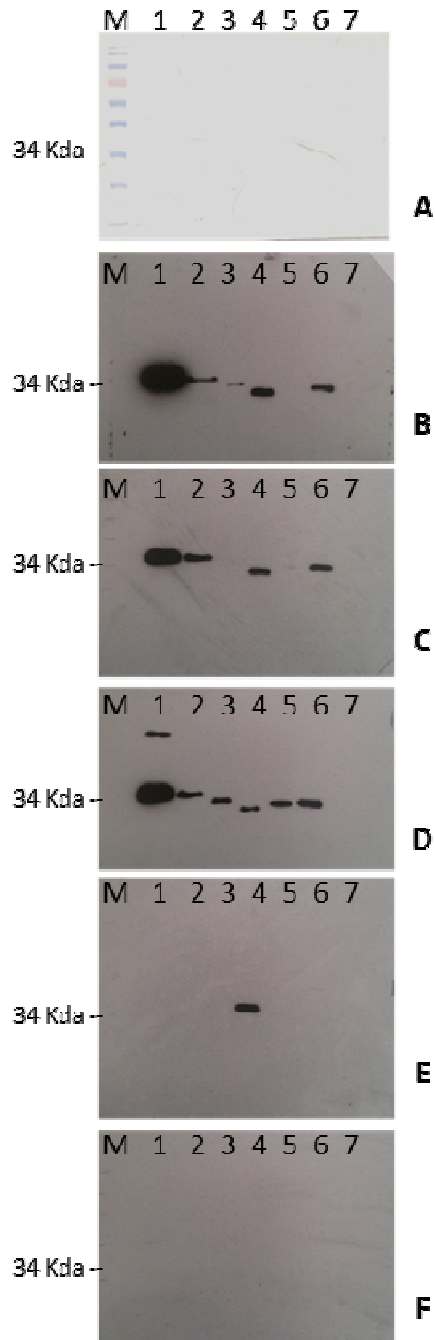
A análise da expressão *in vitro* das flagelinas nativas de leptospiras foi realizada em duas etapas. Primeira, foi obtido um lisado total de *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130 cultivado em meio EMJH a 29 °C. Segundo, uma cultura celular de macrófagos (J774) foi infectada. Após a infecção, amostras dos lisados e de flagelinas recombinantes foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e incubadas com anticorpo policlonal, contra cada uma das flagelinas, produzido em camundongo.

As flagelinas FlaB1, FlaB2 e FlaB3 foram detectadas no lisado total de uma cultura de leptospiras crescida a 29 °C e no lisado total de leptospiras em contato com a cultura de

macrófagos durante 24 horas (Figura 19-B, C e D; poços 1 e 2 respectivamente). Demonstrando que estas flagelinas são expressas durante a infecção. Não foi observada a presença das flagelinas FlaB4 e FlaB5 no lisado das leptospiros em contato com macrófagos.

Além disso, neste experimento também analisamos o reconhecimento cruzado entre as flagelinas recombinantes. O soro anti-FlaB1 foi capaz de reconhecer as proteínas recombinantes FlaB2 e FlaB4 além da própria FlaB1; enquanto o soro anti-FlaB2 foi capaz de reconhecer apenas a proteína recombinante FlaB4 e a si mesma. E, por último o soro anti-FlaB3 reconheceu todas as outras flagelinas recombinantes com exceção da FlaB5 que também não apresentou reatividade com nenhuma outra flagelina recombinante.

Figura 19 - Avaliação da expressão *in vitro* e reconhecimento por soro hiperimune de flagelinas de *Leptospira*.



Fonte: Monaris (2015)

Legenda: Expressão das flagelinas em cultura de células J774, infectadas com *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe L1-130 (MOI 100), analisadas por western blotting (poços 1 e 2) e reconhecimento por soro hiperimune de camundongos BALB/c de flagelinas recombinantes. **A)** Membrana de nitrocelulose; **B)** Soro policlonal anti- FlaB1; **C)** Soro policlonal anti- FlaB2; **D)** Soro policlonal anti- FlaB3; **E)** Soro policlonal anti- FlaB4; **F)** Soro policlonal anti- FlaB5. Soros produzidos em camundongo BALB/c. **M)** Marcador de peso molecular *Page Ruler*; **1)** Lisado total - *L. Interrogans* (L1-130) - cultura em meio EMJH a 29 °C; **2)** Lisado total - *L. Interrogans* (L1-130) - após infecção em macrófagos J774, durante 24horas; **3)** FlaB1 Flagelina recombinante *L. Interrogans* (LIC11531); **4)** FlaB2 Flagelina recombinante *L. Interrogans* (LIC11532); **5)** FlaB3 Flagelina recombinante *L. Interrogans* (LIC11889); **6)** FlaB4 Flagelina recombinante *L. Interrogans* (LIC11890); **7)** FlaB5 Flagelina recombinante *L. Interrogans* (LIC12947)

4.5 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE FLAGELINAS DE LEPTOSPIRA ATRAVÉS DA ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE CITOCINAS

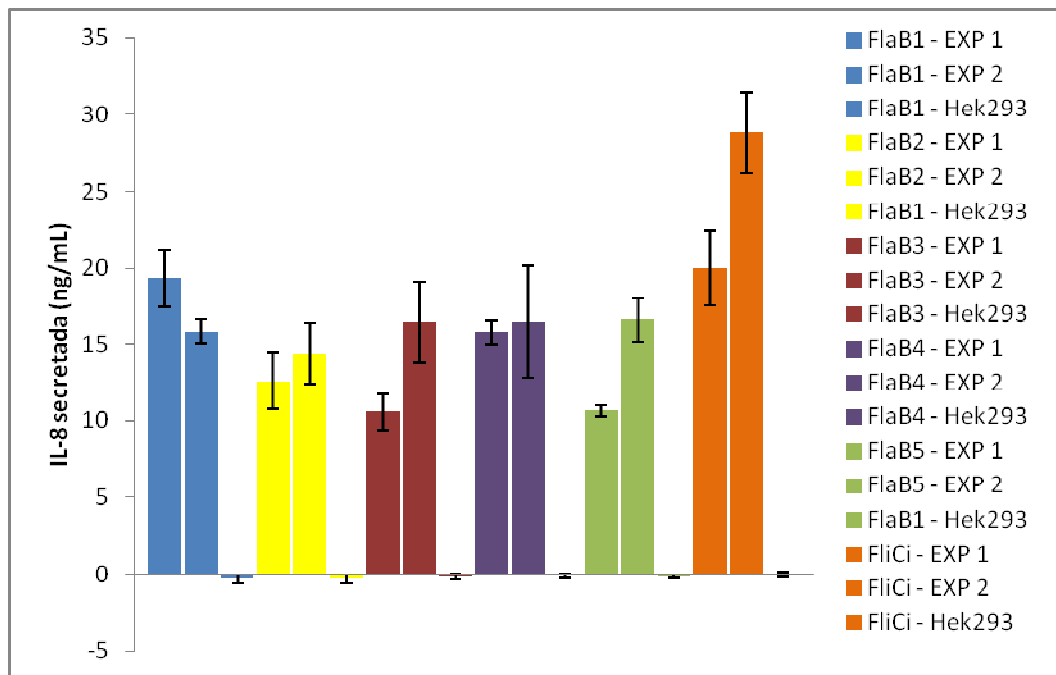
4.5.1 Análise da expressão *in vitro* de IL-8 mediada por flagelinas recombinantes de leptospira através de ensaios de ativação do TLR5 em cultura celular, linhagem Hek293

Para determinação da bioatividade da flagelina e comprovar se as proteínas do flagelo de leptospira são capazes de ativar o TLR5, as células Hek293 foram transfectadas com um plasmídeo que codifica o TLR5 humano (pUNO-hTLR5 - Invitrogen) originando a linhagem celular Hek293/TLR5. As linhagens celulares Hek293 e Hek293/TRL5 foram mantidas em meio de cultura DMEN suplementado com 10% SFB (soro fetal bovino), na presença ou ausência do antibiótico blasticidina (1µg/mL), respectivamente. Para realização de cada ensaio, essas células foram cultivadas em placas de 96 poços, na densidade 5×10^4 células por poço (100 µl de meio) por 12 horas, a 37 °C e 5% CO₂.

As flagelinas recombinantes FlaB1, FlaB2, FlaB3, FlaB4 e FlaB5 foram incubadas com polimixina e posteriormente, adicionadas às células na concentração de 1µg/mL. As culturas foram mantidas a 37 °C e 5% CO₂ por 5 horas. Como controle positivo da ativação do TRL5, a flagelina FliCi de *Salmonella enterica* sorovar Thyphimurium purificada foi utilizada. Após o período de ativação, os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados e a expressão de IL-8 foi avaliada por *ELISA*.

Na figura 20, são mostrados os valores médios (triplicatas), de 2 experimentos independentes, subtraídos dos dados obtidos com as células Hek293 transfectadas com TRL5 e não estimuladas. É possível observar que as flagelinas recombinantes e a proteína FliCi (controle positivo) induziram a produção de IL-8 nas células Hek293 transfectadas com TRL5. Como controle negativo foram usadas as células Hek293 não transfectadas com TRL5, que não produziram IL-8 após o estímulo com as flagelinas recombinantes e a proteína FliCi. Estes resultados mostraram que as flagelinas de leptospira são capazes de induzir a atividade do TLR5, provavelmente pela interação das sequências de aminoácidos conservadas (Figura 1) em regiões importantes para a indução da atividade do TRL5.

Figura 20 - Secreção de IL-8 pelas células Hek293 transfectadas com TRL5 (EXP 1 e EXP2) e não transfectadas (Hek293) e estimuladas com as flagelinas recombinantes de leptospira e FliCi (controle positivo).



Fonte: Monaris (2015)

Legenda: São mostrados os desvios-padrão e os valores médios (triplicatas) subtraídos dos dados obtidos com as células Hek293 transfectadas com TRL5 e não estimuladas de dois experimentos independentes. As células foram estimuladas com 1µg/mL de cada proteína em 100 µl de meio de cultura.

4.5.2 Análise da expressão *in vivo* de IL-6 mediada por flagelinas recombinantes de leptospira em camundongos BALB/c

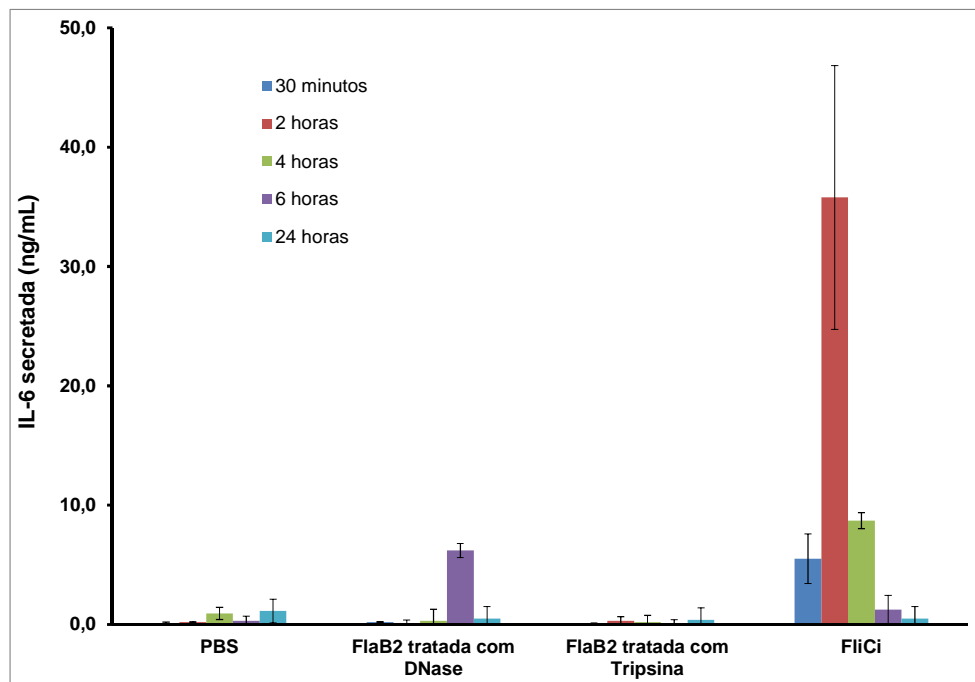
Para determinar a bioatividade *in vivo* das flagelinas, camundongos BALB/c foram inoculados, intraperitonealmente, com 5 µg de cada flagelina recombinante. Como controle positivo, 5 µg de flagelina FliCi de *Salmonella enterica* purificada foram utilizados. As proteínas foram diluídas em 200 µl de PBS por dose. Amostras de soro destes animais foram coletadas em diferentes tempos e a concentração de IL-6 foi determinada utilizando o kit Elisa IL-6/ mouse (*BD Biosciences*), de acordo com as instruções do fabricante.

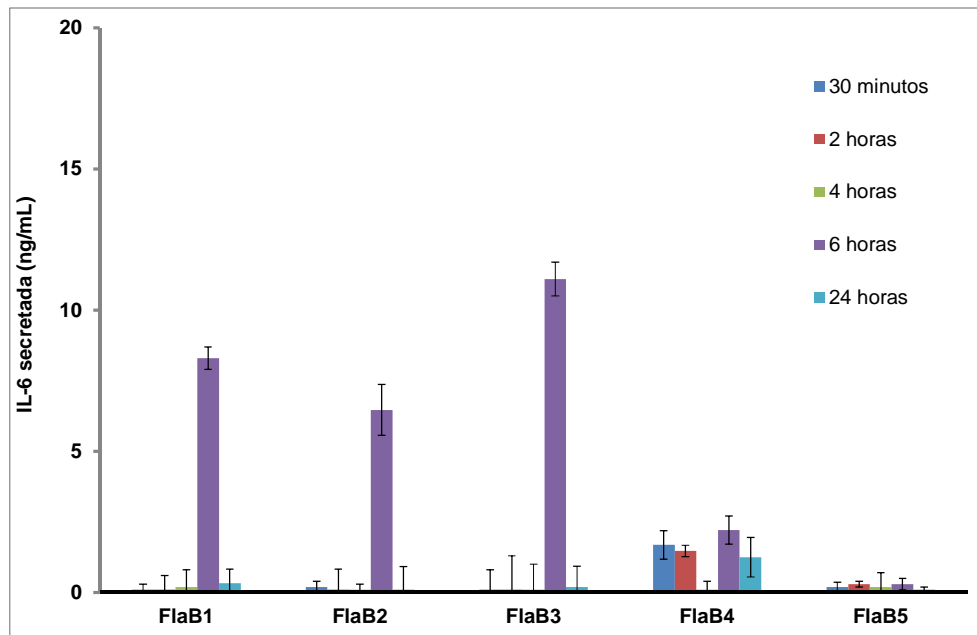
As flagelinas recombinantes não foram incubadas com polimixina antes da inoculação, pois a quantificação dos níveis de endotoxinas realizada com o Kit *Limulus ameocyte lysate assay* (Lonza) mostrou níveis abaixo de 2 unidades/µg de proteína recombinante purificada. Mesmo assim, incluímos mais um controle negativo, que se constituiu da flagelina FlaB2 incubada com tripsina durante 18 hs. E, também, foi realizada o

controle da contaminação por DNA, com a incubação da flagelina FlaB2 com DNase antes da inoculação nos animais.

Na figura 21, são mostrados os valores médios da quantificação de IL-6 no soro de camundongos. É possível observar que as flagelinas recombinantes FlaB1, FlaB2 e FlaB3 e a proteína FliCi (controle positivo) induziram a produção transitória de IL-6 em camundongos em tempos diferentes, 6 e 2 horas, respectivamente. Os resultados obtidos com a flagelina de *Samonella* são os mesmos descritos na literatura, inclusive com os mesmos níveis de indução aproximados (~ 35 ng/ml). A flagelina FlaB4 apresentou baixos níveis de indução de IL-6, com valores muito próximos ao limite de detecção do kit (1 ng/ml). A FlaB5 não induziu a produção de IL-6 nos tempos avaliados. Como controles negativos foram utilizados PBS, FlaB2 tratada com DNase e tratada com tripsina. Somente houve indução da secreção de IL-6 na amostra tratada com DNase em 6 horas, demonstrando que os resultados obtidos com as flagelinas são específicos e não foram induzidos por contaminação de DNA bacteriano ou LPS. Estes dados mostraram que as flagelinas FlaB1, FlaB2 e FlaB3 de leptospira são capazes de induzir a produção de IL-6 *in vivo*.

Figura 21: Quantificação de IL-6 *in vivo* induzidas por flagelinas recombinantes de leptospira





Fonte: Monaris (2015)

Legenda: A citocina IL-6 foi quantificada no soro de camundongos inoculados com as flagelinas recombinantes de leptospira e FliCi (controle positivo). Os controles negativos correspondem aos animais inoculados com PBS, FLAB2 tratada com DNase e tratada com tripsina. São mostrados os valores médios de IL-6 obtidos com os soros de três camundongos.

4.5.3 Análise da expressão *in vitro* de citocinas (Th1/Th2) mediada por flagelinas recombinantes de leptospira em cultura celular de macrófagos de C57BL/6

Em geral, as citocinas auxiliam na defesa contra agentes infecciosos, são moléculas que emitem sinais entre as células durante uma resposta imunológica, podem ser expressas por diversas células como como monócitos, macrófagos e linfócitos.

Neste experimento, foi quantificada a presença de citocinas nos sobrenadantes de cultura de macrófagos de camundongos C57BL/6, estimuladas com flagelinas de leptospira recombinantes purificadas e como controle positivo foi utilizado a flagelina FliCi de *S. Typhimurium*. Foram usadas duas formas de estímulo, em sua forma livre, apenas a flagelina diluída no meio de cultura e outra inserida dentro de vesículas lipídicas, denominadas DOTAP. Como controle negativo, os macrófagos foram incubados apenas com meio de cultura DMEM e com vesículas lipídicas DOTAP vazias.

A expressão das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, INF γ , TNF, IL-17A e IL-10 nos sobrenadantes das culturas foram determinadas por citometria de fluxo, utilizando-se o kit

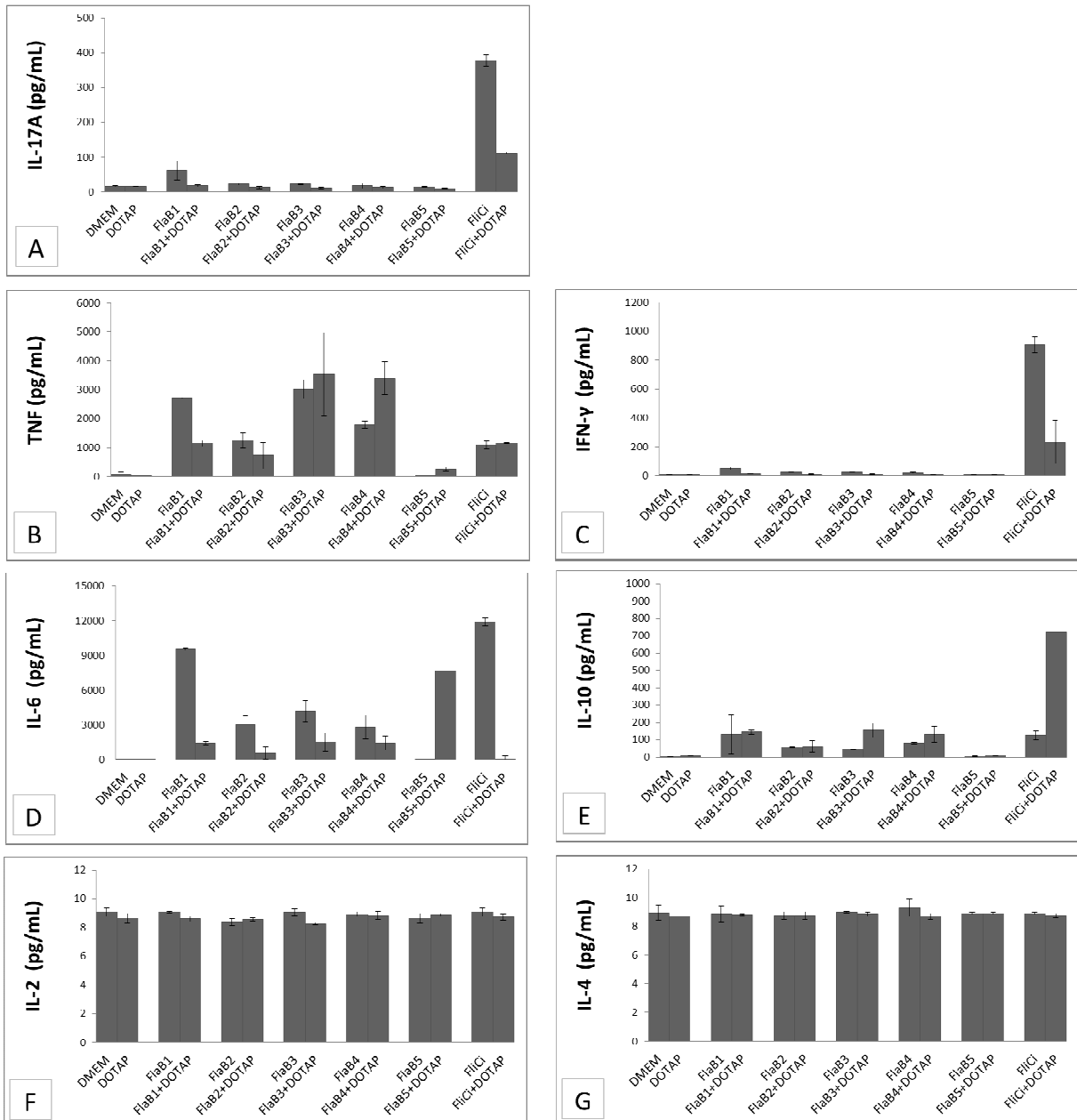
“BD CBA (*BD Biosciences*), de acordo com as instruções do fabricante. O experimento foi realizado em duplicata, o cálculo das médias foram plotados em gráficos que podem ser observados na figura 22.

Os dados obtidos revelam que as flagelinas recombinantes sem a presença de DOTAP estimulou a produção de IL-6. Esta citocina é descrita por ser pleiotrópica (o gene possui múltiplos efeitos), de atividade pró e inflamatória e está entre os mediadores mais potentes da resposta aguda da inflamação. A FlaB1 atingiu em torno de 9000 pg/mL (Figura 22-D), valor próximo ao controle positivo FliCi livre (ausente de DOTAP) que atingiu em torno de 11000 pg/mL. Estes dados corroboram com os experimentos de detecção de IL-6 *in vivo*, onde as flagelinas induziram a expressão desta citocina (Figura 21).

As flagelinas recombinantes livres e incorporadas ao DOTAP foram capazes de induzir TNF (Figura 22-B) em níveis maiores que a FliCi. O TNF é secretado principalmente por macrófagos e sua principal atividade é citólise e ação antitumoral.

Não foi observado a expressão de IL-17A, $\text{INF}\gamma$ e IL-10 (Figura 22-A, C e E, respectivamente) por estímulo de flagelinas de leptospira, assim como não foi observado nenhuma expressão de IL-2 e IL-4 (Figura 22-F e G). Enquanto FliCi livre estimulou a expressão de IL-17A, $\text{INF}\gamma$, IL-6 (Figura 22-A, C e D) e FliCi+DOTAP estimulou a expressão de IL-10 (Figura 22-E).

Figura 22: Quantificação de citocinas (Th1/Th2) mediada por flagelinas recombinantes de leptospira em cultura de macrófagos de C57BL/6



Fonte: Monaris (2015)

No quadro 6 está um resumo de todos os resultados obtidos neste trabalho. Na comparação dos dados é possível concluir que apesar de todas as flagelinas de leptospira serem capazes de ativar o receptor Toll-like 5 e a secreção de citocinas em macrófagos estimulados de maneira similar, nenhuma foi capaz de induzir uma resposta imune adequada que resultasse na diminuição da colonização renal. Resultado diferente do obtido por nosso grupo com a flagelina FliCi de *Salmonella* que juntamente com uma mistura de sete proteínas de membrana externa de *Leptospira*, entre elas a LigAC, foi capaz de reduzir

significativamente a colonização renal em animais imunizados (MONARIS et al, submetido). Esta diferença pode ser devido à baixa capacidade de ativação das flagelinas de leptospira em comparação com a flagelina de *Salmonella*, muito mais potente.

Por outro lado, a existência de pelo menos quatro flagelinas (FlaB1 até FlaB4) sugere que a inativação específica de uma flagelina não resultaria na diminuição da motilidade ou perda da virulência, pois esta poderia ser substituída por outra. Esta redundância na funcionalidade das flagelinas também é observada em outras espiroquetas, como a *Treponema* spp. que também contém três flagelinas diferentes (FlaB1, FlaB2 and FlaB3) (RUBY et al., 1997; FRASER et al., 1998).

Quadro 6: Resumo dos resultados obtidos neste trabalho.

	FlaB1	FlaB2	FlaB3	FlaB4	FlaB5
Sobrevivência quando co-administrada com LigAC	95%	95%	90%	100%	100%
Colonização Renal quando co-administrada com LigAC	94%	73%	83%	100%	100%
Localização Celular	Periplasmática Extracelular	ND*	ND*	Periplasmática	ND*
Conservação em diferentes espécies e sorovares	Todos	Todas	<i>L. interrogans sorovar Copenhageni estirpe 10A e L. noguchii sorovar Panamá</i>	Todas	Não
Expressão a 29°C	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
Expressão a 37°C	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
Expressão durante a Infecção de macrófagos	Sim	Sim	Sim	Não	Não
Reconhecimento Cruzado	FlaB2 e FlaB4	FlaB4	FlaB1, FlaB2 e FlaB4	FlaB3	Não
Ativação de TLR5 (IL-8)	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
IL-6 em BALB/c	Sim	Sim	Sim	Não	Não
Citocinas em macrófagos estimulados pelas flagelinas livres	TNF, IL6, IL2, IL4 e IL2	TNF, IL2, IL4 e IL6	TNF, IL2, IL4 e IL6	TNF, IL2, IL4 e IL6	Nenhuma
Citocinas em macrófagos estimulados pelas flagelinas com DOTAP	IL2, IL4 e TNF	IL2, IL4 e TNF	IL2, IL4 e TNF	IL2, IL4 e TNF	IL2, IL4 e IL6

*ND: Não determinado

5 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste manuscrito demonstraram que:

- As flagelinas de leptospira foram capazes de ativar o receptor Toll-like 5 e a secreção de citocinas em macrófagos estimulados de maneira similar,
- Nenhuma flagelina quando co-administrada com a proteína LigAC foi capaz de induzir uma resposta imune adequada que resultasse na diminuição da colonização renal.
- A proteína recombinante LigAC foi reconhecida pelos soros dos animais imunizados com a formulação vacinal que contém LigAC e as flagelinas recombinantes.
- Os soros policlonais feitos em camundongo contra as flagelinas recombinantes foram capazes de reconhecer especificamente as bandas correspondentes.
- As flagelinas FlaB1 e FlaB4 foram localizadas no espaço periplasmático (fração aquosa) da *L. interrogans*.
- Há especificidade no reconhecimento flagelinas recombinantes pelos soros dos animais imunizados com o *pool* de flagelinas e vacina comercial e soro de animais infectados por leptospiros.
- Soros anti-FlaB1, anti-FlaB2, anti-FlaB3 e anti-FlaB4 são capazes de reconhecer flagelinas nativas expressas em diferentes temperaturas (29 e 37 °C).

6 ATIVIDADES COMPLEMENTARES

Cabe ressaltar que com objetivo de aprimoramento foram realizadas, durante o período de doutoramento, as atividades, eventos e colaborações em projetos, listadas a seguir:

1) INTERCÂMBIO / COLABORAÇÃO INTERNACIONAL

- Foi realizado um intercâmbio de 4 meses para iniciar uma colaboração científica entre o Instituto Butantan e o CEA-Saclay (França), sob um contrato firmado e aprovado pelo CCInt-FMVZ-USP, com a finalidade de desenvolver estudos e produção de uma vacina contra leptospirose.

2) PRÊMIO

- 1º lugar no Prêmio Fundação Butantan pelo trabalho **“Leptospiral Immunoglobulin-like Proteins Interact with Human Complement Regulators Factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP”**, realizado pelos autores: Castiblanco-Valencia MM, Fraga TR, Silva LB, Monaris D, Abreu PA, Strobel S, Józsi M, Isaac L, Barbosa AS, publicado no periódico “The Journal Infectious Diseases. 2012 Mar; 205(6):995-1004. Epub 2012 Jan 30”.

3) PUBLICAÇÕES

- **Protective immunity and reduced renal colonization induced by vaccines containing recombinant Leptospira interrogans outer membrane proteins and flagellin adjuvant.**

Monaris D, Sbrogio-Almeida ME, Dib CC, Canhamero TA, Morais ZM, Vasconcellos SA, Ferreira LC, Abreu PAE.

Em processo de submissão: Clinical and Vaccine Immunology

- **Pathogenic Leptospira acquire Factor H and vitronectin via the surface protein LcpA.**

Silva LB, Miragaia LD, Breda LC, Abe CM, Schmidt MC, Moro AM, Monaris D, Conde JN, Józsi M, Isaac L, Abreu PA, Barbosa AS.

Periódico: Infect Immun. 2014 Dec 22. pii: IAI.02844-14.

- **Staphylococcus aureus manganese transport protein C (MntC) is an extracellular matrix- and plasminogen-binding protein.**

Salazar N, Castiblanco-Valencia MM, da Silva LB, de Castro Í, Monaris D, Masuda HP, Barbosa AS, Arêas AP.

Periódico: PLoS One. 2014 Nov 19;9(11):e112730. doi: 10.1371/journal.pone.0112730. eCollection 2014.

- **Leptospiral Immunoglobulin-like Proteins Interact with Human Complement Regulators Factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP.**

Autores: Castiblanco-Valencia MM, Fraga TR, Silva LB, Monaris D, Abreu PA, Strobel S, Józsi M, Isaac L, Barbosa AS.

Periódico: The Journal Infectious Diseases. 2012 Mar; 205(6):995-1004. Epub 2012 Jan 30.

- **Interaction of leptospira elongation factor tu with plasminogen and complement factor h: a metabolic leptospiral protein with moonlighting activities.**

Autores: Wolff DG, Castiblanco-Valencia MM, Abe CM, Monaris D, Morais ZM, Souza GO, Vasconcellos SA, Isaac L, Abreu PA, Barbosa AS.

Periódico: PLoS One. 2013 Nov 27;8(11):e81818. doi: 10.1371/journal.pone.0081818.

4) PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS CIENTÍFICOS

- **VII Reunión de La International Leptospirosis Society**

Local: Universidad Autónoma de Yucatán (Mérida, Yucatán, México).

Data: 19 a 22/10/2011 **Apresentação:** Oral

- a. **Título do Trabalho:** Adjuvant activity of Salmonella FliCi flagellin in the development of a subunit vaccine against leptospirosis. **Autores:** Monaris D, Barbosa AS, Nunes KSR, Gonçalves AP, Morais ZM, Gasparelo TC, Sbrogio-Almeida ME, Vasconcellos AS, Ferreira LC, Abreu PAE

- **26° Congresso Brasileiro de Microbiologia (SBM)**

Local: Rafain Palace Hotel e Convention Center Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil

Data: 02 a 06/10/2011 **Apresentação:** Pôster

- a. **Título do Trabalho:** Adjuvant activity of Salmonella FliCi flagellin in the development of a subunit vaccine against leptospirosis. **Autores:** Monaris D, Barbosa AS, Nunes KSR, Gonçalves AP, Morais ZM, Gasparelo TC, Sbrogio-Almeida ME, Vasconcellos AS, Ferreira LC, Abreu PAE
- b. **Título do Trabalho:** Development of a microbial cell display system for the expression of heterologous lipoproteins on the surface of *E. coli*. **Autores:** Fazolo DL, Monaris D, Spadafora-Ferreira M, Morais ZM, Vasconcellos AS, Barbosa AS, Abreu PAE
- c. **Título do Trabalho:** Comparação da produção de TNF α entre macrófagos de camundongos C3H/HeJ após ativação por intimina e BFP. **Autores:** Mourão DB, Monaris D, Menezes MA, Galhardo CS, Vasconcellos HLF, Abreu PAE, Borges MM, Piazza RMF.

- **XIII Reunião Científica Anual do Instituto Butantan**

Local: Instituto Butantan / SP

Data: 30/11/11 a 02/12/11 **Apresentação:** Pôster

- a. **Título do Trabalho:** Surface leptospiral protein LcpA induces partial protection in hamsters and reduces renal colonization **Autores:** Silva LB, Monaris D, Gonçalves AP, Morais ZM, Vasconcellos AS, Abreu PAE, Barbosa AS
- b. **Título do Trabalho:** Development of a microbial cell display system for the expression of heterologous lipoproteins on the surface of *E. coli* **Autores:** Fazolo DL, Monaris D, Spadafora-Ferreira M, Morais ZM, Vasconcellos AS, Barbosa AS, Abreu PAE
- c. **Título do Trabalho:** Characterization of Leptospira interrogans Lp35 protein-binding adhesive matrix molecules. **Autores:** Matos VR, Monaris D, Gonçalves AP, Morais ZM, Vasconcellos AS, Barbosa AS, Abreu PAE
- d. **Título do Trabalho:** The virulence factors intimin and BfpA trigger TNF α production **Autores:** Mourão DB, Monaris D, Menezes MA, Galhardo CS, Vasconcellos HLF, Abreu PAE, Borges MM, Piazza RMF

- **I Simpósio Interno da Pós Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses**

Local: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, São Paulo, SP, Brasil

Data: 03 a 04/08/2011 **Apresentação:** Oral/Pôster

- **XXIV Internacional Complement Workshop**

Local: Chania, Crete, Greece

Periódico: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2012.08.151> **Apresentação:** Pôster

- a. **Título do Trabalho:** Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with plasminogen to escape complement mediated-killing. Immunobiology, Volume 217, Issue 11, November 2012, Page 1181. **Autores:** Mónica M. Castiblanco Valencia, Tatiana R. Fraga, Ludmila B. Silva, Denize Monaris, Patricia A. E. Abreu, Angela S. Barbosa e Lourdes Isaac.

- **XXXVII Congress of the Brazilian Society of Immunology**

Local: Campos do Jordão, São Paulo, Brasil

Data: 20 a 24/10/2012 **Apresentação:** Pôster

- d. **Título do Trabalho:** Plaminogen binds to leptospiral immunoglobulin-like proteins and inhibits complement activation. **Autores:** Mónica M. Castiblanco Valencia, Tatiana R. Fraga, Ludmila B. Silva, Denize Monaris, Patricia A. E. Abreu, Angela S. Barbosa e Lourdes Isaac.

- **XXI ALAM – Congresso Latinoamericano de Microbiologia**

Local: Mendes Convention Center, Santos, São Paulo, Brasil

Data: 28/10/12 a 01/11/12 **Apresentação:** Pôster

- a. **Título do Trabalho:** Clonagem, expressão e purificação de flagelinas recombinantes de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni. **Autores:** Monaris, D; Sbrogio-Almeida, M.E.; Vasconcellos, S.A.; Ferreira, L.C.; Abreu, P.A.E.
- b. **Título do Trabalho:** Estudo da interação de prováveis lipoproteínas de membrana externa de *Leptospira* com proteínas do hospedeiro. **Autores:** Fazolo DL, Monaris D, Abe CM, Morais ZM, Vasconcellos AS, Barbosa AS, Abreu PAE.
- c. **Título do Trabalho:** Desenvolvimento do vetor pLIPO para expressão de lipoproteínas de *Leptospira* spp. na superfície da *E. coli*. **Autores:** Gotti TB, Monaris D, Spadafora-Ferreira M, Morais ZM, Vasconcellos AS, Barbosa AS, Abreu PAE.
- d. **Título do Trabalho:** Mapeamento do(s) domínio(s) da proteína LcpA de *Leptospira* envolvido(s) na interação com os reguladores do sistema complemento humano C4B binding protein e fator H. **Autores:** Silva LB, Monaris D, Hauk P, Abreu PAE, Barbosa AS.
- e. **Título do Trabalho:** Interaction of spirochetes of genus *Leptospira* with human vitronectin. **Autores:** Miragaia LS, Monaris D, Silva LB, Vasconcellos SA, Morais ZM, Abreu PAE, Barbosa AS.

- **XIV Reunião Científica Anual do Instituto Butantan**

Local: Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

Data: 05 a 07/12/12 **Apresentação:** Pôster

- a. **Título do Trabalho:** Functional characterization of the elongation factor Tuff from *Leptospira*: example of a moonlighting protein. **Autores:** Wolff DG, Castiblanco-Valencia MM, Monaris D, Abe C, Isaac L, Abreu PAE, Barbosa AS.
- b. **Título do Trabalho:** Mapping of leptospiral complement protein A (LcpA) domains involved in the interaction with the human complement regulators C4b binding protein and Factor H. **Autores:** Silva LB, Monaris D, Hauk P, Abreu PAE, Barbosa AS.
- c. **Título do Trabalho:** Interaction of spirochetes of genus *Leptospira* with human vitronectin. **Autores:** Miragaia LS, Monaris D, Silva LB, Vasconcellos SA, Morais ZM, Abreu PAE, Barbosa AS.

- **8th Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society**

Local: Kyushu University – Faculty of Medical Sciences (Fukuoka, Japan).

Data: 08 a 11/10/2013 **Apresentação:** Pôster

- a. **Título do Trabalho:** Immunogenic potencial of leptospiral flagellins in the development of a subunit vaccine against leptospirosis. **Autores:** Monaris D, Braga CJM, Morais ZM, Vasconcellos AS, Ferreira LC, Abreu PAE.
- b. **Título do Trabalho:** Cell display system for the expression of leptospiral lipoproteins on the surface of *E. coli*. **Autores:** Gotti TB, Monaris D, Spadafora-Ferreira MS, Souza GO, Morais ZM, Vasconcellos AS, Abreu PAE.

- **27º CBM – Congresso Brasileiro de Microbiologia**

Local: Centro de Convenções de Natal (Natal, RN, Brasil)

Data: 29/09/13 a 03/10/13 **Apresentação:** Pôster

- a. **Título do Trabalho:** Estudo da interação de prováveis lipoproteínas de membrana externa de *Leptospira* com proteínas do hospedeiro. **Autores:** Fazolo DL, Monaris D, Abe CM, Morais ZM, Vasconcellos SA, Barbosa AS, Abreu PAE.
- b. **Título do Trabalho:** Interação da proteína de superfície LcpA de *Leptospira* com fator H, principal regulador solúvel da via alternativa do sistema complemento humano. **Autores:** Silva LB, Hauk P, Monaris D, Morais ZM, Abreu PAE, Vasconcellos AS, Barbosa AS.

▪ **XV Reunião Científica Anual do Instituto Butantan**

Local: Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

Data: 04 a 06/12/13 **Apresentação:** Pôster

- a. **Título do Trabalho:** Immunogenic potencial of leptospiral flagellins in the development of a subunit vaccine against leptospirosis. **Autores:** Monaris D, Braga CJM, Morais ZM, Vasconcellos AS, Ferreira LC, Abreu PAE.
- b. **Título do Trabalho:** Cell display system for the expression of leptospiral lipoproteins on the surface of *E. coli*. **Autores:** Gotti TB, Monaris D, Spadafora-Ferreira MS, Souza GO, Morais ZM, Vasconcellos AS, Abreu PAE.

▪ **II Simpósio Interno da Pós Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses**

Local: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, São Paulo, SP, Brasil

Data: 21 e 22/11/2013 **Apresentação:** Oral/Pôster

5) CURSOS E ATIVIDADES DE EXTENSÃO

▪ **Curso de grandes endemias e doenças infecciosas negligenciadas na região Neotropical: “Doenças Negligenciadas na América Latina”**

Cátedra UNESCO Memorial da América Latina (UNESP / USP / UNICAMP)

Data: 23/03/2011 a 25/05/2011

Local: Memorial da América Latina / SP

Observação: Aluna selecionada para o curso regular e apresentação de monografia com tema sugerido pelo catedrático Prof. Dr. Erney Felício Plessmann de Camargo, cujo tema desenvolvido foi “A peste bubônica no século XIII e XIX no mundo: Grandes epidemias, a situação no Brasil atual”.

▪ **Workshop: Protein Purification Day 2012**

Data: 17/08/2012 **Local:** GE Helthcare Life Sciences, São Paulo, Brasil

▪ **FEBRACE 2012 – Feira de Ciências e Engenharia**

Data: 13 a 15/03/2012 **Local:** Escola Politécnica da USP, São Paulo, Brasil

Obs.: Participante na qualidade de Avaliadora de projetos.

- **FEBRACE 2013 – Feira de Ciências e Engenharia**

Data: 12 a 14/03/2013 **Local:** Escola Politécnica da USP, São Paulo, Brasil

Obs.: Participante na qualidade de Avaliadora de projetos.

- **FEBRACE 2013/2014 – Feira de Ciências e Engenharia**

Local: Escola Politécnica da USP, São Paulo, Brasil

Obs.: Participante na qualidade de pré-avaliadora de projetos científicos no período de novembro e dezembro de 2013 da feira que será realizada de 18 a 22 de março de 2014.

- **Ciclo de Seminários Científicos do Laboratório de Bacteriologia do IBu**

Palestrante do seminário “Clonagem, expressão e purificação de flagelinas recombinantes de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni”.

Data: 23/04/2012 **Carga horária:** 1 hora **Local:** Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

- **Ciclo de Seminários Científicos do Laboratório de Bacteriologia do IBu**

Período: 01/08/12 a 30/11/12 **Carga horária:** 20 horas

Local: IBu - Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

Obs.: Participante responsável pela programação e organização do evento, semanal.

- **I Curso de Biossegurança do Laboratório de Bacteriologia do IBu**

Período: 10 a 12/12/12 **Carga horária:** 06 horas

Local: IBu - Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

- **II Curso de Biossegurança do Laboratório de Bacteriologia do IBu**

Período: 30/04/2013 – 07/08/2013 – 18/11/2013 **Carga horária:** 06 horas

Local: IBu - Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

- **Workshop Uso e Cuidados Éticos em Animais de Laboratório do IBu**

Período: 30/10/2013 **Carga horária:** 06 horas

Local: IBu - Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

6) DISCIPLINAS CURSADAS

- **Bioestatística** (Faculdade de Saúde Pública - USP).
- **Metodologia do Ensino Superior** (Faculdade de Educação - USP).

- **Preparação Pedagógica PAE** (Faculdade de Educação - USP).
- **Técnicas Sorológicas e de Biologia Molecular no Diagnóstico de Agentes Infecciosos** (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP).

Créditos obtidos, totalizando 100% dos mínimos exigidos para depósito de tese.

REFERÊNCIAS¹

- ADLER B. Pathogenesis of leptospirosis: cellular and molecular aspects. **Vet Microbiol.** 2014 Aug 27;172(3-4):353-8. 2014.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signaling. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, n. 7, p. 499-511, 2004.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll Like receptor: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nat. Immunol.**, v. 2, n. 8, p. 675-680, 2001.
- ANDERSEN-NISSEN, E.; SMITH, K. D.; BONNEAU, R.; STRONG, R. K.; ADEREM, A. A conserved surface on Toll-like receptor 5 recognizes bacterial flagellin. **JEM**, v. 204, n. 2, p. 393-403, 2007.c 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, p. 757-771, 2003.
- BERGMANN, S.; ROHDE, M.; CHHATWAL, G. S.; HAMMERSCHMIDT, S. Alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. **Mol. Microbiol.**, v. 40, n. 6, p. 1273-1287, 2001. Ruby, J.D., Li, H., Kuramitsu, H., Norris, S.J., Goldstein, S.F. 2011.
- BRAGA, C. J. M.; MASSIS, L. M.; ALENCAR, B. C. G.; RODRIGUES, M. M.; SBROGIO-ALMEIDA; FERREIRA, L. C. S. Cytotoxic T cell adjuvant effects of three *Salmonella enterica* flagellin. **Braz. J. Microbio.**, v. 39, p. 44-49, 2008.
- BRANGER, C.; CHATRENET, B.; GAUVRIT, A.; AVIAT, F.; AUBERT, A.; BACH, J. M.; ANDRÉ-FONTAINE, G. Protection against *Leptospira interrogans sensu lato* challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. **Infection. Immun.**, v. 73, n. 7, p. 4062-4069, 2005.
- BRANGER, C.; SONRIER, C.; CHATRENET, B.; KLONJKOWSKI, B.; RUVOEN-CLOUET, N.; AUBERT, A.; ANDRÉ-FONTAINE, G.; ELOIT, M. Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. **Infection. Immun.**, v. 69, n. 11, p. 6831-6838, 2001.
- BRENNER, D. J.; KAUFMANN, A. F.; SULZER, K. R.; STEIGERWALT, A. G.; ROGER, F.; WEYANT, R. S. Further determination of DNA relatedness between serogroups and

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

serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp nov and four new *Leptospira* genomospecies. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 49, p. 839-858, 1999.

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

BUTTLE, K.F., AND CHARON, N.W. Relationship of *Treponema denticola* periplasmic flagella to irregular cell morphology. **J Bacteriol** 179: 1628±1635. 1997.

CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M.; FRAGA, T. R.; SILVA, L. B.; MONARIS, D.; ABREU, P. A; STROBEL, S.; JÓZSI, M.; ISAAC, L.; BARBOSA, A. S. Leptospiral immunoglobulin-like roteins Interact with uman Complement egulators Factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. **J Infect Dis.**, v. 205, n.6, p. 995-1004, 2012.

CHARON, N. W.; GOLDSTEIN, S. F. Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes. **Annu Rev Genet.**, v. 36, p. 47-73, 2002.

DELLAGOSTIN OA, GRASSMANN AA, HARTWIG DD, FÉLIX SR, DA SILVA ÉF, MCBRIDE AJ. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Hum Vaccin.** Nov;7(11):1215-24. 2011

EVANGELISTA KV, COBURN J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future Microbiol.** Sep;5(9):1413-25. 2010.

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

FAISAL, S. M.; YAN, W.; CHEN, C. S.; PALANIAPPAN, R. U.; MCDONOUGH, S. P.; CHANG, Y. F. Evaluation of protective immunity of *Leptospira* immunoglobulin like protein A (LigA) DNA vaccine against challenge in hamsters. **Vaccine**, v. 10, n. 2, p. 277-287, 2008.

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

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

FORSTER KM, HARTWIG DD, SEIXAS FK, BACELO KL, AMARAL M, HARTLEBEN CP, DELLAGOSTIN OA. A conserved region of leptospiral immunoglobulin-like A and B proteins as a DNA vaccine elicits a prophylactic immune response against leptospirosis. **Clin Vaccine Immunol.** 20(5):725-31. 2013.

FRASER, C.M., NORRIS, S.J., WEINSTOCK, C.M., WHITE, O., SUTTON, G.G., DODSON, R., Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. **Science** 281: 375-388. 1998.

HAAKE, D. A.; MAZEL, M. K.; MCCOY, A. M.; MILWARD, F.; CHAO, G.; MATSUNAGA, J.; WAGAR, E. A. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. **Infect Immun.**, v. 67, p. 6572-6582, 1999.

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

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

JANEWAY, J. R. C. A.; MEDZHITOV, R. Innate Immune induction of the adaptive immune response. Cold Spring Harb. Symp. **Quant. Biol.**, v. 64, p. 429-435, 2002.

JEFFERY, C.J. Moonlighting proteins. **Trends Biochem Sci.**, v. 24, n. 1, p. 8-11, 1999.

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

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

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

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

LEHMANN JS, MATTHIAS MA, VINETZ JM, FOUTS DE. Leptospiral pathogenomics. **Pathogens**. 3(2):280-308. 2014.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clin Microbiol Rev.**, v. 14, n. 2, p. 296-326, 2001.

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

MATSUNAGA, J.; BAROCCHI, M. A.; CRODA, J.; YOUNG, T. A.; SANCHEZ, Y.; SIQUEIRA, I.; BOLIN, C. A.; REIS, M. G.; RILEY, L. W.; HAAKE, D. A.; KO, A. I.

Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Mol. Microbiol.**, v. 49, n. 4, p. 929-945, 2003.

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

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

PALANIAPPAN, R. U.; CHANG, Y. F.; JUSUF, S. S.; ARTIUSHIN, S.; TIMONEY, J. F.; MCDONOUGH, S. P.; BARR, S. C.; DIVERS, T. J.; SIMPSON, K. W.; MCDONOUGH, P. L.; MOHAMMED, H. O. Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 11, p. 5924-5930, 2002.

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

PICARDEAU M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Med Mal Infect.** 2013 Jan;43(1):1-9.

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

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

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

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

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

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **PNAS.**, v. 74, p. 5463-5467, 1997.

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

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

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

SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS). **Leptospirose**. 2013. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br>>. Acesso em: 15 abr. 2013.

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

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

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

VERMA R, KHANNA P, CHAWLA S. Whole-cell inactivated leptospirosis vaccine: future prospects. **Hum Vaccin Immunother**. Apr;9(4):763-5. 2013.

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

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

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

APÊNDICE

Apêndice A – Soluções e meios de cultura

Solução ou Meio	Composição
EMJH modificado	EMJH base (0,23%); 10% soro de coelho inativado; 0,015% L-asparagina; 0,0015% piruvato de sódio; 0,001% CaCl ₂ ; 0,001% MgCl ₂ ; 0,03% peptona e 0,02% extrato de carne.
Meio LB	1% triptona; 0,5% extrato de levedura e 1% NaCl
EDTA	0,5M pH 8,0
NaCl	5M
SDS	10% SDS
TAE	0,04 MTris-acetato e 1mM EDTA pH 8,0
Persulfato de amônio	10%
Tris-HCl	1,5M pH 8,8
Tris- HCl	1M pH 8,0
Tampão de transferência	39mM Glicina; 48mM Tris base; 0,037% SDS e 20% Etanol
Tampão Citrato-Fosfato	0,1 MCitrato de sódio e 0,2M Fosfato de sódio
Tampão A (purificação)	PBS, 8 M Uréia, 5 mM imidazol e pH 7,4
PBS	1,37M NaCl; 0,027M KCl; 0,10M Na ₂ HPO ₄ e 0,017M KH ₂ PO ₄
Solução Descorante SDS-PAGE	30% Etanol e 10% Ácido acético
Solução Secante SDS-PAGE	50% Etanol e 10% Ácido acético
Corante SDS-PAGE	0,25% Comassie Blue R250, 45% Etanol e 10% Ácido acético
Acrilamida 30%	29% Acrilamida e 1% Bisacrilamida
Níquel	300mM Níquel
6X Tampão de aplicação (para gel de agarose)	0,25% azul de bromofenol; 0,25% xileno cianol e 30% Glicerol
5X Tampão de aplicação (para SDS-PAGE)	50 mMTris pH 6,8; 10% SDS, 0,5% Azul bromofenol; 50% Glicerol e 7% β-mercaptoetanol
λ-Hind III	200ng/ml
Ampicilina	100µg/µl

Apêndice B – Cálculo DL₅₀ (ensaio piloto)

Diluição	Número de leptospiros (N)	S	M	Frequências acumuladas			% cumulativa de mortes $d=c/(b+c)$
				S(b)	M(c)	Total (b+c)	
Sem	10 ⁷	1	4	1	32	33	96,96
10 ⁻¹	10 ⁶	2	8	3	28	31	90,32
10 ⁻²	10 ⁵	3	2	6	20	26	76,92
10 ⁻³	10 ⁴	1	4	7	18	25	72,00
10 ⁻⁴	10 ³	0	5	7	14	21	66,67
10 ⁻⁵	10 ²	1	4	8	9	17	52,94
10 ⁻⁶	10	1	4	9	5	14	35,71

N = número de leptospiros por dose

S = número de animais sobreviventes à infecção por *L. interrogans* Copenhageni

M = número de animais mortos pela infecção por *L. interrogans* Copenhageni

Os animais foram inoculados com 200µl da cultura (2x10⁵leptospiros/animal).

Cálculo da distância proporcional (D) = $\frac{50\% - A}{(B - A)}$

Sendo:

D= distância entre o ponto 50% e a cumulativa de morte imediatamente abaixo deste.

A= % cumulativa de mortes imediatamente abaixo do ponto 50%

B= % cumulativa de mortes imediatamente acima do ponto 50%

$$D = \frac{(50 - 35,71)}{(65 - 35,71)} = 0,48^*$$

* Cálculo considerando o grupo mais próximo de mortes cumulativas de 50% (marcada em amarelo).

Cálculo da DL₅₀ em número de leptospiros: $\text{Log}_{10}(\text{DL}_{50}) = \log_{10}(a) + [D \times \log_{10}(d)]$

Sendo:

DL₅₀= número de leptospiros que promove morte de 50% dos animais infectados

a= número de leptospiros correspondente ao ponto imediatamente abaixo do 50%

D= distância proporcional

d= fator de diluição

$$\text{Log}_{10}(\text{DL}_{50}) = \log_{10}(10) + [0,48 \times \log_{10}(10)] = 1,48$$

(antilog) DL₅₀ = ~30 leptospiros

Apêndice C – Cálculo DL₅₀ (flagelinas de leptospira como adjuvante)

Diluição	Número de leptospiras (N)	S	M	Frequências acumuladas			% cumulativa de mortes $d=c/(b+c)$
				S(b)	M(c)	Total (b+c)	
Sem	10 ⁷	2	3	2	12	14	85,71
10 ⁻¹	10 ⁶	2	3	4	9	13	69,23
10 ⁻²	10 ⁵	4	1	8	6	14	42,85
10 ⁻³	10 ⁴	3	2	11	5	16	31,25
10 ⁻⁴	10 ³	3	2	14	3	17	17,64
10 ⁻⁵	10 ²	4	1	18	1	19	5,26

N = número de leptospiras por dose

S = número de animais sobreviventes à infecção por *L. interrogans* Copenhageni

M = número de animais mortos pela infecção por *L. interrogans* Copenhageni

Os animais foram inoculados com 200µl da cultura (2x10⁵leptospiras/animal).

Cálculo da distância proporcional (D) = $\frac{50\% - A}{(B - A)}$

Sendo:

D= distância entre o ponto 50% e a cumulativa de morte imediatamente abaixo deste.

A= % cumulativa de mortes imediatamente abaixo do ponto 50%

B= % cumulativa de mortes imediatamente acima do ponto 50%

$$D = \frac{(50,00 - 31,25)}{(69,23 - 31,25)} = 0,48^*$$

* Cálculo considerando o grupo mais próximo de mortes cumulativas de 50% (marcada em amarelo).

Cálculo da DL₅₀ em número de leptospiras: $\text{Log}_{10}(\text{DL}_{50}) = \text{log}_{10}(a) + [D \times \text{log}_{10}(d)]$

Sendo:

DL₅₀= número de leptospiras que promove morte de 50% dos animais infectados

a= número de leptospiras correspondente ao ponto imediatamente abaixo do 50%

D= distância proporcional

d= fator de diluição

$$\text{Log}_{10}(\text{DL}_{50}) = \text{log}_{10}(10^4) + [0,48 \times \text{log}_{10}(10)] = 4,48$$

$$(\text{antilog}) \text{DL}_{50} = \sim 3 \times 10^4 \text{ leptospiras}$$