LUDMILA BEZERRA DA SILVA

Interação da proteína de superfície LcpA de *Leptospira* com Fator H, principal regulador solúvel da via alternativa do sistema complemento humano

São Paulo

2013

LUDMILA BEZERRA DA SILVA

Interação da proteína de superfície LcpA de *Leptospira* com Fator H, principal regulador solúvel da via alternativa do sistema complemento humano

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:
Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:
Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientadora:
Profa. Dra. Angela Silva Barbosa

São Paulo

2013

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.2808 Silva, Ludmila Bezerra da
FMVZ Interação da proteína de superfície LcpA de *Leptospira* com fator H, principal regulador solúvel da via alternativa do sistema complemento humano / Ludmila Bezerra da Silva. -- 2013.
75 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Angela Silva Barbosa.

1. *Leptospira*. 2. Sistema complemento 3. Evasão imune. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Interação da proteína de superfície LcpA de Leptospira com Fator H, principal regulador solúvel da via alternativa do sistema complemento humano", protocolado sob o nº 2994/2013, utilizando 200 (duzentos) hamsters, sob a responsabilidade da Angela Silva Barbosa (Instituto Butantan), 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 15/5/2013.

We certify that the Research "Interaction of the surfasse protein LcpA from Leptospira", protocol number 2994/2013, utilizing 200 (two hundred) hamsters, under the responsibility Angela Silva Barbosa (Instituto Butantan), 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 5/15/2013.

São Paulo, 20 de maio de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SILVA, Ludmila Bezerra da

Título: Interação da proteína de superfície LcpA de *Leptospira* com Fator H, principal regulador solúvel da via alternativa do sistema complemento humano

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data:___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Dedico a Deus e a minha família
por toda força e iluminação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus por toda oportunidade, inspiração e força por esses quatro anos trabalhando com pesquisa e cada dia que passa me apaixono mais ainda pelo que faço.

Á minha orientadora e amiga Dra. Angela Silva Barbosa, pelo exemplo de paciência, dedicação, comprometimento e pela confiança nesses anos de trabalho. Agradeço por todo ensinamento sob sua orientação, aprendi muito e vou continuar aprendendo. Obrigada por tudo.

Á Dra. Patrícia A. E. Abreu de Aniz, pelo exemplo de dedicação e comprometimento com a pesquisa. Agradeço pela oportunidade de trabalhar com você, aprendi muito.

Á minha família, meus pais Nilson e Angelita, minhas irmãs Nadia e Larissa e meu sobrinho Cassius. Amo vocês. Agradeço por toda compreensão e apoio para realizar um sonho, com vocês do meu lado se tornou possível.

Ás minhas queridas amigas Denize Monaris e Ligia Maria Piassi Ricardi vocês foram essenciais todos esses anos é um privilégio ter vocês como amigas. Agradeço pela paciência, companhia, incentivo e por ter pessoas tão iluminada na minha vida.

Á meus amigos e companheiros de laboratório Lídia Miragaia, Demétria Fazolo, Tatiana Gotti, Larissa Matos, Amane Paldês, Matilde Costa, Andressa Caravelli, Francielli Vasconcelos, Afonso Abreu, Kamila Nunes, Fernanda Andrade, Claudia Trigo, Cris Souza e Cris Moda. Agradeço pela convivência com pessoas tão especiais e que fizeram diferença na minha vida.

Aos pesquisadores e funcionários do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan. Agradeço pela convivência com pessoas dedicadas e comprometidas com que fazem.

Á Prof. Dra. Lourdes Isaac, Tatiana Fraga, Mónica Castiblanco, Adriana Martinez, Marlene e todos os alunos do Laboratório de Sistema Complemento da USP. Agradeço pelos ensinamentos e por me ajudarem no que fosse preciso.

Ao Prof. Dr. Silvio Vasconcellos, Zenaide e Gisele do Laboratório de Zoonoses Bacterianas, por toda auxílio prestado.

Á todos os pesquisadores, funcionários e alunos do Departamento Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS)

Á CAPESP e a FAPESP pelo apoio financeiro.

"No momento em que nos comprometemos, a providência divina também se põe em movimento. Todo um fluir de acontecimentos surge ao nosso favor. Como resultado da atitude, seguem todas as formas imprevistas de coincidências, encontros e ajuda que nenhum ser humano jamais poderia ter sonhado encontrar. Qualquer coisa que você possa fazer ou sonhar, você pode começar. A coragem contém em si mesma, o poder, o gênio e a magia".

Goethe

Confie ao senhor a tua sorte,
Espera nele, e ele agirá.
(Sl. 37, 5)

RESUMO

SILVA, L. B. da. **Interação da proteína de superfície LcpA de *Leptospira* com Fator H, principal regulador solúvel da via alternativa do sistema complemento humano**. [Interaction of the surface protein LcpA from *Leptospira* with Factor H, the main soluble regulator of the alternative pathway of human complement system] 2013.75.f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial, com maior incidência nas regiões tropicais. As bactérias que causam a doença pertencem ao gênero *Leptospira*, família *Leptospiracea* e ordem *Spirochaetales*. A leptospirose é mantida na natureza pela colonização persistente dos túbulos renais proximais dos animais portadores. Uma estratégia adotada por estas espiroquetas para sobreviver à ação do sistema imune inato do hospedeiro é a capacidade que possuem de interagir com os reguladores do sistema complemento Fator H (FH) e proteína de ligação a C4b (C4BP). O sistema complemento é um componente vital da imunidade inata, uma vez que desempenha um papel crucial na defesa do hospedeiro, particularmente contra bactérias Gram-negativas. Dados recentes gerados por nosso grupo mostraram que C4BP interage com a proteína de superfície LcpA de *Leptospira.* Com cerca de 20 kDa, essa proteína é capaz de se ligar a C4BP purificado ou solúvel no soro de maneira dose-dependente. Uma vez ligado à proteína, C4BP permanece funcional agindo como co-fator de Fator I na clivagem de C4b. O presente estudo teve como principal objetivo avaliar a interação da proteína LcpA com FH humano, principal regulador solúvel da via alternativa do sistema complemento. A proteína LcpA e suas porções N-Terminal, Intermediária e C-Terminal recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade a metal a partir da fração insolúvel. A interação dessas proteínas com FH foi avaliada por dois métodos distintos: ELISA e *Western blot* com *overlay*. Os resultados indicaram que a porção C-Terminal da proteína LcpA é responsável pela interação com FH. Curiosamente, C4BP também se liga a esse domínio da proteína. Uma vez que esses dois reguladores solúveis do sistema complemento interagem com o mesmo segmento da LcpA, realizaram-se, a seguir, ensaios de competição com o objetivo de avaliar se ambos compartilhariam os mesmos sítios de interação. Os dados mostraram que FH e C4BP devem se ligar a sequências distintas desta proteína. Com o objetivo de se avaliar a funcionalidade de FH ligado à LcpA, realizou-se um ensaio para investigar sua atividade de co-fator de Fator I na clivagem de C3b. Produtos de degradação de 46 kDa e 43 kDa da cadeia α' de C3b foram detectados, indicando que FH

permanece funcional. Em se tratando de uma proteína com funções relacionadas ao processo de evasão ao sistema imune inato, decidiu-se realizar ensaios de desafio em modelo de hamster com a finalidade de se avaliar seu potencial imunoprotetor. Os três ensaios realizados indicaram que a proteína não é capaz de conferir proteção. Os ensaios de ELISA visando à avaliação dos títulos de anticorpos mostraram que LcpA não é imunogênica, fato que explica os resultados dos ensaios de desafio observados. Portanto, embora interaja com moléculas do hospedeiro e pareça contribuir para o processo de evasão ao sistema imune inato, essa proteína de membrana não se mostrou promissora como candidato vacinal contra leptospirose.

Palavras-chave: *Leptospira*. Sistema Complemento. Evasão imune.

ABSTRACT

SILVA, L. B. da. **Interaction of the surface protein LcpA from *Leptospira* with Factor H, the main soluble regulator of the alternative pathway of human complement system.** [Interação da proteína de superfície LcpA de *Leptospira* com Fator H, principal regulador solúvel da via alternativa do sistema complemento humano] 2013. 75.f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Leptospirosis is a zoonosis of global distribution, with higher incidence in tropical areas. The bacteria that cause the disease belong to the genus *Leptospira*, family *Leptospiracea* and order *Spirochaetales*. Leptospirosis is maintained in nature by persistent colonization of proximal renal tubules of carrier animals. One strategy adopted by these spirochetes to escape from host´s innate immune system is the ability to interact with the complement regulators Factor H (FH) and C4b Binding Protein (C4BP). The complement system is a vital component of the innate immune system, being crucial for host´s defense, particularly against Gram-negative bacteria. According to our recent published data, C4BP interacts with the leptospiral surface protein LcpA. This 20 kDa outer membrane protein binds both purified and serum C4BP in a dose-dependent manner. Once bound, C4BP remains functional acting as a cofactor for Factor I in the cleavage of C4b. In the present study we evaluated the interaction of LcpA with human FH, the main soluble regulator of the alternative pathway of complement. The intact protein as well as its N-terminal, intermediate and C-terminal portions were purified by metal-affinity chromatography from the insoluble pellet. The interaction of these proteins with FH was evaluated by two distinct methods: ELISA and Western blot overlay. Our results indicate that the C-terminal domain of LcpA mediates interaction with FH, and also with C4BP. Since both complement regulators interact with the same fragment of LcpA, we next performed competition assays to assess if they would share binding sites. According to our data, FH and C4BP have distinct binding sites on LcpA. Cofactor activity of FH bound to immobilized LcpA was confirmed by detecting the C3b α' chain cleavage fragments of 46 and 43 kDa upon incubation with Factor I, thus indicating that it remains functionally active. Given the LcpA´s role in host´s innate immune evasion, we also evaluated its vaccine potential in a hamster model. Data from three challenge assays indicated that the protein can not afford protection. Low ELISA antibody titers of hamsters immunized with LcpA were observed, which strongly suggests that this protein is not immunogenic. In conclusion, LcpA interacts with host´s molecules and seems to contribute to the bacterial immune evasion.

Nevertheless, this outer membrane protein is not a promising vaccine candidate against leptospirosis.

Keywords: *Leptospira*. Complement System. Immune evasion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae.....20
Figura 2- Ativação do sistema complemento.....26
Figura 3- Inibição da ativação da via alternativa por Fator H (FH).....27
Figura 4- Inibição da ativação da via clássica por C4BP.....27
Figura 5- Representação esquemática do Fator H.....30
Figura 6- Representação esquemática do C4BP.....31
Figura 7- Representação esquemática do ensaio de imunoproteção com hamster.....42
Figura 8- Esquema do processo de expressão e purificação de proteínas recombinantes.....43
Figura 9- Análise da expressão e das frações de eluição da proteína LcpA por SDS-PAGE 15%.....44
Figura 10- Análise da expressão e das frações de eluição da proteína N-Terminal (LcpA) por SDS-PAGE 15%.....45
Figura 11- Análise da expressão e das frações de eluição da proteína Intermediária (LcpA) por SDS-PAGE 15%.....45
Figura 12- Análise da expressão e das frações de eluição da proteína C-Terminal (LcpA) por SDS-PAGE 15%.....46
Figura 13- (A) Mapa dos domínios da proteína LcpA. (B) Proteínas recombinantes purificadas.....46
Figura 14- Análise da interação das proteínas LcpA, N-Terminal (LcpA), Intermediária (LcpA) e C-Terminal (LcpA) com os reguladores negativos do sistema complemento FH e C4BP por ELISA.....48
Figura 15- Análise da interação de FH e C4BP com as proteínas recombinantes de *Leptospira* (LcpA intacta e fragmentos) por *Western blot* com *overlay*.....49
Figura 16- Análise de competição entre FH e C4BP por sítios de interação com a proteína LcpA.....50
Figura 17- Análise da atividade de FH ligado à LcpA como co-fator de FI na clivagem de C3b.....52
Figura 18- Porcentagem de hamsters sobreviventes 21 dias após desafio com cultura de *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm no primeiro desafio.....54

Figura 19- Porcentagem de hamsters sobreviventes 21 dias após desafio com cultura de *L.interrogans* sorovar Copenhageni estirpe Fiocruz L1-130 no segundo desafio.....55
Figura 20- Porcentagem de hamsters sobreviventes 21 dias após desafio com cultura de *L.interrogans* sorovar Copenhageni estirpe Fiocruz L1-130 no terceiro desafio.....56
Figura 21- Macerado de rim em meio semissólido de *Fletcher*.....57
Figura 22- Curva de titulação de IgG total obtida por ELISA utilizando os soros da primeira sangria.....59
Figura 23- Curva de titulação de IgG total obtida por ELISA utilizando os soros da segunda sangria.....60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Espécies de *Leptospira*.....21
Quadro 2- Descrição das soluções utilizadas nos diversos procedimentos.....33
Quadro 3- Proteínas recombinantes utilizadas.....36
Quadro 4- Preparação das doses para o ensaio de imunoproteção.....41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Proteção conferida pela imunização de hamsters desafiados com leptospiras.....57
Tabela 2- Cultura do macerado de rim dos animais sobreviventes ao desafio.....58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	microgramas
µL	microlitros
Abs	Absorbância
Amp	Ampicilina
BSA	Albumina sérica bovina
ELISA	*Enzyme linked immunosorbent assay* (ensaio de adsorção imuno-enzimático)
EMJH	*Ellinghausen McCullough Johnson Harris* (meio de cultura padrão para leptospiras)
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactosídeo
kDa	kilo Dalton
LB	Luria Bertani (meio de cultura para *E.coli*)
LB-amp	Luria Bertani com ampicilina
M	molar
min	minutos
mL	mililitros
mM	milimolar
ng	nanograma
nm	nanômetro
OPD	o-dihidrocloreto de fenilenodiamina
pb	pares de bases
PBS	*Phosphate Buffered Saline* (tampão fosfato)
PBS-T	Tampão fosfato contendo *Tween* 20
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonilo
SDS	Docecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
TEMED	Tetrametiletilenodiamina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 20
1.1 BACTÉRIA *LEPTOSPIRA* 20
1.2 LEPTOSPIROSE 21
1.3 COLONIZAÇÃO DO HOSPEDEIRO POR LEPTOSPIRAS PATOGÊNICAS 23
1.3.1 O Sistema Complemento E A Interação Com Patógenos 24
1.3.2 Regulação Do Sistema Complemento 26
1.3.3 Mecanismo De Evasão Ao Sistema Complemento Apresentado Por Leptospiras Patogênicas 28
1.3.4 Fator H 29
1.3.5 C4b Binding Protein (C4BP) 30
2 OBJETIVOS 32
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 32
3 MATERIAIS E MÉTODOS 33
3.1 SOLUÇÕES E REAGENTES UTILIZADOS 33
3.2 SOROS, PROTEÍNAS E ANTICORPOS COMERCIAIS 35
3.3 PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA 35
3.4 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS 36
3.5 ELETROFORESE EM GEL SDS-PAGE 37
3.6 *WESTERN BLOT* COM *OVERLAY* 38
3.7 ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) 38
3.7.1 ENSAIO DE INTERAÇÃO 38
3.7.2 ENSAIO DE COMPETIÇÃO 39
3.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE CO-FATOR 39
3.9 ENSAIOS DE IMUNOPROTEÇÃO EM MODELO ANIMAL 40
3.9.1 Título de anticorpos específicos 42
4 RESULTADOS 43
4.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES LcpA, N-TERMINAL (LcpA), INTERMEDIÁRIA (LcpA) E C-TERMINAL (LcpA). 43
4.2 INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES LcpA, N-TERMINAL (LcpA), INTERMEDIÁRIA (LcpA) E C-TERMINAL (LcpA) COM FH E C4BP. 47
4.2.1 Interação por ELISA 47

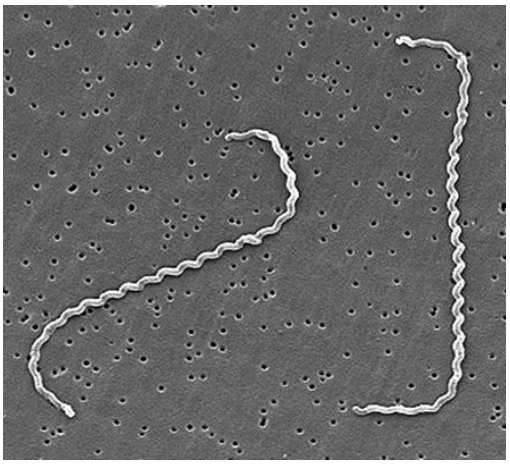
4.2.2 Western blot com overlay 49
4.3 ENSAIOS DE COMPETIÇÃO 50
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE CO-FATOR DE FH LIGADO À PROTEÍNA LCPA 51
4.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOPROTETOR DA PROTEÍNA LCPA EM MODELO ANIMAL 53
4.5.1 Avaliação da resposta humoral 58
5 DISCUSSÃO 61
6 CONCLUSÕES 65
REFERÊNCIAS 66
APÊNDICE 71

1 INTRODUÇÃO

1.1 BACTÉRIA *LEPTOSPIRA*

As leptospiras são bactérias espiroquetas aeróbias obrigatórias com aproximadamente 0,1 µm de largura e 6 a 20 µm de comprimento (Figura 1). Apresentam extremidades em forma de gancho. Possuem dois flagelos localizados no espaço periplasmático que conferem movimentos de rotação e translação (LEVETT, 2001). São capazes de formar biofilmes, o que as ajuda a sobreviver em habitats ambientais e colonizar hospedeiros (RISTOW et al., 2008). Apresentam crescimento ótimo in vitro em temperaturas de 28 - 30º C.

Figura 1 - *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae



Legenda: Microscopia eletrônica de varredura sobre membrana 0,2 µm.
Fonte: (LEVETT, 2001).

As bactérias que causam leptospirose pertencem ao gênero *Leptospira*, família *Leptospiracea* e ordem *Spirochaetales* (FAINE et al., 1999). O gênero *Leptospira* foi primeiramente dividido nas espécies *L. biflexa* e *L. interrogans* pela classificação fenotípica. *L. biflexa* reunia os sorovares saprófitos, de vida livre, e *L. interrogans* os patogênicos (LEVETT, 2001). Os sorovares antigenicamente relacionados são agrupados em sorogupos (BHARTI et al., 2003). Atualmente, as leptospiras são classificadas em mais de 250 sorovares considerando a heterogeneidade estrutural dos carboidratos do LPS (lipopolissacarídeo) da

membrana da bactéria (FAINE et al., 1999). Em 1987 foi proposta uma classificação genotípica para a determinação das espécies de *Leptospira* com base em experimentos de hibridação de DNA. Atualmente estão catalogadas 17 espécies (Quadro 1).

Quadro 1 – Espécies de *Leptospira*

Patogenicidade	**Espécie genômica**
Não-patogênicas	*L. biflexa*
	L. wolbachii
	Geno-espécie 2*
Patogênicas	*L. interrogans*
	L. borgpetersenii
	L. noguchi
	L. fainei
	L. inadai
	L. kirshneri
	L. santarosai
	L. weilii
	L. alexandrei
	L. meyeri
	Geno-espécie 1*
	Geno-espécie 4*
	Geno-espécie 5*

Nota: *****As espécies genômicas 1,2,4 e 5 ainda não possuem denominação
Fonte: (Adaptado de BHARTI et al., 2003).

1.2 LEPTOSPIROSE

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial, com maior incidência nas regiões tropicais. A doença é mantida pela colonização persistente dos túbulos renais proximais dos animais portadores (BHARTI et al., 2003). No Brasil é uma doença endêmica, mas nos períodos chuvosos se torna epidêmica nas capitais e regiões metropolitanas, devido às condições inadequadas de saneamento básico e aumento da infestação de roedores. (BRASIL, 2005). As leptospiras podem sobreviver semanas e até meses em solo úmido e

água. A agregação de células e a formação de biofilme podem contribuir para que sobrevivam fora de seu hospedeiro (KO et al., 2009).

A infecção humana ocorre principalmente através do contato direto ou indireto com a urina de animais infectados (LEVETT, 2001). As leptospiras entram no hospedeiro por abrasões na pele ou por membranas mucosas e, devido à sua grande capacidade de locomoção e invasão, rapidamente se espalham pelo organismo atingindo vários órgãos (FAINE et al., 1999). A doença humana pode variar em termos de gravidade de acordo com o sorotipo de *Leptospira* infectante, idade, condições de saúde e sistema imunológico do indivíduo (ADLER et al., 2010). Na maioria dos casos, as manifestações clínicas são brandas e grande parte dos pacientes não chega a procurar assistência médica. Entretanto, sintomas graves incluindo febre, dor de cabeça, mialgias, dores abdominais, icterícia, complicações renais e hemorragias pulmonares ocorrem em uma proporção menor das infecções por *Leptospira* podendo levar o paciente a óbito. A apresentação clínica da doença é bifásica: a fase aguda ou septicêmica dura aproximadamente uma semana e precede a fase imune, caracterizada pela produção de anticorpos e excreção de leptospiras pela urina. Grande parte das complicações decorrentes da infecção associa-se à internalização das leptospiras nos tecidos durante a fase imune (LEVETT, 2001).

O diagnóstico da doença nem sempre é simples, pois os sintomas clínicos assemelham-se aos de outras doenças como dengue e gripe na fase inicial. Há métodos laboratoriais que auxiliam na confirmação da suspeita clínica. Na fase aguda da doença, leptospiras podem ser isoladas de amostras de sangue, urina e líquido cerebro-espinhal. No entanto, a lenta taxa de crescimento dessas bactérias leva a resultados retrospectivos. A reação da polimerase em cadeia (PCR) é um método bastante sensível, mas ainda requer padronização para ser implementado no diagnóstico de rotina. Na transição da fase aguda para a fase imune, testes de *ELISA* IgM e *dipstick* podem ser utilizados. Na fase imunue da doença, o teste de aglutinação microscópica (MAT), considerado “gold standard” pela Organização Mundial da Saúde é o mais indicado. Neste teste, diversas estirpes de leptospiras são usadas como antígenos. As amostras de soro de pacientes devem ser coletadas duas vezes com intervalo de duas semanas. Um aumento de quatro vezes ou mais nos títulos de anticorpos indica um resultado positivo. Dada à complexidade deste teste, seu uso restringe-se aos laboratórios de referência.

O tratamento da leptospirose é feito com antibióticos. No caso da doença leve, o tratamento do paciente é feito com 100 mg de doxiciclina duas vezes por dia durante 7 dias. Nos casos graves aplica-se 1,5 x 10^6 U de penicilina G a cada 6 horas por 7 dias. Em caso de

insuficiência renal a terapia de suporte inclui hemodiálise e quando há hemorragias pulmonares realiza-se ventilação mecânica (FAINE et al.,1999; LEVETT et al., 2001; BHARTI et al., 2003).

Vacinas para prevenir a leptospirose humana estão disponíveis em alguns países como Cuba, Rússia e China. Essas vacinas são bacterinas e conferem proteção de curto prazo, havendo necessidade de vacinações repetidas para se manter a imunidade (BHARTI et al., 2003). Além disso, há relatos de efeitos colaterais indesejados. As desvantagens dessas vacinas ressaltam a necessidade de se desenvolver novas estratégias vacinais para a prevenção da leptospirose. Consequentemente, esforços têm se concentrado no desenvolvimento de vacinas de subunidade, utilizando proteínas de membrana externa (OMPs) e lipoproteínas recombinantes (WANG et al., 2007; DELLAGOSTIN et al., 2011).

As proteínas *Leptospiral immunoglobulin-like A and B* (LigA e LigB) são expressas durante a infecção no hospedeiro e a atenuação da virulência de estirpes patogênicas resulta na perda de sua expressão. Essas proteínas se ligam a uma variedade de componentes da matriz extracelular mediando assim a adesão das bactérias a células hospedeiras. Além disso, interagem com reguladores negativos do sistema complemento humano contribuindo para o processo de evasão ao sistema imune inato (CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012). Considerando o papel relevante das proteínas Ligs na leptospirose, elas têm sido testadas como candidatos vacinais e para fins de diagnóstico. A porção C-terminal da proteína LigA, confere proteção de 70 – 100% no modelo de hamster da doença (SILVA et al., 2007) e fragmentos das Ligs compõem um teste diagnóstico tipo *dipstick* (NABITY et al., 2012).

1.3 COLONIZAÇÃO DO HOSPEDEIRO POR LEPTOSPIRAS PATOGÊNICAS

As leptospiras colonizam os túbulos renais proximais dos animais reservatórios, onde são capazes de se replicar e persistir, sendo constantemente eliminadas na urina. A formação de biofilme por essas bactérias em células tubulares renais de hospedeiros pode contribuir para o processo de evasão imunue local (RISTOW et al., 2008).

Após a entrada no hospedeiro, leptospiras não-patogênicas são rapidamente eliminadas da corrente sanguínea, ao passo que as patogênicas são capazes de se espalhar quase que imediatamente se multiplicando e desencadeando uma resposta imune específica (FAINE et al., 1999; MERI et al., 2005). Isto se deve, basicamente, a dois mecanismos: a capacidade que

estes organismos apresentam de aderir a células eucariotas e a proteínas de matriz extracelular (TSUCHIMOTO et al., 1984; VINH et al., 1984; BALLARD et al., 1986; THOMAS et al., 1990; MERIEN et al., 2000; BARBOSA et al., 2006; CHOY et al., 2007; STEVENSON et al., 2007; HOKE et al., 2008; HAUK et al., 2008; ATZINGEN et al., 2008, VIEIRA et al., 2009, PINNE et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011; DOMINGOS et al., 2012) e a habilidade de escapar aos mecanismos de defesa do hospedeiro, dentre os quais os sistemas complemento e fagocítico (CINCO; BANFI, 1983; CINCO et al., 2002; MERI et al., 2005; ZIPFEL et al., 2007; BARBOSA et al., 2009; BARBOSA et al., 2010; CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012).

1.3.1 O sistema complemento e a interação com patógenos

O sistema complemento é um componente vital da imunidade inata, uma vez que desempenha um papel crucial na defesa do hospedeiro, particularmente contra bactérias Gram-negativas. Possui também importante papel na imunidade adaptativa, pois sua ativação modula respostas específicas a antígenos externos (MORGAN et al., 2005). Além dessas funções, fundamentais para a eliminação de patógenos invasores, o sistema complemento também está associado à resposta inflamatória e à cascata de coagulação (SCHNEIDER et al., 2007).

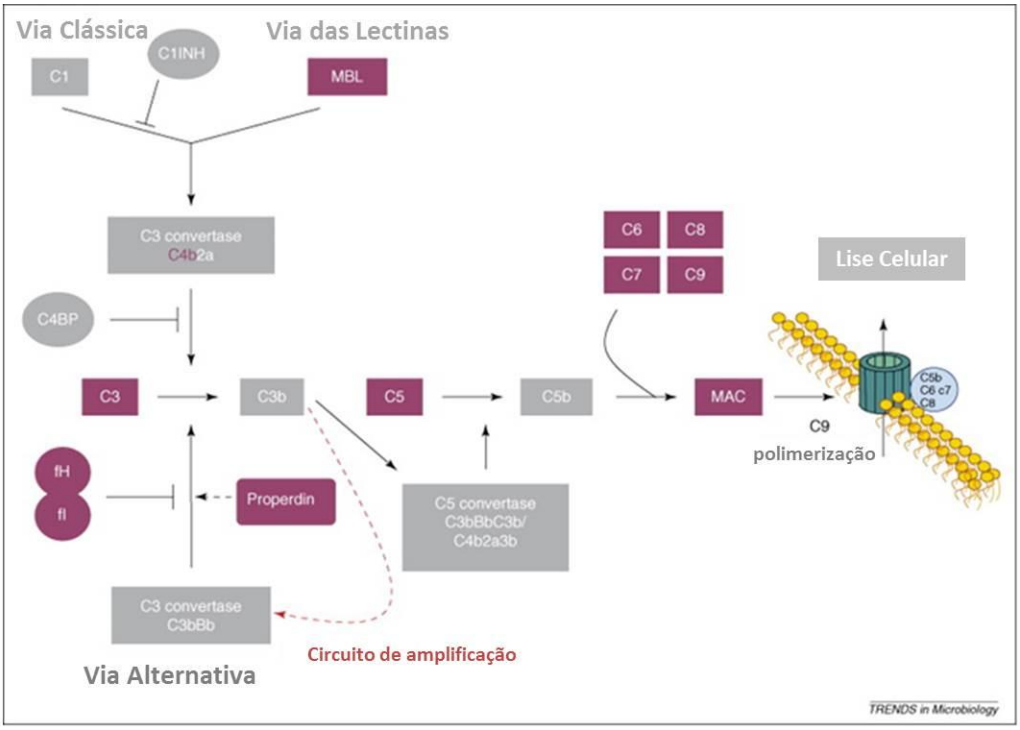
Composto por cerca de 35 proteínas que podem ser encontradas solúveis no plasma ou ligadas à superfície de certos tipos celulares, o sistema complemento pode ser ativado por três vias diferentes: via alternativa, via das lectinas e via clássica (Figura 2). Cada via envolve uma série de reações proteolíticas que resultam na ativação dos fatores em cascata. Todas as vias potencialmente levam à formação de uma C3 convertase, responsável pela clivagem de C3 com a consequente liberação de C3b (Figura 2). C3b, por sua vez, liga-se covalentemente à superfície de um patógeno acarretando sua eliminação por fagocitose ou lise.

A via clássica inicia-se após ligação e ativação do complexo C1, composto por C1q, C1r e C1s. C1q pode se ligar diretamente a várias bactérias por intermédio do lipídeo A, dos ácidos lipoteicóicos ou de outras estruturas, assim como a *clusters* de IgM ou de IgG ligados à superfície do patógeno. Quando C1q se liga, as proteases a ele associadas (C1r e C1s) tornam-se ativadas e o complexo C1 passa a clivar C4 e C2 gerando C4b2a, que passa a ter a função de uma C3 convertase. A via das lectinas inicia-se quando a lectina que se liga à manose

(MBL) ou ficolinas interage com carboidratos presentes na superfície do patógeno (Fujita et al., 2004). Essas moléculas formam complexos com a proteína MASP-2 (*MBL-associated serine protease-2*) que, por sua vez, passa a clivar C4 e C2, originando uma C3 convertase idêntica àquela produzida em decorrência da ativação da via clássica. C3b, por si só, também pode interagir diretamente com Fator B formando C3bBb, a C3 convertase da via alternativa. A molécula properdina, um regulador positivo da via alternativa, estabiliza C3bBb e prolonga sua atividade. Na superfície de patógenos, a via alternativa funciona como uma alça de amplificação, aumentando a produção de C3b gerado pelas outras duas vias (Figura 2).

C3b contribui para a eliminação de microrganismos de duas formas. É um componente essencial das convertases C4b2a3b e C3bBbC3b, que clivam C5 em C5a e C5b. O fragmento C5b adere à superfície celular e a ele ligam-se, sequencialmente, os componentes C6, C7, C8 e C9 formando o complexo de ataque à membrana (MAC) (Figura 2). Essa estrutura multi-protéica se insere na bicamada lipídica como um canal transmembrânico, favorecendo um desequilíbrio iônico que resultará na ruptura da membrana com consequente lise celular. C3b e iC3b (oriundo da clivagem de C3b) podem também ter a função de opsoninas, mediando a fagocitose via CR1 (*complement receptor-1*) ou via CR3/CR4 (*complement receptor-3/4*) respectivamente (EHLENBERGER; NUSSENZWEIG, 1977).

Figura 2- Ativação do Sistema Complemento

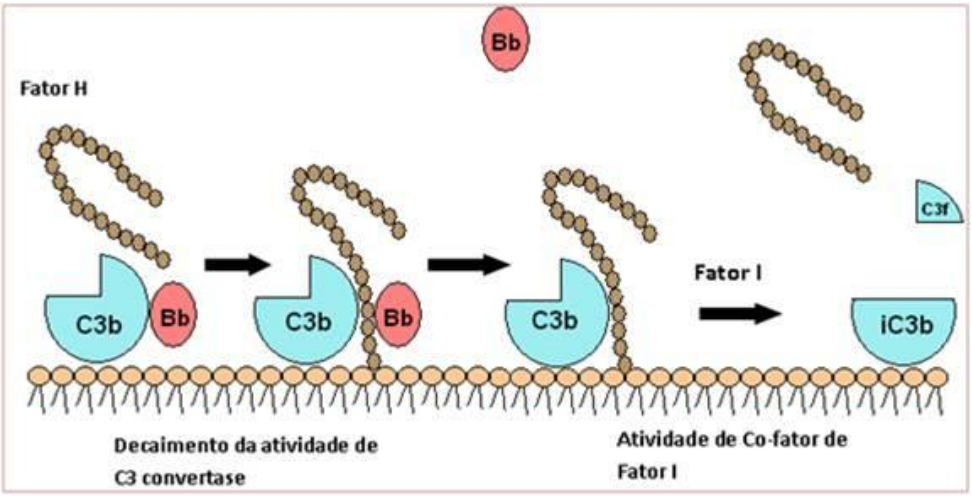


Legenda: Vias de ativação do sistema complemento: enfoque na lise celular
Fonte: (Adaptado de SCHNEIDER et al., 2007).

1.3.2 Regulação do sistema complemento

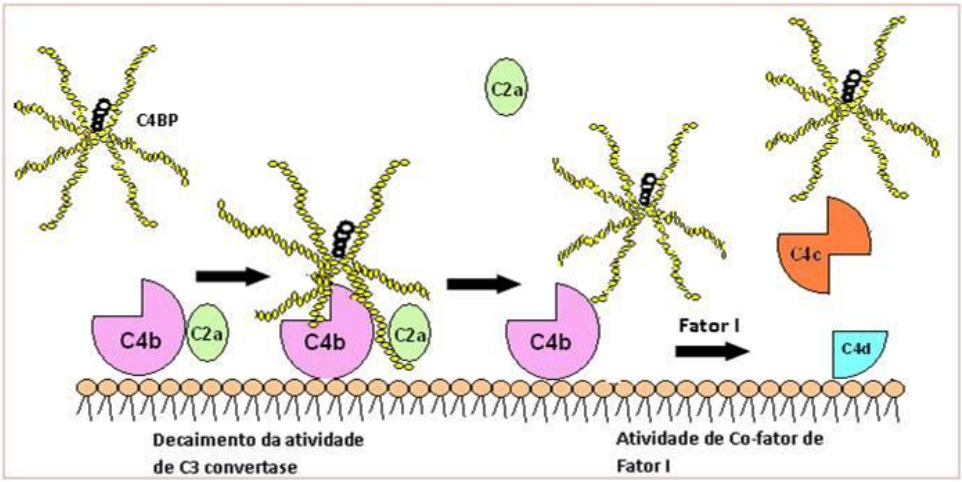
A fim de se evitar uma ativação inadequada com consequentes danos às células do hospedeiro, além do consumo exagerado de proteínas do complemento, é fundamental que haja uma regulação precisa deste sistema. Esse controle é garantido por uma série de reguladores que limitam a formação de C3b ou impedem a inserção do MAC nas células hospedeiras. Entre os principais reguladores plasmáticos do sistema complemento encontram-se o Fator H (FH), responsável pela regulação da via alternativa (Figura 3) e C4BP ("C4b Binding Protein") (Figura 4), responsável pela regulação da ativação da via clássica e da via das lectinas (BARNUM, 1991; WALPORT, 2001). Esses reguladores aceleram o decaimento das C3 convertases (C3bBb e C4b2a respectivamente) (WEILER et al., 1976; GIGLI et al., 1985; MISASI et al., 1989) e ambos agem como co-fatores de Fator I, enzima responsável pela clivagem irreversível de C3b e C4b respectivamente, impedindo assim a continuidade da ativação em cascata do sistema complemento pelas três vias (Figuras 3 e 4).

Figura 3 - Inibição da ativação da via alternativa por Fator H (FH)



Legenda: Ao se ligar em C3b, o Fator H desloca a interação entre C3b e Bb, desfazendo o complexo C3bBb, a C3 convertase da via alternativa. Atua como co-fator de Fator I na clivagem de C3b em iC3b. Em ambas as funções, Fator H impede a formação/manutenção de C3 convertase da via alternativa, interrompendo assim a sua contínua ativação.
Fonte: (Adaptado de MORGAN; HARRIS, 1999).

Figura 4 - Inibição da ativação da via clássica por C4BP



Legenda: Ao se ligar em C4b, C4BP desloca a interação entre C4b e C2a, e, além disso, atua como co-fator de Fator I na clivagem de C4b em C4c e C4d. Em ambas as atividades, C4BP impede a formação/manutenção da C3 convertase das vias clássicas e das lectinas, interrompendo assim a contínua ativação das mesmas.
Fonte: (Adaptado de MORGAN; HARRIS, 1999).

Além de proteínas de fase fluida, o sistema complemento conta com reguladores presentes na membrana de certos tipos celulares dentre os quais destacam-se: *Membrane co-factor protein* ou CD46 (MCP), *decay accelerating factor* (DAF), protectina (CD59), CR1 (CD35) e *homologous restriction factor* (HRF).

Vários microrganismos patogênicos expressam proteínas de superfície que mimetizam moléculas das células hospedeiras com capacidade de interagir com reguladores negativos do sistema complemento e essa estratégia permite que eles sobrevivam *in vivo*. A capacidade de se ligar a reguladores solúveis, notadamente Fator H e / ou C4BP, já foi descrita em bactérias, fungos e vírus, dentre os quais as espiroquetas *Borrelia recurrentis* e *Borrelia duttonii* (MERI et al., 2006).

1.3.3 Mecanismo de evasão ao sistema complemento apresentado por leptospiras patogênicas

A capacidade de leptospiras patogênicas resistirem à atividade bactericida do soro foi descrita há várias décadas, mas os estudos sobre os mecanismos subjacentes a esta resistência começaram a ser realizados apenas recentemente. A primeira estratégia de evasão ao sistema complemento descrita para leptospiras patogênicas foi a aquisição do principal regulador negativo da via alternativa, o Fator H (FH) do soro humano. Além de adquirir FH em sua superfície elas também têm a capacidade de interagir com a proteína ligadora de C4b humano (C4BP), o principal regulador negativo das vias clássica e das lectinas do sistema complemento (MERI et al., 2005; BARBOSA et al., 2009). Acredita-se que a aquisição destes reguladores do sistema complemento contribua para a resistência à atividade bactericida do soro apresentada por essas bactérias. Até então, as seguintes proteínas de membrana de *Leptospira* foram identificadas como ligantes desses dois reguladores negativos do sistema complemento: Leptospiral endostatin-like A (LenA), Leptospiral immunoglobulin-like proteins A and B (LigA/LigB), ambas receptores para FH (VERMA et al., 2006; STEVENSON et al., 2007; CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012), e LcpA (Leptospiral complement-regulator acquiring protein A) e Leptospiral immunoglobulin-like proteins A and B (LigA/LigB), receptores para C4BP (BARBOSA, et al., 2010; CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012).

Estudos recentes realizados por nosso grupo levaram à caracterização da proteína de superfície LcpA, acima mencionada. Essa proteína de cerca de 20 kDa, codificada pela LIC11947, interage com C4BP e, portanto, com base em sua função, foi designada Leptospiral complement-regulator acquiring protein A. Nossos resultados mostraram que LcpA é uma proteína capaz de se ligar a C4BP purificado ou solúvel no soro de maneira dose-

dependente. Uma vez ligado à proteína, C4BP permanece funcional agindo como co-fator de Fator I na clivagem de C4b. O gene que codifica a proteína é conservado e está presente apenas em espécies patogênicas de *Leptospira*. Ainda, demonstramos experimentalmente por três diferentes métodos que LcpA está presente na superfície da bactéria. Este foi o primeiro relato de uma proteína de *Leptospira* que interage com C4BP.

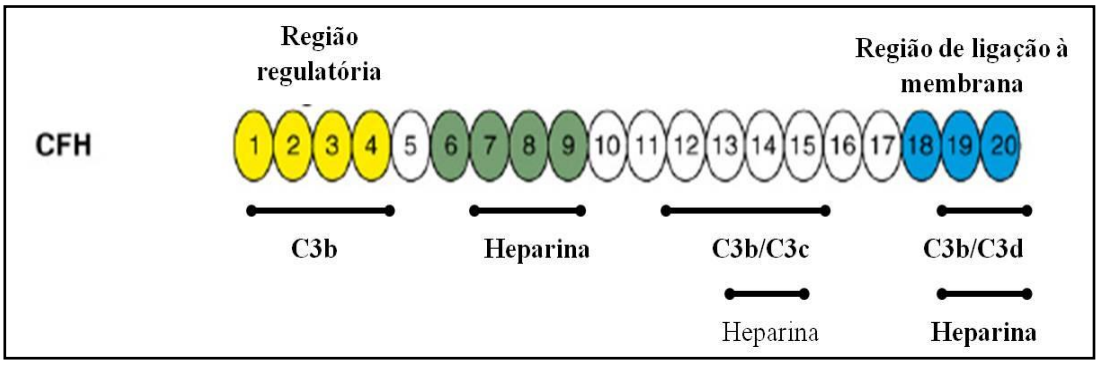
Dados preliminares sugerem que, além de interagir com C4BP, LcpA também é capaz de se ligar a Fator H humano, principal regulador solúvel da via alternativa do sistema complemento. O presente trabalho teve como objetivo avaliar esta interação de forma mais abrangente.

1.3.4 Fator H

Fator H foi identificado pela primeira vez por Nilsson e Muller-Eberhard (1965) como uma β_1H globulina. Trata-se de uma glicoproteína de 155 kDa composta por 20 domínios repetitivos chamados *Short Consensus Repeats* (SCR) (Figura 5). Está presente no plasma humano na concentração aproximada de 500 µg/mL (ZIPFEL et al., 1999).

Há várias proteínas com domínios SCR e FH é o membro da família melhor caracterizado. Esta família de proteínas inclui também o regulador FH-like (FHL-1), gerado por *splicing* alternativo do gene que codifica o FH, contendo os setes primeiros SCRs. Foram também descritas outras proteínas relacionadas (Factor H related proteins) codificadas por genes distintos: FHR-1, FHR-2, FHR-3, FHR-4A, FHR-4B e FHR-5. O número de domínios SCR é variável nessas proteínas, mas todos apresentam alto grau de similaridade entre si (JÓZSI et al., 2008).

Figura 5 - Representação esquemática do Fator H

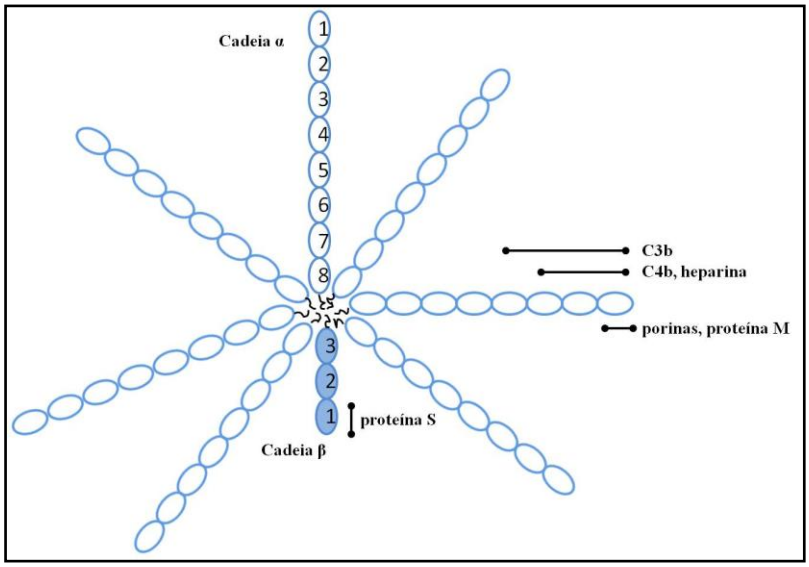


Legenda: Fator H é uma glicoproteína composta por 20 domínios chamados *Short Consensus Repeats* – SCR. Estão indicadas as regiões associadas às funções desta proteína.
Fonte: (Adaptado de JÓZSI et al., 2008)

1.3.5 C4b Binding Protein (C4BP)

C4BP é uma glicoproteína de aproximadamente 570 kDa presente no plasma. A isoforma mais comum é composta de sete cadeias α idênticas de 70 kDa e 1 cadeia B de 45 kDa (α7β1). Cada cadeia α possui oito domínios repetitivos chamados *Short Consensus Repeats* (SCR) e a cadeia β apresenta apenas três domínios SCR (MORGAN et al., 1999). Os domínios SCR das duas cadeias α e β são compostos por 60 aminoácidos cada um. (MERI et al., 2001). C4BP apresenta mais duas isoformas (α7β0 e α6β1) (MORGAN et al., 1999; BLOM et al., 2004a, b, c).

Figura 6 - Representação esquemática de C4BP



Legenda: C4BP é uma molécula composta por sete cadeias α idênticas e uma única cadeia β. Estão indicadas as regiões associadas às funções desta proteína.
Fonte: (Adaptado de BLOM et al., 2004c)

2 OBJETIVOS

Avaliar a interação da proteína de superfície LcpA de *Leptospira* com Fator H, principal regulador solúvel da via alternativa do sistema complemento humano

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expressar a proteína LcpA em *E.coli* e purificar a proteína recombinante.
- Avaliar a interação entre LcpA e Fator H por diversos métodos.
- Investigar se FH e C4BP competem por sítios de interação com LcpA.
- Avaliar atividade de co-fator de Fator H ligado a LcpA.
- Avaliar a capacidade imunoprotetora da proteína LcpA em modelo animal.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SOLUÇÕES E REAGENTES UTILIZADOS

No quadro 2 estão descritas as soluções e reagentes utilizados.

Quadro 2 - Descrição das soluções utilizadas nos diversos procedimentos (continua)

Preparação de bactérias competentes
- RF: cloreto de magnésio 1 M. **- RF I:** acetato de potássio 30 mM, cloreto de potássio 100 mM, cloreto de manganês 50 mM, cloreto de cálcio 10 mM, glicerol 15%, pH 5,8. **- RF II:** cloreto de potássio 10 mM, cloreto de cálcio 75 mM, Na-MOPS 10 mM, glicerol 15%, pH 6,8. - Todas as soluções foram esterilizadas por filtração (filtro 0,22 µm) e armazenadas a 4º C**.**
Meios de Cultura
- LB: triptona 1,0%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 1,0%. **- LB-amp:** meio LB com ampicilina 100 µg/mL. **- LB-ágar:** bacto-triptona 1%, extrato de levedo 0,5%, NaCl 1%, bacto-ágar 1,5%. **- SOB:** triptona 1,6%; extrato de levedura 0,5%, cloreto de sódio 0,5% e cloreto de potássio 0,02%. **- EMJH modificado:** meio EMJH (*Difco ™ Laboratories*, Sparks, Maryland, EUA) contendo 10% de soro de coelho enriquecido com L-asparagina 0,015%; piruvato de sódio 0,0015%, cloreto de cálcio 0,001%, cloreto de magnésio 0,001%,peptona 0,03% e extrato de carne 0,02%. - Todos foram autoclavados a 120º C por 20 minutos.
Purificação de Proteínas
- PBS: NaCl 1,37 M, KCl 0,027 M, Na_2HPO_4 0,10 M e KH_2PO_4 0,017 M, pH 7,4. **- Tampão de lavagem do corpúsculo:** PBS, NaCl 500 mM e β-mercaptoetanol 5 mM. **- Tampão de solubilização do corpúsculo:** PBS pH 7,4 e ureia 8M. **- Solução de lavagem:** PBS pH 7,4 e imidazol 5 mM. **- Solução de eluição:** PBS pH 7,4 e imidazol 5 mM e imidazol (20 mM – 1M). **- Tampão de diálise:** PBS e glicina 0,1%.
SDS-PAGE
- Acrilamida 30%: Acrilamida 29% e Bis-acrilamida 1%. **- Tampão Tris-HCl pH 8,8:** Tris-HCl 1,5 M e SDS 0,1 %, pH 8,8. **- Tampão Tris-HCl pH 6,8:** Tris-HCl 1M e SDS 0,1 %, pH 6,8. **- Persulfato de amônio 10%.** **- TEMED:** N,N,N',N' – tetrametiletilenodiamina.
SDS-PAGE

Tampão de aplicação 5x: Tris-HCl 50 mM pH 6,8, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%; β-mercaptoetanol 100 mM. - **Tampão de corrida:** Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%. - **Solução corante:** ácido acético glacial 10%, etanol 50% e *Coomassie Blue Brillant* 0,25%. - **Solução descorante:** ácido acético glacial 10% e etanol 30%. - **Solução secante:** ácido acético glacial 10% e etanol 50%.
Western Blot
- **Tampão de transferência:** Tris-base 48 mM, glicina 39 mM, etanol 20% e SDS 0,037%, pH 8,3. - **PBS:** NaCl 1,37 M, KCl 0,027 M, Na_2HPO_4 0,10 M e KH_2PO_4 0,017 M, pH 7,4. - **PBS-T:** PBS e Tween 20 0,05%. - **Tampão de bloqueio:** PBS-T contendo 10% de leite desnatado. - **Solução de Ponceau:** Ponceau S 0,1 % em ácido glacial 10%. - **Solução de diluição de anticorpos:** PBS-T contendo 5% de leite desnatado. - **Solução de revelação:** SuperSignal® West Pico Enhanced Chemiluminescent Substrate (Pierce).
ELISA
- **PBS:** NaCl 1,37 M, KCl 0,027 M, Na_2HPO_4 0,10 M e KH_2PO_4 0,017 M, pH 7,4. - **Solução de lavagem:** PBS; Tween 20 0,05%. - **Coating buffer:** tampão carbonato 0,1 M pH 9,6 - **Solução de diluição do soro animal:** PBS Tween 20 0,01% + 1% de leite desnatado. - **Tampão citrato-fosfato:** citrato 0,1M, fosfato 0,2M pH, 5,0. - **Soluções de bloqueio**: PBS em 3% BSA e/ou PBS-T em 10% leite desnatado. - **Solução de revelação:** Substrato ortofenilenodiamina (OPD) 0,05% e H_2O_2 em tampão citrato-fostato 30%; pH 5,0 - **Solução de parada:** H_2SO_4 4N
Ensaio de co-fator
- **PBS:** NaCl 1,37 M; KCl 0,027 M; Na_2HPO_4 0,10 M e KH_2PO_4 0,017 M; pH 7,4. - **Tampão de diluição:** NaCl 100mM, Tris-HCl 50mM pH 7,4) - **Tampão de lavagem:** NaCl 100mM, Tris-HCl 50mM pH 7,4, Tween 20 0,05%

3.2 SOROS, PROTEÍNAS E ANTICORPOS COMERCIAIS

Soro humano normal (SHN), fonte de proteínas do sistema complemento, foi obtido de doadores saudáveis. Foram coletados de cada doador aproximadamente 50 mL de sangue em frascos de vidro sem anticoagulantes. Os frascos permaneceram a 37º C por 1 hora e em seguida o sangue foi centrifugado a 1013 x *g* por 15 minutos a 4º C. Os soros foram agrupados, divididos em alíquotas e estocados a -80° C. Fator H, C4BP, C3b e Fator I purificados de plasma humano foram adquiridos comercialmente (*Complement Technology).* Foram utilizados anti-FH produzido em cabra *(Quidel*), anti-C4BP produzido em coelho (*Calbiochem*) e anti-IgG específicos conjugados à peroxidase (*Sigma*). Anti-C3 produzido em cabra foi adquirido da *Complement Technology).*

3.3 PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

E. coli BL21(DE3) C43 competente foi obtida segundo protocolo descrito em Sambrook et al. (1989). Uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio líquido SOB e a cultura foi mantida por 16 – 20 h a 37°C, sob agitação. Após este período 2 mL da cultura foram adicionados a 100mL de meio líquido SOB pré-aquecido e realizou-se incubação a 37ºC por 2 a 3 horas até se atingir a DO_{600nm} de 0,6 a 0,7. Ao final do período de incubação, a cultura foi resfriada em gelo e adicionou-se 1 mL de solução RF . Após 15 minutos, a cultura foi centrifugada a 1620 x *g* por 15 minutos a 4ºC. O sedimento bacteriano foi ressuspendido em 20 mL de solução RFI e mantida em repouso por 15 minutos no gelo. A cultura foi centrifugada a 1620 x *g* por 15 minutos a 4ºC e o sedimento foi ressuspendido em 2 mL de solução RFII. A suspensão foi dividida em alíquotas 50µL, que foram armazenadas a -80°C.

Para a transformação, as bactérias competentes foram mantidas no gelo por aproximadamente 15 minutos. Às bactérias foram adicionados 2 µL de plasmídeo e o tubo contendo a mistura foi mantido no gelo por mais 15 minutos. Realizou-se um choque térmico por 50 segundos a 42°C e os tubos foram colocados novamente no gelo por 2 minutos. À mistura foram adicionados 350 µL de meio LB previamente aquecido e realizou-se incubação

a 37°C sob agitação por 1 hora e 30 minutos. A cultura foi plaqueada em meio LB-ágar contendo ampicilina (100μg/μL) e incubada a 37°C por 12 - 18 horas.

3.4 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Neste trabalho foram utilizdas as seguintes proteínas recombinantes: LcpA intacta, porção N-Terminal de LcpA, porção intermediária de LcpA, porção C-Terminal de LcpA, porção C-Terminal da proteína LigA (LigAC) e proteína codificada pela LIC10301, utilizada como controle negativo nos ensaios (Quadro 3).

Quadro 3 – Proteínas recombinantes utilizadas

Nomenclatura	Proteína recombinante massa molecular (kDa)
(*) (***)LcpA	19
(**) (***)N-terminal (LcpA)	10,04
(**) (***)Intermediária (LcpA)	9,95
(**) (***)C-Terminal (LcpA)	9,58
(*)LigAC	63
(*)LIC10301	13

Notas: Fragmentos ou genes clonados pela Dra. Patrícia Abreu (*) do Laboratório Bacteriologia do Instituto Butantan e pela Dra. Pricila Hauk (**) do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Proteínas que expressei e purifiquei para este trabalho (***).

Colônias isoladas das transformações com as construções plasmidiais foram inoculadas em 50 mL de meio LB-ampicilina e incubadas a 37º C sob agitação por 18 horas. O pré-inóculo foi adicionado a 400 mL de meio LB-ampicilina, seguindo-se uma incubação a 37º C sob agitação até se atingir a $DO_{600\ nm}$ de 0,6 – 0,8. Uma amostra de cada cultura foi coletada antes da indução para ser usada como controle (controle não induzido). A expressão foi induzida pela adição de IPTG 1 mM por mais 3 horas a 37º C. Após o período de indução,

a cultura foi centrifugada a 2057 x *g* por 15 minutos a 4º C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado armazenado a – 20ºC.

O sedimento bacteriano foi ressuspendido em 30 mL de PBS, adicionou-se 1 mM de PMSF e realizou-se a lise através da passagem pelo *French Pressure Cell Press (SLM Amico).* A suspensão da lise foi centrifugada a 12.857 x *g* por 15 minutos a 4º C. Após a centrifugação, o sobrenadante (fração solúvel) foi coletado e mantido a 4º C até o momento da purificação e o sedimento (fração insolúvel) foi ressuspendido em tampão de solubilização (ureia 8M). As amostras da fração solúvel e fração insolúvel foram analisadas em gel SDS-PAGE 15%.

As proteínas recombinantes LcpA e suas frações, N-Terminal (LcpA), Intermediária (LcpA) e C-Terminal (LcpA) foram purificadas a partir da fração insolúvel, sendo necessária a realização de uma etapa de renaturação. Para tanto, os corpúsculos foram solubilizados em 50 mL de ureia 8M dissolvida em PBS pH 7,4, e a solução gotejada em 2 L de PBS, pH 7,4, contendo imidazol 5 mM, sob agitação lenta. Esta solução contendo a proteína renaturada foi purificada por cromatografia de afinidade a metal, com resina de Sepharose (*Fast Flow Chelating Sepharose, GE Healthcare*) previamente carregada com $NiSO_4$. As proteínas recombinantes ligam-se ao $NiSO_4$ através de seis resíduos de histidina em sua porção amino-terminal. A resina foi lavada sucessivamente com tampão contendo imidazol 5 mM e as proteínas foram eluídas com PBS contendo concentrações crescentes de imidazol (5 mM, 20 mM, 40 mM, 60 mM, 1M). As frações contendo a proteína purificada foram reunidas e dialisadas por 16 horas contra PBS pH 7,4 contendo glicina 0,1% a 4º C.

3.5 ELETROFORESE EM GEL SDS-PAGE

As eletroforeses foram realizadas seguindo o protocolo descrito por Sambrook et al. (1989) em tampão de corrida, sob amperagem fixa (25mA) por gel, a temperatura ambiente. Os géis utilizados foram de 1,0 mm, 5 % de bisacrilamida/acrilamida no gel de empilhamento e 12 a 15% de bisacrilamida/acrilamida no gel de separação. As amostras foram preparadas em tampão de aplicação (5X) e desnaturadas a 96ºC por 4 min. Para acompanhamento, foi utilizado padrão de massa molecular (PageRuler - *Fermentas*).

Após a eletroforese, os géis foram corados com *Coomassie Blue Brilhant R-250* (USB) por 1 hora sob agitação em temperatura ambiente e descorados com solução descorante.

3.6 *WESTERN BLOT* COM *OVERLAY*

As proteínas recombinantes purificadas foram submetidas à eletroforese (SDS-PAGE-15%) e transferidas para membrana de nitrocelulose. Realizou-se bloqueio com PBS-T contendo 10% de leite em pó desnatado por um período de 16 horas a 4º C. Após três lavagens com PBS-T, as membranas foram incubadas por 1 hora e 30 minutos a temperatura ambiente com soro humano normal (SHN) 10% diluído em PBS-T. Após cinco lavagens, as membranas foram incubadas com anti-FH humano produzido em cabra diluído 1:10.000 em PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado ou anti-C4BP produzido em coelho diluído 1:5.000 em PBS-T contendo 5% leite em pó desnatado . Após três lavagens com PBS-T foi feita uma incubação com anti-IgG de cabra ou coelho conjugado a peroxidase diluído 1:10.000 em PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado por 1 hora a temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS-T, a membrana foi revelada com SuperSignal® West Pico Enhanced Chemiluminescent Substrate seguindo as instruções do fabricante.

3.7 ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

3.7.1 Ensaio de interação

As proteínas recombinantes de *Leptospira* LcpA, N-Terminal (LcpA), Intermediária (LcpA), C-Terminal (LcpA) e LIC10301 (1µg) foram imobilizadas em placas de micro-diluição de 96 poços de poliestireno (Corning Brasil) . Após uma incubação por um período de 16 horas a 4º C, os poços foram lavados com PBS, bloqueados por 2 h a 37 ºC com BSA 3% diluído em PBS e incubados com FH purificado (100 µL; 0 - 50 µg/mL) e C4BP (100 µL; 0 – 50 µg/mL) por 1 h a 37º C. Após cinco lavagens com PBS, as proteínas foram incubadas

com anti-FH humano (1:5000) ou anti-C4BP (1:5000) por 1 hora a 37ºC. Após três lavagens com PBS, incubou-se com anti-IgG de cabra (diluição 1:10.000) ou anti-IgG de coelho (1:10.000) por 1 hora a 37ºC. Após três lavagens, foi adicionada solução de revelação diluída em tampão citrato-fosfato (pH 5,0) e 30% de H_2O_2. A reação foi interrompida após 10 min pela adição de solução de parada. A absorbância a 492 nm foi determinada em um leitor de microplacas (Labsystems Uniscience, Multiskan EX).

3.7.2 Ensaio de competição

A proteína LcpA foi imobilizada em placa de microdiluição de 96 poços (1µg/poço). Os períodos de incubação e bloqueio foram realizados conforme descrito acima. Após o bloqueio, as proteínas foram incubadas com uma quantidade fixa de FH (1µg) em PBS na ausência ou presença de concentrações crescentes de C4BP (0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 µg) por 1 hora a 37ºC. O ensaio foi realizado em duplicata para que as placas pudessem ser incubadas com anti-FH na diluição de 1:5.000 ou anti-C4BP na diluição de 1:5000 por 1 hora a 37º C. Foram utilizados anti-IgG de cabra ou coelho conjugados a peroxidase na diluição de 1:10.000 por 1 hora a 37º C. Após três lavagens com PBS, foi adicionada solução de revelação e 30% de H_2O_2. Após 5 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de H_2SO_4 4 N. A absorbância a 492 nm foi determinada em um leitor de microplacas (Labsystems Uniscience, Multiskan EX).

3.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE CO-FATOR

A atividade de co-fator de FH ligado à proteína LcpA foi avaliada pelos produtos da clivagem de C3b mediada pelo Fator I. Um micrograma de LcpA e da proteína recombinante rLIC10301 (incluída como controle negativo) ambas diluídas em PBS, foi imobilizado em poços de placas de microdiluição. Realizou-se incubação por um período de 16 horas a 4 ºC. Após três lavagens com PBS, foi feito um bloqueio com BSA 3% por 2 h a 37º C. Os poços foram lavados com PBS e as proteínas foram incubadas com 2µg de FH diluído em tampão de diluição por 1 hora a 37ºC. Os poços foram lavados cinco vezes com tampão de lavagem e a

seguir foram adicionados 500 ng de C3b e 250 ng de Fator I diluídos em tampão de diluição, por períodos de 1, 2 e 4 horas a 37ºC.

As amostras foram coletadas e submetidas à SDS-PAGE 12% em condições redutoras. As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose. O bloqueio foi feito com 10% de leite em pó desnatado diluído em PBS-T por um período de 16 horas a 4º C. A membrana foi lavada três vezes com PBS-T e incubada com anti-C3 produzido em cabra diluído 1:10.000 em PBS-T por 1 hora a temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS-T, procedeu-se à incubação com anti-IgG de cabra conjugado a peroxidase por 1 hora a temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS-T, a membrana foi revelada com SuperSignal® West Pico Enhanced Chemiluminescent Substrate seguindo as instruções do fabricante.

3.9 ENSAIOS DE IMUNOPROTEÇÃO EM MODELO ANIMAL

Os ensaios de imunização e desafio foram realizados com auxílio da Dra. Patrícia Abreu e da doutoranda Denize Monaris, ambas do Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, em colaboração com o Laboratório de Zoonoses Bacterianas coordenado pelo Prof. Dr. Sílvio de Arruda Vasconcellos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. Grupos de 10 hamsters recém-desmamados (*Mesocricetus auratus*) com 80-120g foram imunizados subcutaneamente com 20μg de proteína recombinante purificada LcpA e 50 μg da proteína recombinante LigAC ambas diluídas em PBS. Hidróxido de alumínio (1μg de $Al(OH)_3$ para cada 10 μg de proteína) foi adicionado como adjuvante. No controle do inóculo, os animais não foram imunizados e nos demais controles negativos os animais foram imunizados com PBS acrescido de hidróxido de alumínio. Como controles positivos, animais foram imunizados com vacina comercial, normalmente utilizada em suínos, composta pelas culturas inativadas de seis sorovares de *L. interrogans* (Bratislava, Canicola, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagieae, Pomona), contendo hidróxido de alumínio como adjuvante. Todas as preparações tiveram um volume de 250 a 350 μL por dose. Foram realizadas duas imunizações com intervalo de 15 dias. Os animais imunizados foram desafiados intraperitonialmente com 2 a 2,5 x DL50 da *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm (1º desafio) ou com *L. interrogans* sorovar Copenhageni Fiocruz L1-130 (2º

e 3º desafios) diluída em PBS. O quadro 4 contém os grupos e as composições por dose utilizados nesses ensaios.

Quadro 4 – Preparação das doses para o ensaio de imunoproteção

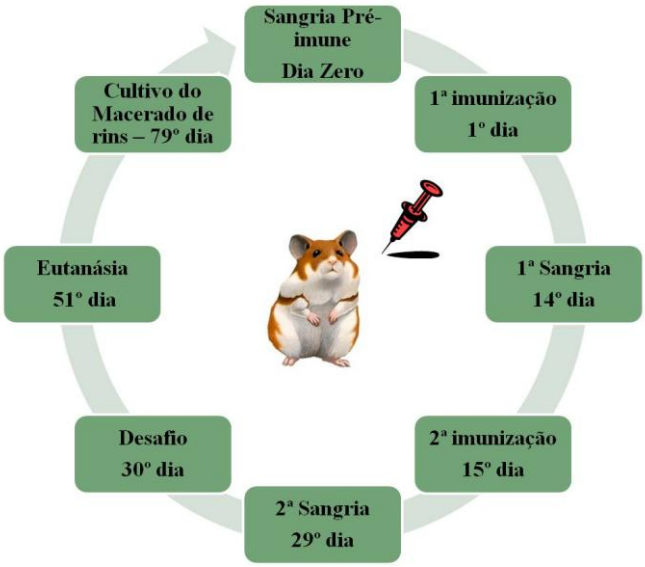
Grupos	**Composição por dose**
01 – Controle do Inóculo [a]	-
02 – PBS + $Al(OH)_3$	875 µg de $Al(OH)_3$
03 – Vacina Comercial [b]	-
04 – LigAC + $Al(OH)_3$	50 µg de LigAC + 250 µg de $Al(OH)_3$
05 – LcpA + $Al(OH)_3$	20 µg de LcpA + 250 µg de $Al(OH)_3$
06 – LcpA + LigAC + $Al(OH)_3$	20 µg de LcpA + 50 µg de Lig AC + 250 µg de $Al(OH)_3$

Notas: a – Grupo não imunizado; b – Vacina comercial: informações não disponíveis.

Os animais que sobreviveram após o 28º dia do desafio foram sacrificados e necropsiados, os rins coletados para a detecção de leptospiras em meio líquido. Para o acompanhamento do título de anticorpos por ELISA, os animais utilizados nos ensaios de desafio foram sangrados via plexo retro-orbital antes das imunizações como controle do soro (sangria zero) e após as imunizações (Figura 7).

Para determinação da DL50, foram utilizados hamsters da mesma idade e sexo dos animais utilizados nos ensaios de desafio. Uma cultura de *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 Fiocruz virulenta, na quarta passagem, foi diluída em PBS (100 a 105 células/mL) e inoculada em cinco animais para cada diluição. Um grupo controle foi inoculado somente com PBS. Utilizou-se via intraperitonial e o volume inoculado de 200 µL. Os animais foram monitorados por 28 dias e a DL50 calculada através do método de Reed-Muench (Apêndice A).

Figura 7 - Representação esquemática do ensaio de imunoproteção em hamsters.



Fonte: (SILVA, L. B., 2013).

3.9.1 Título de anticorpos específicos

A titulação dos soros foi feita por ELISA. As proteínas LigAC (porção C-terminal de proteína LigA) e LcpA diluídas em tampão carbonato pH 9,6 foram imobilizadas em placas de microdiluição de 96 poços (0,5 µg/poço) e incubadas por um período de 16 h a 4º C. Os poços foram lavados três vezes com PBS-T e realizou-se bloqueio com 10% de leite em pó desnatado por 1 hora a 37º C. Após o bloqueio as placas foram lavadas uma vez com PBS-T, os soros dos animais diluídos em PBS contendo 1% de leite em pó desnatado + Tween 20 0,01% foram aplicados em diluição seriada (1:100 até 1:102.400) e incubados por 1 hora a 37ºC. Os poços foram lavados três vezes com PBS-T. Em seguida, realizou-se incubação por 1 hora a 37ºC com anti-hamster produzido em coelho diluído 1:5000 em PBS contendo 1% de leite em pó desnatado + Tween 20 0,01%. Os poços foram lavados três vezes com PBS-T e incubados por mais 1 hora a 37ºC com anti-coelho conjugado a peroxidase na diluição de 1:5000 em PBS com 1% de leite em pó desnatado + Tween 20 0,01%. Após três lavagens com PBS-T, foi adicionada solução de revelação. A reação foi interrompida após 5 minutos pela adição da solução de parada. A absorbância a 492 nm foi determinada em um leitor de microplacas (Labsystems Uniscience, Multiskan EX).

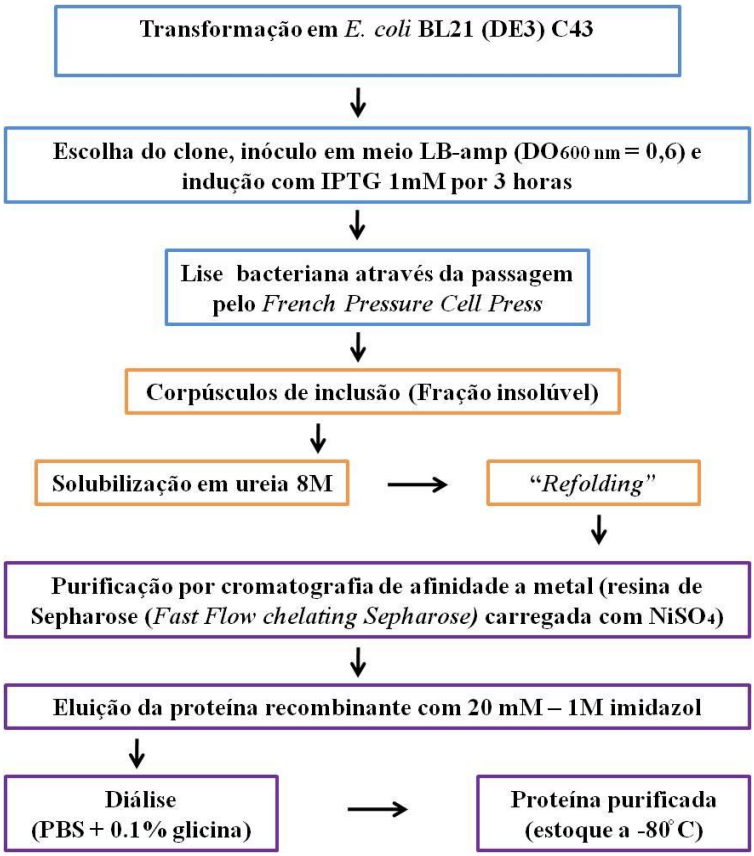
4 RESULTADOS

4.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES LcpA, N-TERMINAL (LcpA), INTERMEDIÁRIA (LcpA) E C-TERMINAL (LcpA).

A expressão e a purificação das proteínas recombinantes foram realizadas segundo protocolos estabelecidos por nosso grupo. As etapas do processo estão esquematizadas na figura 8.

Todas as proteínas recombinantes foram expressas na fração insolúvel e, portanto, foi necessária a realização de uma etapa de renaturação.

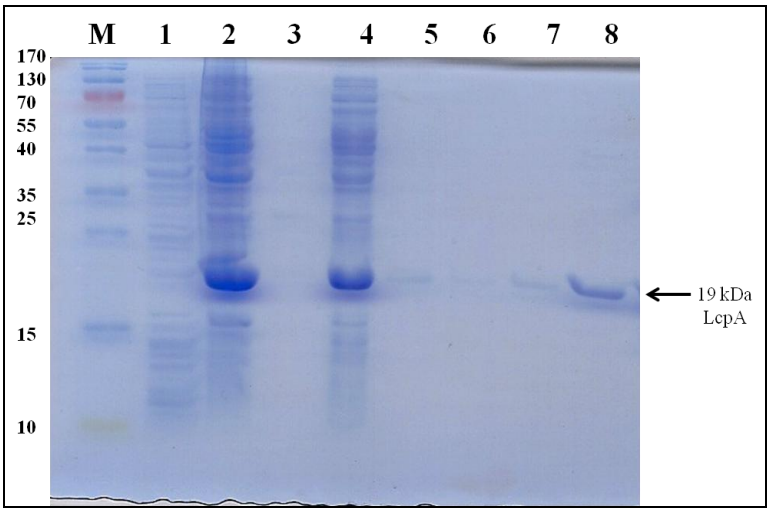
Figura 8 - Esquema do processo de expressão e purificação de proteínas recombinantes



Fonte: (SILVA, L. B., 2013).

A proteína LcpA foi eluída em solução contendo 20 mM, 40 mM, 60mM e 1M de imidazol (Figura 9), mas a fração eluída com imidazol 1M foi a que apresentou maior concentração de proteína.

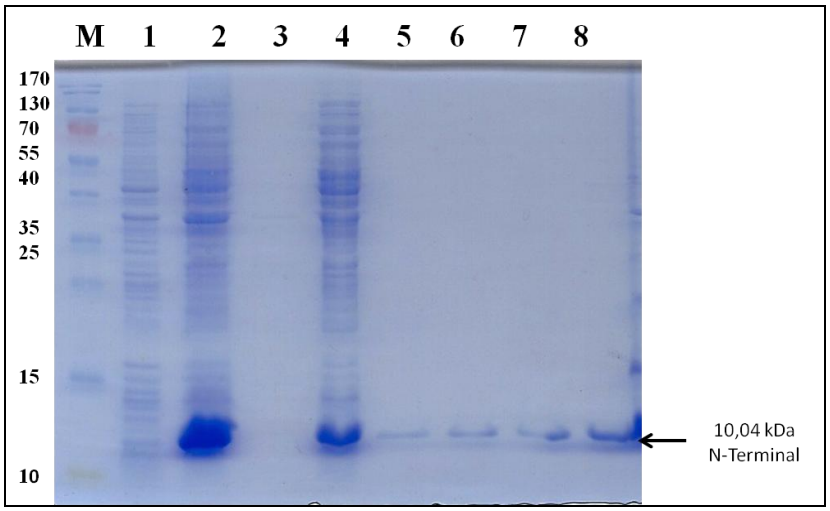
Figura 9 - Análise da expressão e das frações de eluição da proteína LcpA por SDS-PAGE 15%



Legenda: A expressão da proteína recombinante LcpA foi avaliada nos controles **(1)** Não induzido; (2) Induzido; (3) Sobrenadante; (4*) Pellet*; (5) Fração eluída com imidazol 20 mM; (6) 40 mM; (7) 60 mM; (8) 1M; (**M)** Marcador de peso molecular PageRuler (*Fermentas*).
Fonte: (SILVA, L. B., 2013).

As proteínas N-Terminal (LcpA) e C-Terminal (LcpA) foram eluídas em solução contendo 20 mM, 40 mM, 60 mM e 1M de imidazol (Figuras 10, 12). A fração eluída de 1M de imidazol foi a que apresentou maior concentração de proteínas (N-Terminal e C-Terminal). A proteína Intermediária (LcpA) foi eluída na fração 60 mM de imidazol (Figura 11).

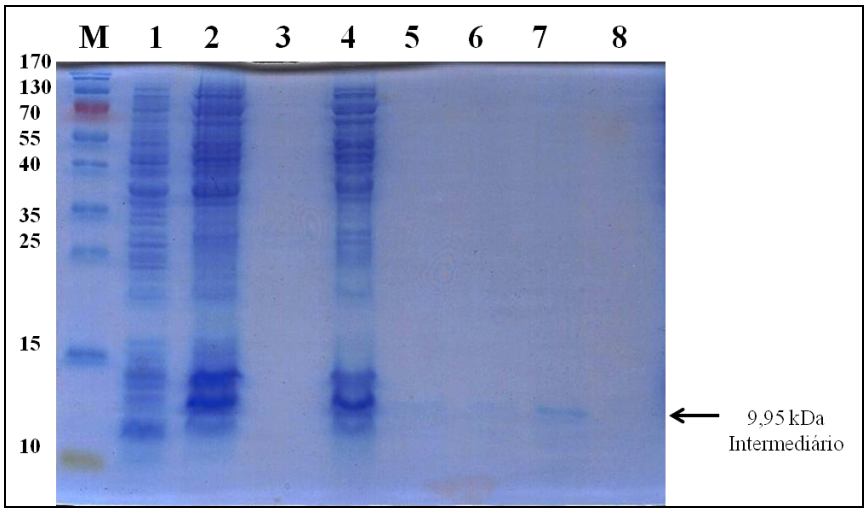
Figura 10 - Análise da expressão e das frações de eluição da proteína N-Terminal (LcpA) por SDS-PAGE 15 %



Legenda: A expressão da proteína recombinante N-Terminal (LcpA) foi avaliada nos controles **(1)** Não induzido; (2) Induzido; (3) Sobrenadante; (4) *Pellet*; (5) Fração eluída com imidazol 20 mM; (6) 40 mM; (7) 60 mM; (8) 1M;**(M)** Marcador de peso molecular PageRuler (*Fermentas*).

Fonte: (SILVA, L. B., 2013).

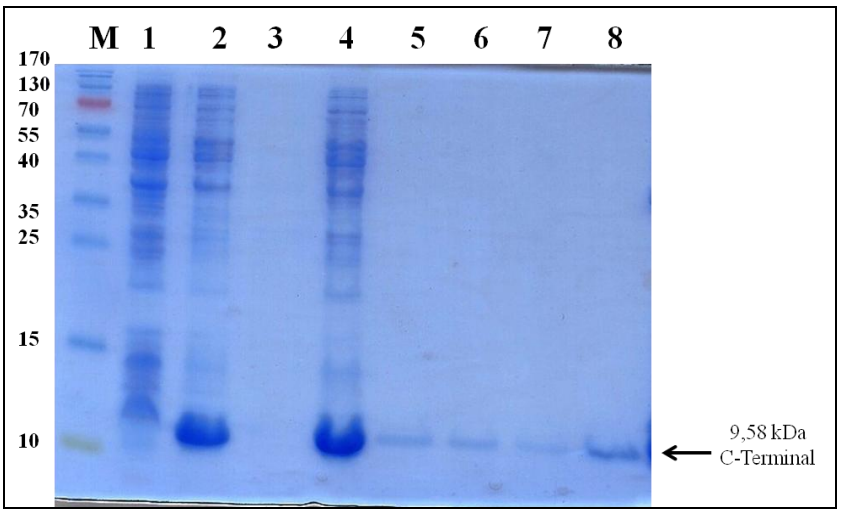
Figura 11 - Análise da expressão e das frações de eluição da proteína intermediária (LcpA) por SDS-PAGE 15%



Legenda: A expressão da proteína recombinante Intermediária (LcpA) foi avaliada nos controles **(1)** Não induzido; **(2)** Induzido; **(3)** Sobrenadante; **(4)** *Pellet*; **(5)** Fração eluída com imidazol 20 mM; **(6)** 40 mM; (7) 60 mM; (8) 1M; **(M)** Marcador de peso molecular PageRuler (*Fermentas*).

Fonte: (SILVA, L. B., 2013).

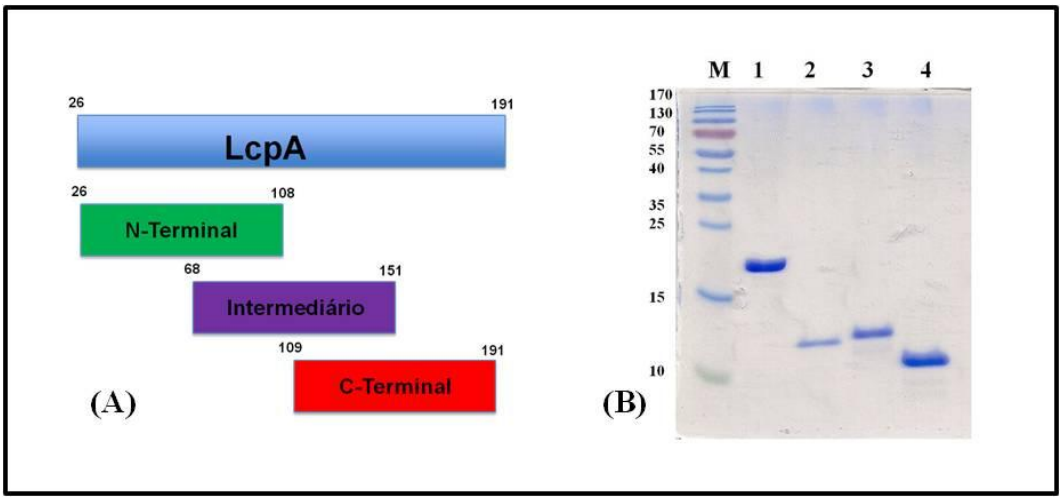
Figura 12 - Análise da expressão e das frações de eluição da proteína C-Terminal (LcpA) por SDS-PAGE 15 %.



Legenda: A expressão da proteína recombinante C-terminal (LcpA) foi avaliada nos controles **(1)** Não induzido; **(2)** Induzido; **(3)** Sobrenadante; **(4)** *Pellet*; **(5)** Fração eluída com imidazol 20 mM; **(6)** 40 mM; **(7)** 60 mM; **(8)** 1M; **(M)** Marcador de peso molecular PageRuler (*Fermentas*)
Fonte: (SILVA, L. B., 2013).

Após eluição, as frações contendo proteínas foram reunidas e dialisadas contra PBS. A figura 13 contém um esquema dos fragmentos produzidos (A) e um gel com as proteínas purificadas (B).

Figura 13 - (A) Mapa dos domínios da proteína LcpA. (B) Proteínas recombinantes purificadas. Gel SDS-PAGE 15%.



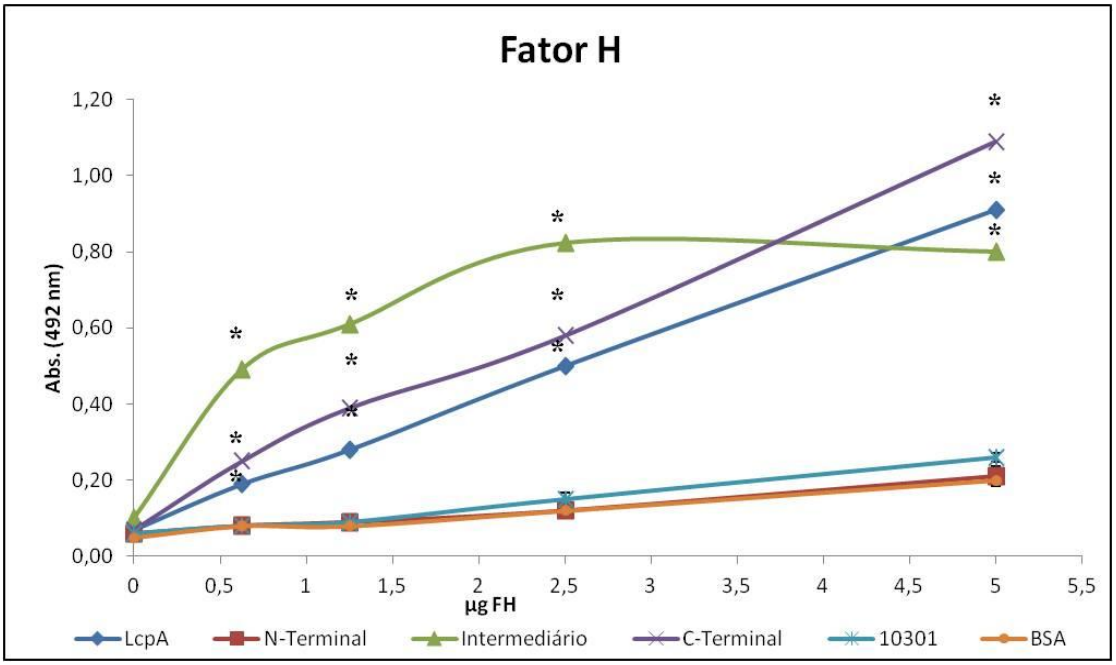
Legenda: **(B) 1 -** LcpA -19 kDa; **2 -** N-terminal (LcpA) - 10,04 kDa; **3 -** Intermediária (LcpA) – 9,95 kDa; **4 -** C-terminal (LcpA) – 9,58 kDa. **M -** Marcador de peso molecular PageRuler (*Fermentas*).
Fonte: (SILVA, L. B., 2013).

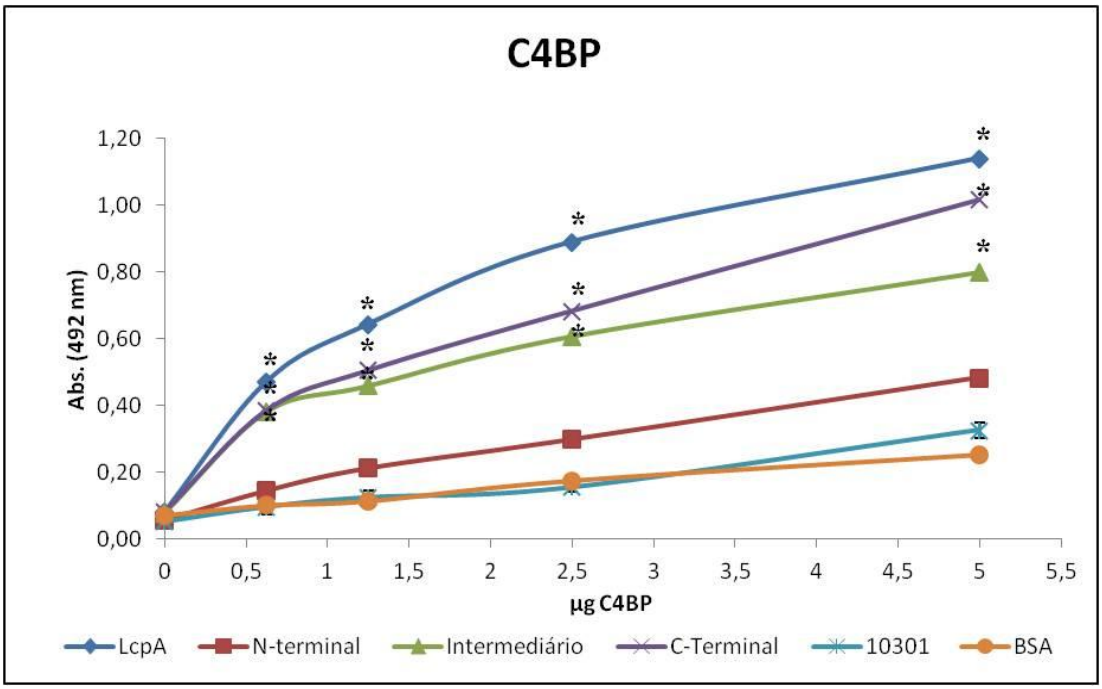
4.2 INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES LcpA, N-TERMINAL (LcpA), INTERMEDIÁRIA (LcpA) E C-TERMINAL (LcpA) COM FH E C4BP.

4.2.1 Interação por ELISA

Inicialmente, a interação das proteínas recombinantes com os reguladores negativos do sistema complemento FH e C4BP foi analisada por *ELISA*. As proteínas foram imobilizadas e incubadas com esses dois reguladores em diferentes concentrações (0,625; 1,25; 2,5 e 5 µg). Como controles negativos de ligação foram utilizadas as proteínas LIC10301 e BSA. A proteína LcpA e as frações Intermediária e C-Terminal (LcpA) interagiram com os dois reguladores do sistema complemento de maneira dose-dependente. A fração N-terminal, assim como os controles negativos, não interagiram com estas moléculas (Figura 14).

Figura 14 - Análise da interação das proteínas LcpA, N-terminal (LcpA), Intermediária (LcpA) e C-terminal (LcpA) com os reguladores negativos do sistema complemento FH e C4BP por ELISA





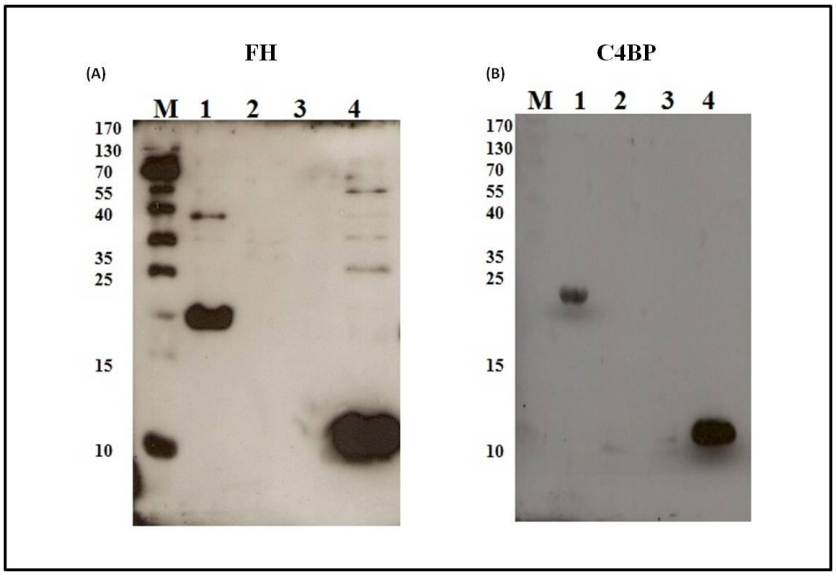
Legenda: As proteínas recombinantes (1µg) foram imobilizadas em placas de microdiluição e incubadas com diferentes concentrações (0,625; 1,25; 2,5; 5,0) de FH ou C4BP e detectadas com anticorpos específicos. LIC10301 e BSA foram usadas como controles negativos de ligação. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os pontos representam a média e o desvio padrão da absorbância a 492nm de dois experimentos independentes. Os valores de absorbância obtidos para as proteínas recombinantes foram comparadaos àqueles observados com BSA pelo teste t Student. $*p \leq 0,05$. Os desvios-padrão encontram-se no Apêndice C.

Fonte: (SILVA, L. B., 2013).

4.2.2 Western blot com overlay

As proteínas recombinantes foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE 15% e transferidas para membranas de nitrocelulose. Após bloqueio, as membranas foram incubadas com 10% de soro humano normal como fonte de FH e C4BP. Para detectar a interação destas moléculas com as proteínas imobilizadas foram utilizados anti-FH produzido em cabra e anti-C4BP produzido em coelho. Os resultados mostram que a proteína LcpA e sua porção C-Terminal (LcpA) interagem com os dois reguladores negativos do sistema complemento (Figura 15).

Figura 15- Análise da interação de FH e C4BP com as proteínas recombinantes de *Leptospira* (LcpA intacta e fragmentos) por *Western blot overlay*



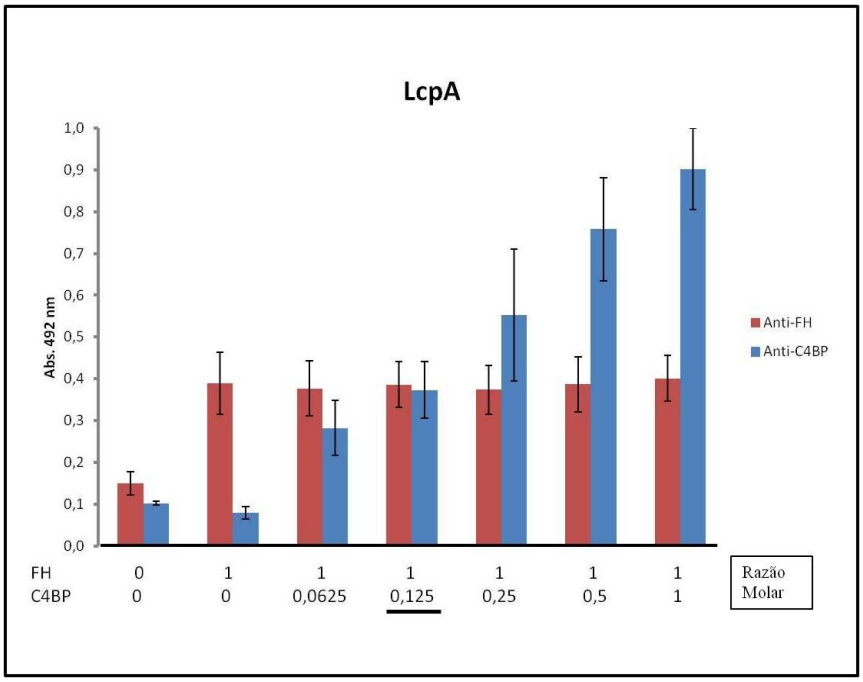
Legenda: Após a eletroforese (SDS-PAGE 15%) as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com 10% de SHN. A interação de FH e C4BP com as proteínas recombinantes foi detectada com anticorpos específicos. **A e B – (1)** LcpA; **(2)** N-Terminal (LcpA); **(3)** Intermediária (LcpA); **(4)** C-Terminal (LcpA) **(M)** Marcador de peso molecular PageRuler (Fermentas).

Fonte: (SILVA, L. B., 2013).

4.3 ENSAIOS DE COMPETIÇÃO

Uma vez que os dois reguladores negativos do sistema complemento FH e C4BP interagem com LcpA, investigou-se se ambas as moléculas competiriam pelos mesmos sítios de interação. A proteína recombinante intacta LcpA (1µg) foi imobilizada em placas de microdiluição e incubada com 1 µg de FH e diferentes concentrações de C4BP (0,25; 0,5; 1; 2; 4 µg). Os ensaios foram realizados em duplicata para que FH e C4BP ligados à LcpA fossem detectados paralelamente com anticorpos específicos. Conforme mostrado na figura 16. C4BP não compete com FH para se ligar à proteína LcpA, pois quantidades crescentes de C4BP não alteraram a interação de FH com a proteína recombinante imobilizada. Conclui-se, portanto, que FH e C4BP possuem sítios distintos na proteína LcpA.

Figura 16- Análise de competição entre FH e C4BP por sítios de interação com a proteína LcpA



Legenda: A proteína LcpA foi imobilizada em placa de microdiluição e incubada simultaneamente com FH (1µg) e com C4BP em diferentes concentrações (0,25; 0,5; 1; 2; 4 µg). As placas foram preparadas em duplicata, utilizando anti-FH em uma delas e anti-C4BP na outra. Os dados representam a média ± o desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em duplicata. A razão molar sublinhada é aquela encontrada no soro em condições fisiológicas.

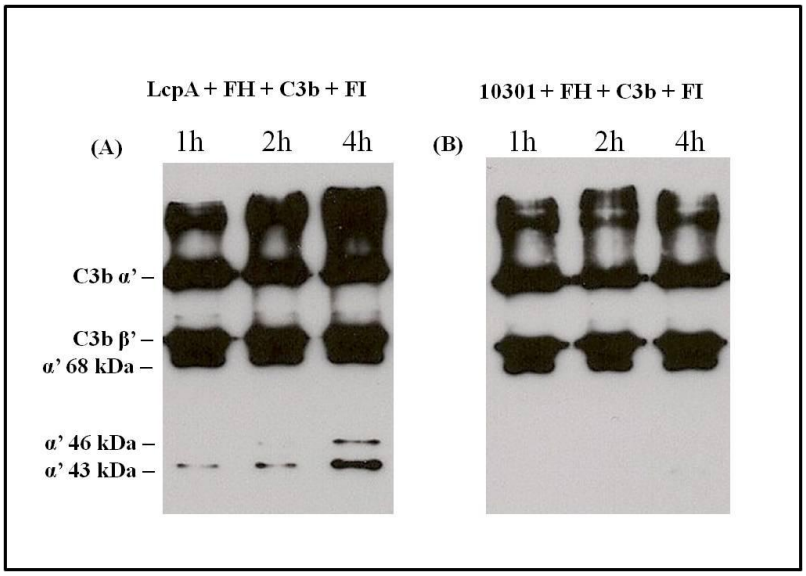
Fonte: (SILVA, L. B., 2013)

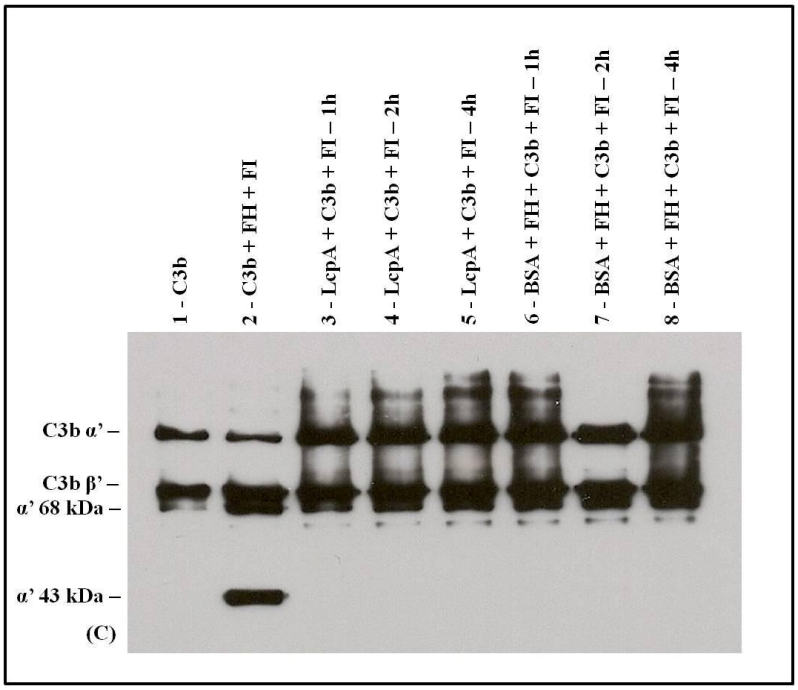
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE CO-FATOR DE FH LIGADO À PROTEÍNA LcpA

Sabendo-se que FH age como co-fator de FI na clivagem de C3b, avaliou-se sua atividade quando ligado à proteína LcpA. A proteína foi incubada com FH e, após lavagens, adicionaram-se C3b e FI. Após incubações de 1, 2 e 4 horas, os produtos foram submetidos à eletroforese SDS-PAGE 10%, transferidos para membranas de nitrocelulose e incubados com anti-C3. Na reação envolvendo LcpA, detectou-se a clivagem de C3b com a geração de fragmentos de 43 kDa e 46 kDa, indicando que FH ligado a essa proteína foi capaz de agir como co-fator de FI na clivagem da C3b (Figura 17A). A proteína LIC10301 foi utilizada como controle negativo e nesse caso não se observou clivagem de C3b (Figura 17 B). A figura 17 C contém uma série de outros controles: a molécula C3b intacta, C3b + FH + FI (controle positivo), LcpA + C3b + FI (omitiu-se FH) e BSA + FH+ C3b + FI (substitui-se LcpA por BSA). Com exceção do controle positivo, não se detectou clivagem nos demais casos, como esperado.

Cabe ressaltar que Barbosa et al. (2010) já haviam demonstrado que C4BP retém atividade de cofactor quando ligado a LcpA.

Figura 17 - Análise da atividade de FH ligado à LcpA como co-fator de FI na clivagem de C3b





Legenda: **(A)** As proteínas LcpA e **(B)** LIC10301 (1µg) foram imobilizadas e incubadas com FH purificado (2µg). Os poços foram lavados e foram adicionados C3b (500 ng) e FI (250 ng). **(C)** 1 – C3b intacto; 2 - controle positivo; 3 - 5 Controles negativos (omitiu-se FH); 6 – 8 Controles negativos utilizando-se BSA. Os sobrenadantes foram submetidos à analise por SDS-PAGE 10% e os fragmentos de clivagem foram detectados por *Western Blot* com anti-C3.

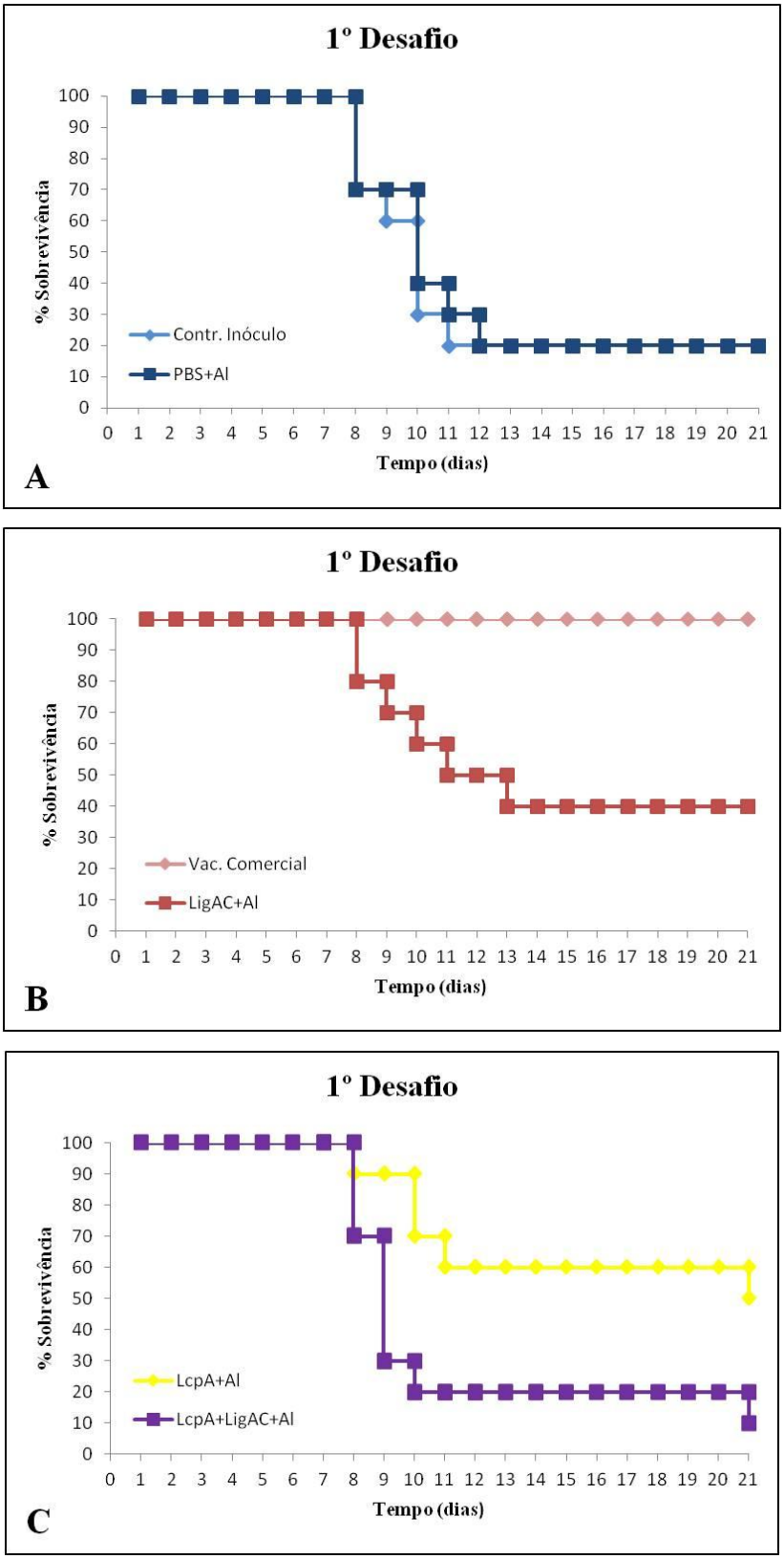
Fonte: (SILVA, L. B., 2013)

4.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOPROTETOR DA PROTEÍNA LcpA EM MODELO ANIMAL

O potencial imunoprotetor da proteína LcpA foi avaliado, analisando-se a sobrevivência e a colonização renal após três ensaios de desafio em hamster. Grupos experimentais com 10 animais foram imunizados subcutaneamente com a proteína recombinante LcpA na ausência ou presença da porção C-terminal da proteína LigA (LigAC) recombinante. Sabe-se que esta proteína confere 70 – 100% de proteção neste modelo animal, mas os animais continuam portadores (SILVA et al., 2007). O adjuvante utilizado foi o hidróxido de alumínio. Os desafios foram divididos em grupos "controle negativo" (controle do inóculo, ou seja, animais não imunizados e PBS acrescido de hidróxido de alumínio e "grupo controle positivo" (vacina comercial e LigAC acrescida de hidróxido de alumínio) (Quadro 4).

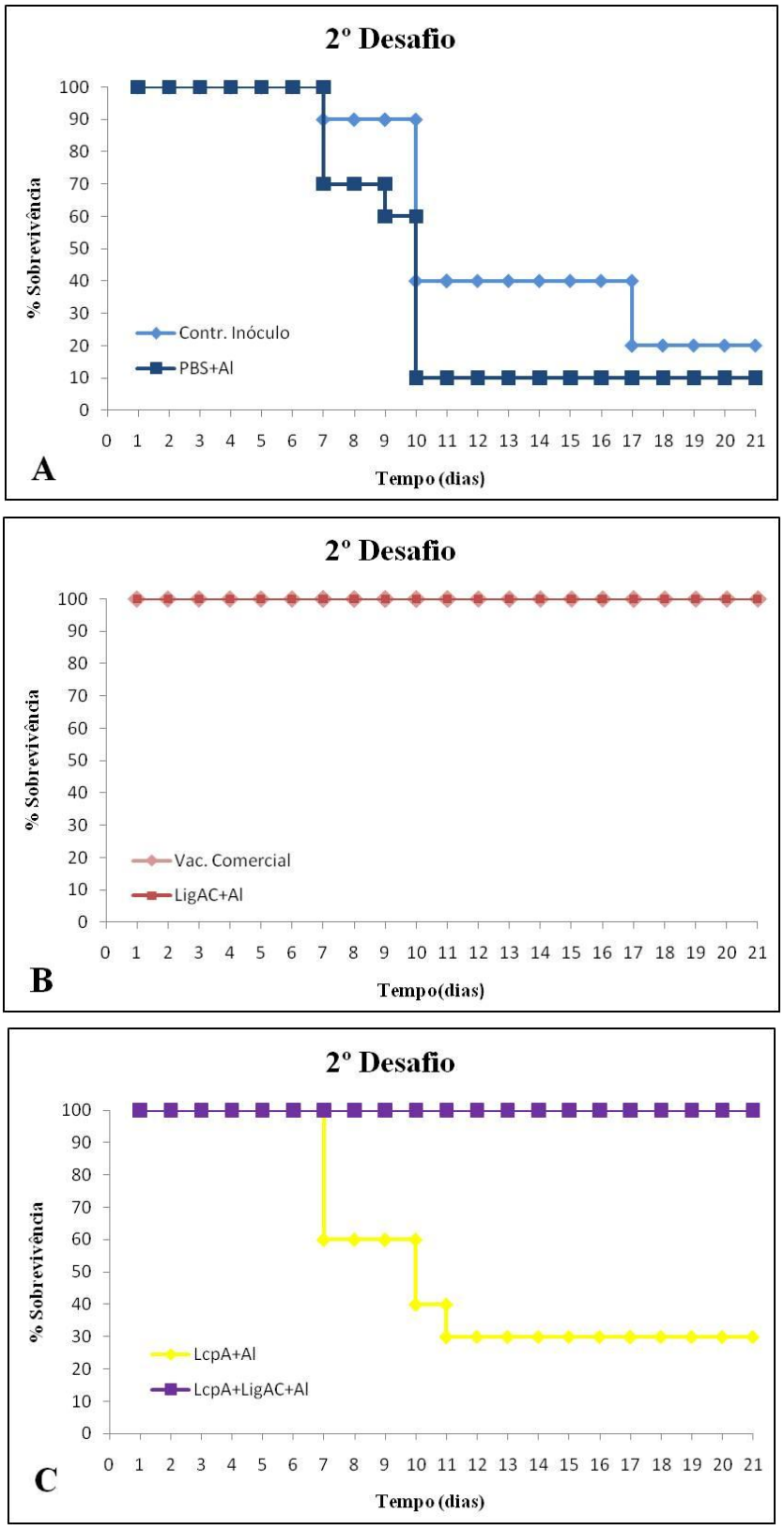
Nos grupos controles negativos infectados (controle do inóculo e PBS) os animais morreram entre os dias 5 a 17 após serem desafiados e apresentaram sintomas clínicos de leptospirose como desidratação, anorexia e diminuição da atividade (Figuras 18 A, 19 A e 20 A). Esses grupos apresentaram em média 16,6% e 20% de sobrevivência respectivamente (Tabela 3). Os grupos imunizados com vacina comercial e LigAC apresentaram em média 100% e 80% de sobrevivência e os animais não apresentaram sinais clínicos de leptospirose (Figura 18 B, 19 B e 20 B; Tabela 1). Os animais imunizados com as preparações vacinais da LcpA sem e com LigAC apresentaram em média 33% e 73,3% de sobrevivência respectivamente (Figura 18C, 19 C e 20 C; Tabela 1) e os animais morreram entre os dias 7 a 21 após o desafio.

Figura 18- Porcentagem de hamsters sobreviventes 21 dias após desafio com cultura de *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm no primeiro desafio



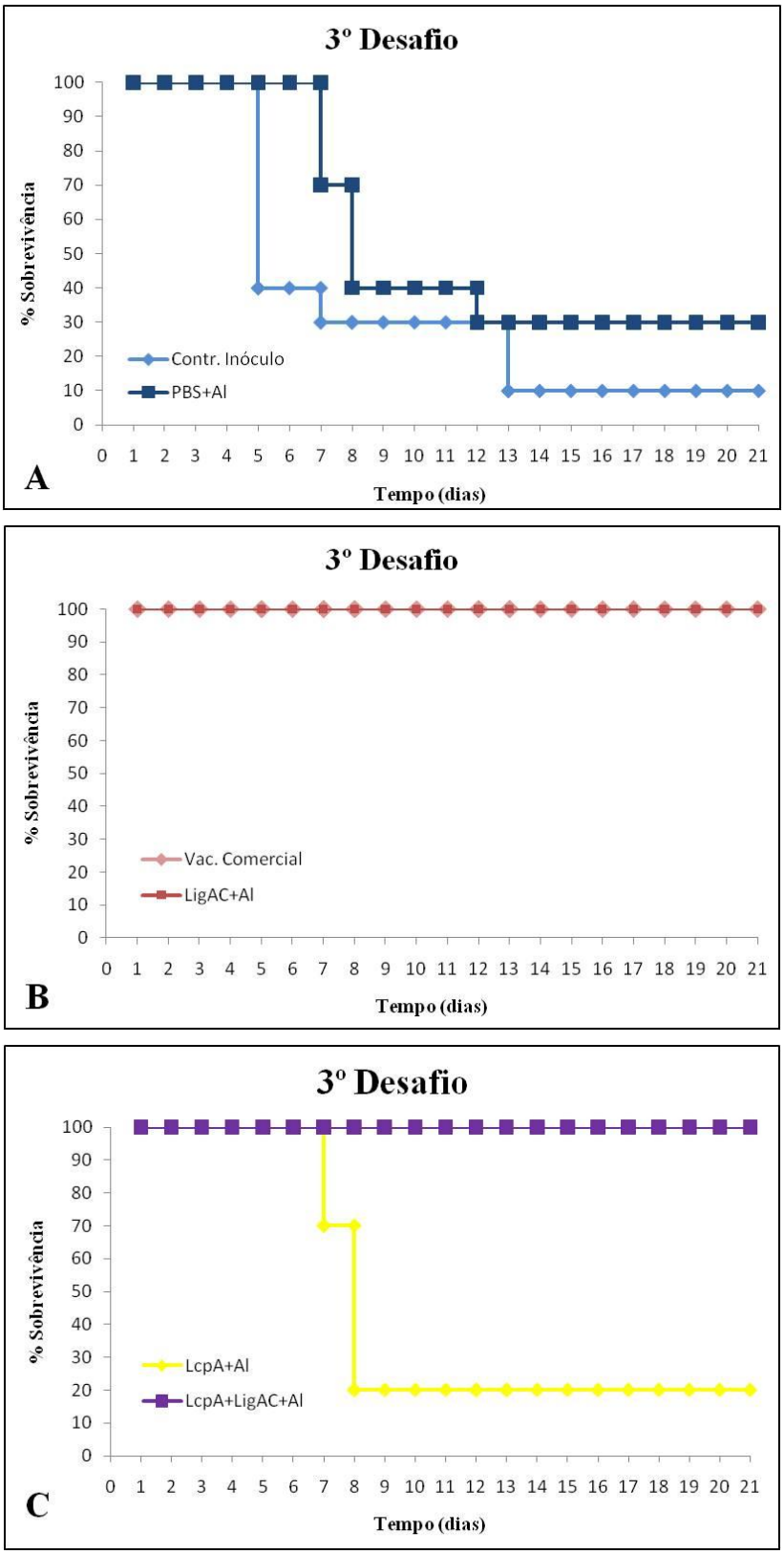
Fonte: (SILVA, L. B., 2013)

Figura 19- Porcentagem de hamsters sobreviventes 21 dias após desafio com cultura de *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe Fiocruz L1-130 virulenta no segundo desafio



Fonte: (SILVA, L. B., 2013)

Figura 20- Porcentagem de hamsters sobreviventes 21 dias após desafio com cultura de *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe Fiocruz L1-130 virulenta no terceiro desafio



Fonte: (SILVA, L. B., 2013)

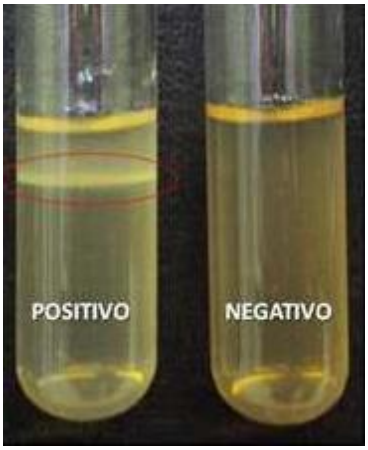
Tabela 1- Proteção conferida pela imunização de hamsters desafiados com *leptospiras*

Grupos	Animais Sobreviventes/Total				Sobrevivência
	1º Desafio	2º Desafio	3º Desafio	Somatória	
01 – Controle do Inóculo	02/10	02/10	01/10	05/30	16,6%
02 – PBS + Al(OH3)	02/10	01/10	03/10	06/30	20%
03 – Vacina Comercial	10/10	10/10	10/10	30/30	100%
04 – LigA + Al(OH3)	04/10	10/10	10/10	24/30	80%
05 – LcpA + Al(OH3)	05/10	03/10	02/10	10/30	33%
06 – LcpA + LigA + Al(OH3)	02/10	10/10	10/10	22/30	73,3%

Notas: a – Grupo não imunizado; b – Vacina comercial: informações não disponíveis.

Os animais que sobreviveram após o 21º dia do desafio foram sacrificados e necropsiados, os rins foram coletados para a detecção de leptospiras em meio semissólido de *Fletcher*. As culturas foram observadas por 28 dias e as que apresentavam crescimento visível foram consideradas como positivas (Figura 21).

Figura 21- Macerado de rim em meio semissólido de *Fletcher*



Legenda: O circulo vermelho indica o anel de crescimento bacteriano após 28 dias do inóculo.
Fonte: MONARIS, 2010.

Os animais do controle negativo que sobreviveram ao desafio foram positivos para a presença de leptospiras nos rins. Aqueles imunizados com a vacina comercial foram negativos, com exceção de uma única cultura. Os animais que sobreviveram após imunização com LigAC foram majoritariamente positivos quanto à presença de leptospiras nos rins (9% de culturas negativas, Tabela 2), ao passo que as culturas oriundas do sobreviventes após

imunização com LcpA foram majoritariamente negativas. No que diz a respeito à presença de leptospiras nos rins nos animais sobreviventes imunizados com esses dois antígenos, os resultados aproximaram-se daqueles obtidos com a LigAC isolada (14% de negatividade, Tabela 2).

Tabela 2- Cultura do macerado do rim dos animais sobreviventes ao desafio.

Grupos	**1º, 2º e 3º Ensaio**	**% de Culturas Negativas em relação aos sobreviventes**
	Sobreviventes/Total	
01 – Controle do Inóculo [a]	05/30	60%
02 – PBS + $Al(OH)_3$	06/30	67%
03 – Vacina Comercial [b]	30/30	97%
04 – LigAC + $Al(OH)_3$	24/30	9%
05 – LcpA + $Al(OH)_3$	10/30	90%
06 – LcpA + LigAC + $Al(OH)_3$	22/30	14%

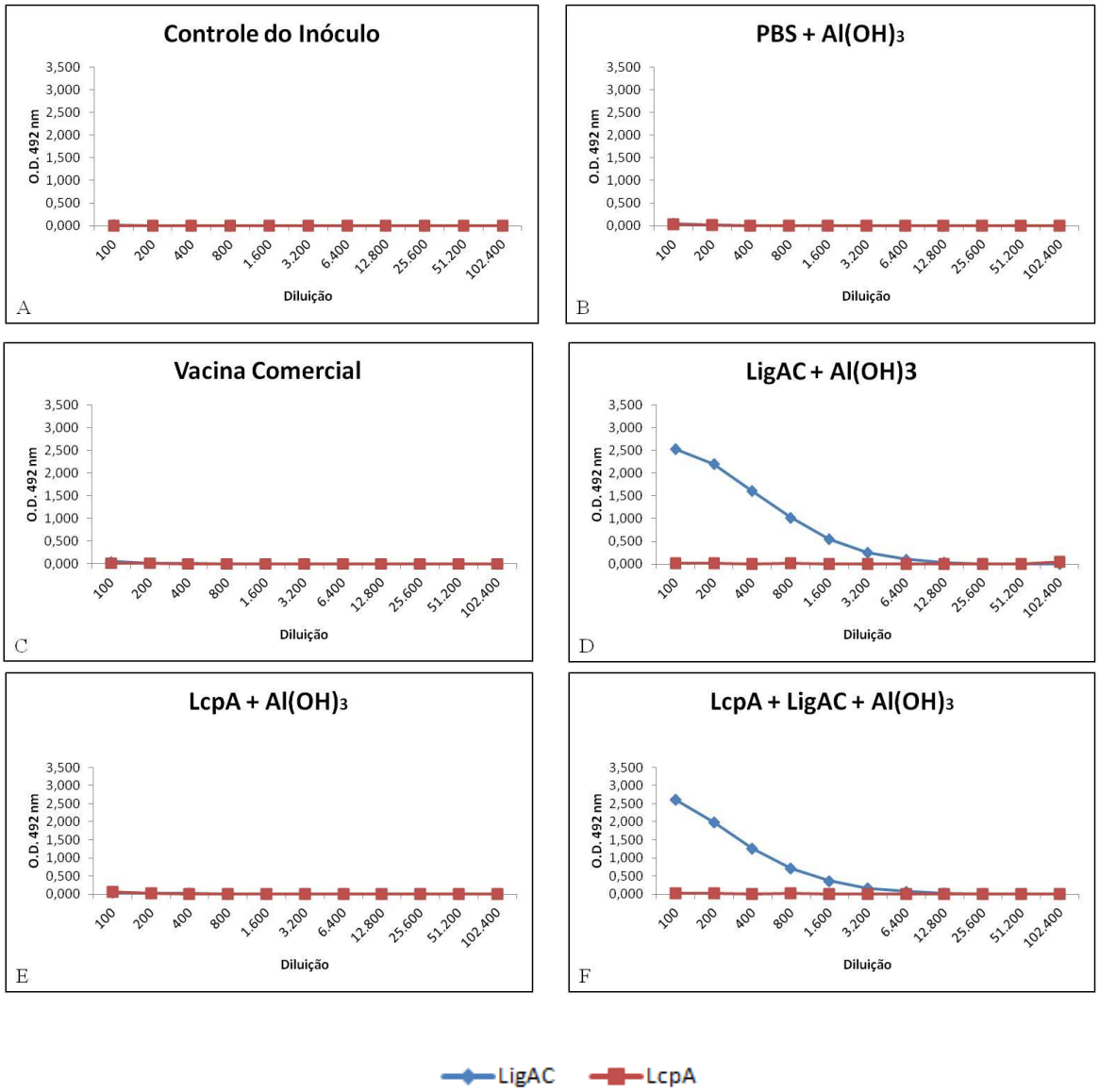
Notas: a – Grupo não imunizado; b – Vacina comercial: informações não disponíveis.

4.5.1 Avaliação da resposta humoral

A avaliação da resposta humoral foi realizada utilizando-se os soros da primeira e segunda sangria por ELISA. Os gráficos foram construídos a partir da média das absorbâncias dos três experimentos.

As curvas de titulação de IgG total dos soros dos animais dos grupos controle negativo (Controle do inóculo e PBS + $Al(OH_3)$ foram próximas a zero (Figura 22 A e B; 23 A e B). A imunização dos animais com a vacina comercial não foi capaz de induzir uma resposta imune humoral específica uma vez que o soro desses animais não reconhecem as proteínas LigAC e LcpA (Figuras 22 C e 23 C). O soro de animais imunizados com LigAC + Al $Al(OH)_3$ e LcpA + LigAC + $Al(OH)_3$ foi capaz de reconhecer a proteína LigAC, apresentando altos títulos de anticorpos (Figuras 22 D e F; 23 D e F). No entanto, o soro de animais imunizados com LcpA, na presença ou não de LigAC, não interagiu com a própria proteína LcpA recombinante, indicando que essa molécula não é imunogênica (Figuras 22 E e F, 23 E e F)Não detectou também interação com a própria proteína LcpA recombinante, o que indica que essa molécula não é imunogênica (Figuras 22 E e 23 E).

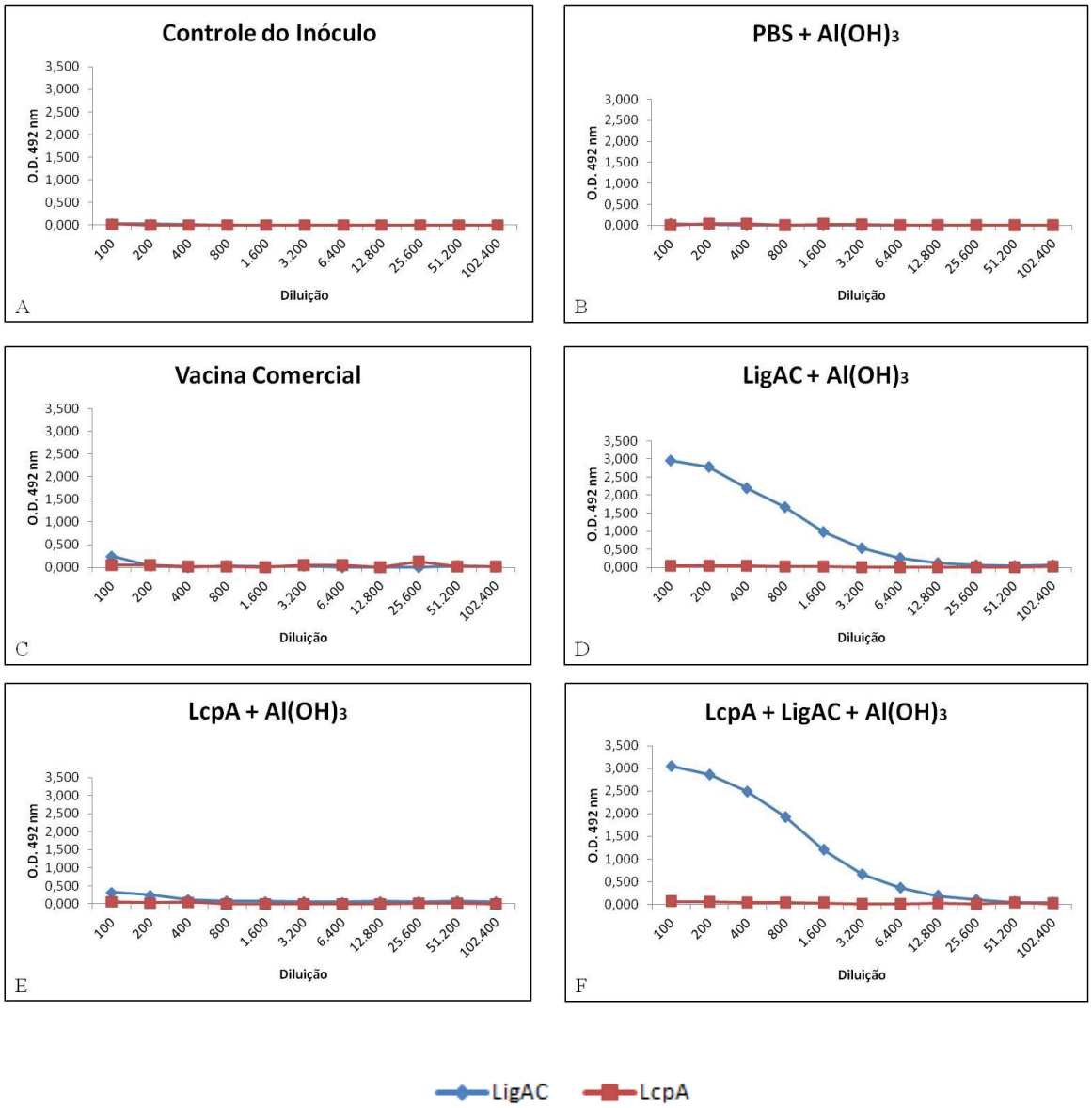
Figura 22- Curvas de titulação de IgG total obtidas por ELISA utilizando os soros da primeira sangria



Legenda: A titulação dos soros foi feita por ELISA. Os poços foram revestidos com 5 µg/mL de cada proteína recombinante purificada (LigAC ou LcpA) e incubados com diluições seriadas do soro dos animais . Os gráficos foram construídos a partir da média das absorbâncias dos três ensaios de imunização e desafio. Desvios-padrão (Apêndice D).

Fonte: (SILVA, L. B., 2013)

Figura 23- Curvas de titulação de IgG total obtidas por ELISA utilizando os soros da segunda sangria



Legenda: A titulação dos soros foi feita por ELISA. Os poços foram revestidos com 5 µg/mL de cada proteína recombinante purificada (LigAC ou LcpA) e incubados com diluições seriadas do soro dos animais . Os gráficos foram construídos a partir da média das absorbâncias dos três ensaios de imunização e desafio. Desvios-padrão (Apêndice E).

Fonte: (SILVA, L. B., 2013)

5 DISCUSSÃO

O sistema complemento é uma importante linha de defesa da imunidade inata. Quando ativado, o complemento reconhece e elimina microrganismos invasores, sendo assim benéfico ao hospedeiro. Ao longo da evolução, muitos patógenos passaram a utilizar diversas estratégias para escapar do ataque do sistema complemento e sobreviver no hospedeiro (ZIPFEL et al., 2007, 2009). A aquisição de reguladores solúveis deste sistema por patógenos representa um mecanismo de evasão imune bastante frequente. Até então, demonstrou-se que leptospiras patogênicas são capazes de se ligar a Fator H (FH), Fator H-like (FHL-1) FH-related protein 1 (FHR-1) e C4b Binding Protein (C4BP) (MERI et al., 2005; BARBOSA et al., 2009; CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012). Dentre os ligantes de FH podemos mencionar as proteína LenA/B (leptospiral endostatin-like proteins A / B) e as proteínas LigA/B (leptospiral immunoglobulin-like proteins A and B) (VERMA et al., 2006; STEVENSON et al., 2007; CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012). Como receptores de C4BP foram descritas as proteínas LcpA (leptospiral complement-regulator acquiring protein A) e LigA/B (BARBOSA et al., 2010; CASTIBLANCO-VALENCIA et al. 2012) Conhecendo-se o potencial de invasão dessas bactérias espiroquetas, é de se esperar que elas expressem uma gama de receptores de superfície envolvidos na interação com estes reguladores negativos do sistema complemento, bem como com outras moléculas do hospedeiro.

Nosso grupo caracterizou a proteína de superfície LcpA de *Leptospira,* acima mencionada. Com cerca de 20 kDa, essa proteína, codificada pela LIC11947, é uma proteína capaz de se ligar a C4BP purificado ou solúvel no soro de maneira dose-dependente. Uma vez ligado à proteína, C4BP permanece funcional agindo como co-fator de Fator I na clivagem de C4b. O gene que codifica a proteína é conservado e está presente apenas em espécies patogênicas de *Leptospira* (BARBOSA et al., 2010).

Antes do início deste trabalho dados preliminares sugeriam que, além de interagir com C4BP, LcpA também era capaz de se ligar a Fator H humano, principal regulador solúvel da via alternativa do sistema complemento. Assim sendo, optou-se por estudar essa interação em maior profundidade neste projeto de Mestrado.

O gene que codifica a proteína LcpA, LIC11947, assim como os fragmentos correspondendo às suas porções C-Terminal, Intermediária e N-Terminal haviam sido previamente clonados por nossas colaboradoras Dra. Patrícia Abreu (Laboratório de

Bacteriologia, Instituto Butantan) e Dra. Pricila Hauk (Instituto de Química , Universidade de São Paulo). Realizou-se, então, a expressão em *E.coli* e a purificação destas proteínas recombinantes. Todas elas foram expressas na fração insolúvel e, portanto, foram purificadas a partir dos corpúsculos de inclusão. Uma etapa adicional de renaturação foi necessária. As proteínas purificadas apresentaram bom grau de pureza, migrando como bandas únicas nos géis de poliacrilamida, e o rendimento foi suficiente para realização dos ensaios subsequentes.

A interação dessas proteínas com Fator H e com C4BP foi avaliada por dois métodos distintos. Nos ensaios de ELISA, tanto as porções C-Terminal quanto intermediária interagiram com FH. Vale lembrar que esses 2 fragmentos se sobrepõem parcialmente (aminoácidos 108 a 151). Por *Westen Blot* com *overlay*, observou-se interação apenas com o fragmento C-Terminal. É possível que haja dois sítios na proteína LcpA que estabeleçam contato com FH, um localizado na extremidade C-Terminal da proteína e outro na "fronteira" entre o que se designou porção intermediária e porção C-Terminal. Nos ensaios de *ELISA*, as proteínas não são desnaturadas, preservando suas estruturas de maneira mais fisiológica, fato que poderia explicar os resultados obtidos. Tentou-se realizar um mapeamento mais refinado dos sítios envolvidos nesta interação utilizando-se uma gama de peptídeos sintéticos (*JPT Peptide Technologies GmbH*) cobrindo toda a sequência da proteína LcpA. No entanto, os resultados não foram satisfatórios, pois as membranas exibiam muito "background" após as incubações, gerando resultados duvidosos.

Uma vez que esses dois reguladores solúveis do sistema complemento interagem com a porção C-Terminal da proteína LcpA, realizaram-se, a seguir, ensaios de competição com o objetivo de avaliar se ambos compartilhariam os mesmos sítios de interação com a LcpA. Os dados mostraram que FH e C4BP devem se ligar a sequências distintas desta proteína, pois quantidades crescentes de C4BP não interferiram na interação de FH com seu alvo. A aquisição simultânea de dois reguladores negativos é, sem dúvida, vantajosa para o patógeno, que passa a controlar o "ataque" mediado pelo sistema complemento por todas as vias de ativação: alternativa, clássica e das lectinas. Resultados semelhantes foram obtidos com as proteínas LigA e LigB, que também interagem com essas proteínas por sítios distintos (CASTIBLANCO-VALENCIA et. al., 2012).

A aquisição de FH por leptospiras patogênicas é crucial para a sobrevivência destas bactérias na circulação. Quando leptospiras são incubadas em soro humano depletado de FH, observa-se uma taxa de sobrevivência de cerca de 30%, quando comparada àquela observada com soro contendo 500µg/mL de FH (média de concentração sérica de FH) (ZIPFEL et al., 1999; CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012). Uma vez que se demonstrou a interação

entre FH e LcpA, tornou-se necessária avaliar a funcionalidade deste regulador ligado à proteína. Realizou-se, então, um ensaio para investigar sua atividade de co-fator de Fator I, uma serinoprotease que cliva a molécula C3b. Produtos de clivagem de 46 kDa e 43 kDa foram detectados quando a proteína LcpA foi incubada com FH e , subsequentemente, com C3b e FI, mostrando que FH permanece funcional. As clivagens foram tempo-dependentes.

Em se tratando de uma proteína com funções relacionadas ao processo de evasão ao sistema imune inato, decidiu-se realizar ensaios de desafio em modelo de hamster com a finalidade de se avaliar seu potencial imunoprotetor. Foram realizados três ensaios de desafio. Uma vacina comercial utilizada em suínos (bacterina) e a porção C-Terminal da proteína LigA (LigAC) foram utilizadas como controles positivos. Esse fragmento da proteína LigA confere proteção de 70 – 100% em modelo animal, mas os hamsters continuam portadores, eliminando leptospiras pela urina. Portanto, essa proteína não pode ser adotada como um antígeno vacinal, a menos que seja conjugada a outros antígenos ou adjuvantes que confiram imunidade esterilizante. Além disso, esse fragmento da proteína LigA não é tão conservado entre os diversos sorovares de *Leptospira* e, portanto, a cobertura de uma eventual vacina contendo essa proteína em sua formulação seria parcial. Esse fato explica os resultados obtidos no primeiro desafio realizado. Os animais foram imunizados com a proteína LigA de *L. interrogans* sorovar Copenhageni estirpe Fiocruz L1-130 e desafiados com *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Pomona Fromm. Neste primeiro desafio, heterólogo, apenas 40% dos animais imunizados com LigAC sobreviveram. Nos demais desafios, homólogos, todos os animais imunizados com esta proteína sobreviveram ao desafio.

No que diz respeito à proteína LcpA, não se observou um potencial imunoprotetor com base nos três ensaios de desafio realizados. Os ensaios de ELISA visando avaliar os títulos de anticorpos indicaram que essa proteína não é imunogênica, fato que explica os resultados dos ensaios de desafio observados. Portanto, embora interaja com moléculas do hospedeiro e pareça contribuir para o processo de evasão ao sistema imune inato, essa proteína de membrana não se mostrou promissora como candidato vacinal.

Em suma, nesse trabalho caracterizou-se a interação de uma proteína de superfície de *Leptospira*, previamente descrita como ligante de C4BP, com Fator H humano. A aquisição de C4BP por espécies patogênicas de *Leptospira* propicia o controle da ativação mediada pela via clássica do sistema complemento. Conforme mencionado, leptospiras também interagem com FH, FHL-1 e FHR-1 e, além de adquirirem tais reguladores solúveis em sua superfície, secretam proteases com capacidade de clivar moléculas das três vias de ativação do sistema

complemento (dados do grupo não publicados). Isso sugere que essas espiroquetas possuem múltiplas estratégias de evasão ao sistema imune inato do hospedeiro.

Em um primeiro momento no processo de infecção, a aquisição de FH leva à inativação do complemento na ausência de anticorpos específicos. Posteriormente, à medida que anticorpos começam a ser produzidos, a inativação da via clássica pode ocorrer em conseqüência da ação de C4BP ligado às bactérias. O controle da ativação dessas duas vias, alternativa e clássica, certamente contribuem para a sobrevivência e a disseminação dessas bactérias para diversos órgãos do hospedeiro.

A identificação de proteínas de superfície que interagem com reguladores do sistema complemento e de proteases com capacidade de inativar componentes deste sistema poderá contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e/ou preventivas que interfiram no processo de evasão imune de leptospiras patogênicas.

6 CONCLUSÕES

- ✓ A proteína de superfície LcpA de *Leptospira* interage com Fator H, o principal regulador solúvel do sistema complemento humano; essa interação envolve a porção C-terminal da proteína.

- ✓ Fator H ligado à proteína LcpA permanece funcional, exercendo o seu papel de co-fator de FI na clivagem de C3b; esse mecanismo pode auxiliar leptospiras patogênicas no processo de evasão ao sistema imune inato do hospedeiro.

- ✓ Fator H e C4b *Binding Protein* interagem simultaneamente com LcpA, utilizando sítios distintos.

- ✓ A proteína LcpA não é imunogênica e não conferiu proteção em ensaios de desafio em modelo animal; portanto, não se revelou um possível candidato vacinal contra a leptospirose.

REFERÊNCIAS

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Vet. Microbiol.,** v. 27, p. 287-296, 2010.

ATZINGEN, M.V.; BARBOSA, A.S.; DE BRITO, T.; VASCONCELLOS, S.A.; DE MORAIS, Z.M.; LIMA, D.M.; ABREU, P.A.; NASCIMENTO, A.L. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. **BMC Microbiol.,** v. 8, p. 70, 2008

BALLARD, S. A.; WILLIAMSON, M.; ADLER, B.; VINH, T.; FAINE, S. Interactions of virulent and avirulent leptospires with primary cultures of renal epithelial cells**. J. Med. Microbiol,** v. 21, p. 59-67, 1986.

BARBOSA, A. S.; ABREU, P. A.; NEVES, F. O.; ATZINGEN, M. V.; WATANABE, M. M.; VIEIRA, M. L.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 6356-6364, 2006.

BARBOSA. A. S.; ABREU, P. A.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; GONÇALES, A. P.; SILVA, A. S.; DAHA, M. R.; ISAAC, L. Immune evasion of *Leptospira* species by acquisition of human complement regulator C4BP. **Infect. Immun.,** v. 77, p. 1137-1143, 2009.

BARBOSA, A. S.; MONARIS, D.; SILVA, L. B.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; CIANCIARULLO, A. M.; ISAAC, L.; ABREU, P. A. Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of *Leptospira* spp. that binds the human complement regulator C4BP. **Infect. Immun.** v. 78, p. 3207-3216, 2010.

BARNUM, S. R. C4b-binding protein, a regulatory protein of complement. **Immunol. Res.,** v. 10, p. 28-42, 1991.

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

BLOM, A. M. Strategies developed by bacteria and virus for protection from the human complement system. **Scand J Clin Lab Invest.,** v. 64, p. 479-496, 2004a

BLOM, A. M.; VILLOUTREIX, B. O.; DAHLBACK, B. Complement inhibitor C4b-binding protein - friend or foe in the innate immune system ? **Mol Immunol.,** v.40, p. 1333-1346, 2004b.

BLOM, A. M.; VILLOUTREIX, B. O.; DAHLBACK, B. Functions of human complement inhibitor C4b-binding protein in relation to its structure. **Arch Immunol Ther.,** v. 52, p. 83-95, 2004c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica.** 6. ed., Brasília: MS, 2005. p. 816.

CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M.; FRAGA, T. R.; SILVA, L. B.; MONARIS, D.; ABREU, P. A. E.; STROBEL, S.; JÓZSI, M.; ISAAC. L.; BARBOSA. A. S. Leptospiral immunoglobulin-like proteins Interact with human complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. **J. Infect. Diseas.,** v. 205 p. 995-1004, 2012.

CHOY, H. A.; KELLEY, M. M.; CHEN, T. L.; MØLLER, A. K.; MATSUNAGA, J.; HAAKE, D. A. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. **Infect. Immun.,** v. 75, p. 2441-2450, 2007.

CINCO, M.; BANFI, E. Activation of complement by leptospires and its bactericidal activity. **Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. [A].,** v. 254, p. 261-265, 1983.

CINCO, M.; CINI, B.; PERTICARARI, S.; PRESANI, G. *Leptospira interrogans* binds to the CR3 receptor on mammalian cells. **Microb. Pathog.,** v. 33, p. 299-305, 2002.

EHLENBERGER, A. G.; NUSSENZWEIG, V. The role of membrane receptors for C3b and C3d in phagocytosis. **J. Exp. Med.,** v. 145, p. 357-371, 1977.

DELLAGOSTIN,O. A.; GRASSMANN, A. A.; HARTWING, D. D.; FÉLIX, S. R., DA SILVA, E. F.; MCBRIDE A. J. A. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Human Vaccines.,** v. 7 p. 1215-1224, 2011.

DOMINGOS, R. F.; VIEIRA M. L.; ROMERO E. C.; GONÇALES A. P.; DE MORAIS Z. M.; VASCONCELLOS S. A.; NASCIMENTO A. L. Features of two proteins of Leptospira interrogans with potential role in host-pathogen interactions. **BMC Microbiol.** v.12, p.50, 2012.

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

FRAGA, T. R.; BARBOSA. A. S.; ISAAC, L. Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. **Scand. J. of Immun.,** v. 73, p. 408-419, 2011.

GIGLI, I.; FUJITA, T.; NUSSENZWEIG, V. Modulation of the classical pathway C3 convertase by plasma proteins C4 binding protein and C3b inactivator. **Proc. Natl. Acad. Sci.,** v. 76, p. 6596-6600, 1979.

HAUK, P.; MACEDO, F.; ROMERO, E. C.; VASCONCELLOS, S. A.; DE MORAIS, Z. M., BARBOSA, A. S.; HO, P. L. In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin.**Infect. Immun.** v. 76, p. 2642-2650, 2008.

HOKE, D. E.; EGAN, S.; CULLEN, P. A.; ADLER, B. LipL32 is an Extracellular Matrix-Interacting Protein of *Leptospira* and *Pseudoalteromonas tunicata*. **Infect. Immun.,** v. 76, p. 2063-2069, 2008.

JÓZSI, M.; ZIPFEL. P. F. Factor H family proteins and human diseases. **Trends in immunol.** v. 29, p. 380-387, 2008.

KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. *Leptosira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nat. Rev. Microbiol.,** v. 7, p. 736-747, 2009.

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

MERI, S.; JARVA, H. Complement regulatory proteins. Encyclopedia of Life Sciences. London, Uk. Macmillan Refer., 2001

MERI, T.; CUTLER, S. J.; BLOM, A. M.; MERI, S.; JOKIRANTA, T. S. Relapsing fever spirochetes *Borrelia recurrentisn* and *Borrelia duttonii* acquire complement regulatory C4b-binding protein and Factor H. **Infect. Immun.,** v. 74, p. 4157-4163, 2006.

MERI, T.; MURGIA, R.; STEFANEL, P.; MERI, S.; CINCO, M. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant Leptospires. **Microb. Pathog.**, v. 39, p. 139-147, 2005.

MERIEN, F.; TRUCCOLO, J.; BARANTON, G.; PEROLAT, P. Identification of a 36-kDa fibronectin-binding protein expressed by a virulent variant of *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. **FEMS Microbiol. Lett.,** v. 185, p. 17-22, 2000.

MISASI, R.; HUEMER, H. P.; SCHWAEBLE, W.; SOLDER, E.; LARCHER, C.; DIERICH, M. P. Human complement factor H: an additional gene product of 43 kDa isolated from human plasma shows cofactor activity for the cleavage of the third component of complement. **Eur. J. Immunol.,** v. 19, p. 1765-1768, 1989

MORGAN, B. P; HARRIS, C. L. Complement regulatory proteins. California, USA. Academic Press,1999.

MORGAN, B. P.; MARCHBANK, K. J.; LONGHI, M. P.; HARRIS, C. L.; GALLIMORE, A. M. Complement central to innate immunity and bridging to adaptative responses. **Immunol. Lett.** v. 97, p. 171-179, 2005.

NABITY, S.A; RIBEIRO, G.S.; AQUINO, C.L.; TAKAHASHI, D.; DAMIÃO, A.O.; GONÇALVES, A.H.O.; MIRANDA, D.B.; GREENWALD, R.; ESFANDIARI, J.; LYASHCHENKO, K.P.; REIS, M.G., MEDEIROS, M.A.; KO, A.I. Accuracy of a Dual Path Platform (DPP) Assay for the Rapid Point-of-Care Diagnosis of human Leptospirosis. **Plos Negl. Trop. Diseases.** v. 6,p. e1878, 2012.

OLIVEIRA R.; DE MORAIS Z. M.; GONÇALES A.P.; ROMERO E. C.; VASCONCELLOS S. A.; NASCIMENTO A. L. Characterization of novel OmpA-like protein of *Leptospira interrogans* that binds extracellular matrix molecules and plasminogen. **PLoS One.** v. 6(7):e21962, 2011.

PINNE M, CHOY HA, HAAKE DA. The OmpL37 surface-exposed protein is expressed by pathogenic *Leptospira* during infection and binds skin and vascular elastin. **PLoS Negl Trop Dis.**, v.4, n. 9, p. e815, 2010.
RISTOW, P.; BOURHY, P.; KERNEIS, S.; SCHMITT, C.; PREVOST, M. C.; LILENBAUM, W.; PICARDEAU, M. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. **Microbiol.,** v. 154, p. 1309-1317, 2008.

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

SCHNEIDER, M. C.; EXLEY, R. M.; RAM, S.; SIM, R. B.; TANG, C. M. Interactions between *Neisseria meningitidis* and the complement system. **Trends Microbiol.,** v. 15, p. 233-240, 2007.

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 conferes proctetive immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccines.,** v. 25, p. 6277-6286, 2007.

STEVENSON, B.; CHOY, H. A.; PINNE, M.; ROTONDI, M. L.; MILLER, M. C.; DEMOLL, E.; KRAICZY, P.; COOLEY, A. E.; CREAMER, T. P.; SUCHARD, M. A.; BRISSETTE, C. A.; VERMA, A.; HAAKE, D. A. *Leptospira interrogans* Endostatin-Like Outer Membrane Proteins Bind Host Fibronectin, Laminin and Regulators of Complement. **PLoS ONE.,** v. 2, p. e1188, 2007.

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

TSUCHIMOTO, M.; NIIKURA, M.; ONO, E.; KIDA, H.; YANAGAWA, R. Leptospiral attachment to cultured cells. **Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. [A].** v. 258, p. 268-274, 1984.

VERMA, A.; BRISSETTE, C. A.; BOWMAN, A. A.; SHAH, S.T.; ZIPFEL, P. F.; STEVENSON, B. Leptospiral endostatin-like protein A is a bacterial cell surface receptor for human plasminogen. **Infect. Immun.** v. 78, p. 2053-2059, 2010.

VERMA, A.; HELLWAGE, J.; ARTIUSHIN S.; ZIPFEL, P. F.; KRAICZY, P.; TIMONEY, J. F.; STEVENSON, B. LfthA, a novel factor H-binding proteins of *Leptospira interrogans*. **Infect. Immun.,** v. 74, p. 2659-2666, 2006.

VIEIRA M.L.; DE MORAIS Z.M.; GONÇALES A.P.; ROMERO E.C.; VASCONCELLOS S.A.; NASCIMENTO A. L. Lsa63, a newly identified surface protein of Leptospira interrogans binds laminin and collagen IV. **J Infect.,** v. 60, p. 52-64, 2010.

VINH, T.; FAINE, S.; ADLER, B. Adhesion of leptospires to mouse fibroblasts (L929) and its enhancement by specific antibody. **J. Med. Microbiol.,** v. 18, p. 73-85, 1984.

WALPORT, M. J. First of two parts. **N. Engl. J.M.,** v. 344, p. 1058-1066, 2001.

WANG, Z.; JIN, L.; WERGRZYN, A. Leptospirosis vaccines. **Microb. Cell Fact.,** v. 6, p. 39, 2007.

WEILER, J. M.; DAHA, M. R.; AUSTEN, K. F.; FEARON, D. T. Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein beta1H. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,** v. 73, p. 3268-3272, 1976.

ZIPFEL, P. F.; JOKIRANTA, T. S.; HELLWAGE, J.; KOISTINEN, V.; MERI, S. The factor H protein family. **Immunopharmacol.,** v. 42, p. 53-60, 1999.

ZIPFEL, P. F.; SKERKA, C. Complement regulators and inhibitory proteins. **Nat. Rev. Immunol.** v. 9, p. 729-740, 2009.

ZIPFEL, P. F.; WURZNER, R.; SKERKA, C. Complement evasion of pathogens: common strategies are shared by diverse organisms.**Mol. Immunol.** v. 44, p. 3850-3857, 2007.

APÊNDICE A- Cálculo DL 50 (segundo desafio)

Cálculo DL_{50} do 1° desafio (*L. interrogans* sorovar Copenhangi estirpe Fiocruz L1-130)

Diluição	*Número de leptospiras (N)*	*S*	*M*	*Freqüências acumuladas*			*% cumulativa de mortes d=c/(b+c)*
				S(b)	*M(c)*	*Total (b+c)*	
Pura	10^7	2	3	2	9	11	81,81
10^{-1}	10^6	4	1	6	6	12	72
10^{-2}	10^5	4	1	10	5	15	33,33
10^{-3}	10^4	4	1	14	4	18	22,22
10^{-4}	10^3	4	1	18	3	21	14,28
10^{-5}	10^2	3	2	21	1	22	4,54

N = número de leptospiras por dose
S = número de animais sobreviventes à infecção por *L. interrogans* Copenhageni
M = número de animais sobreviventes à infecção por *L. interrogans* Copenhageni
Os animais foram inoculados com 200µl da cultura ($2x10^5$ leptospiras/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%

$$D= \frac{(50,00 – 22,22)}{(72,00 – 22,22)} = 0,55^*$$

* Cálculo considerando o grupo mais próximo de mortes cumulativas de 50% (marcada em amarelo).
Cálculo da DL_{50} em número de leptospiras: $Log_{10}(DL_{50}) = log_{10}(a) + [D \times log_{10}(d)]$

Sendo:
DL_{50}= 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

$Log_{10}(DL_{50}) = log_{10}(10^4) + [0,55 \times log_{10}(10)] = 4,55$

$DL_{50} = \sim 3 \times 10^4$ leptospiras

APÊNDICE B- Cálculo DL 50 (terceiro desafio)

Cálculo DL_{50} do 1° desafio (*L. interrogans* sorovar Copenhangi estirpe Fiocruz L1-130)

Diluição	*Número de leptospiras (N)*	*S*	*M*	*Freqüências acumuladas*			*% cumulativa de mortes d=c/(b+c)*
				S(b)	*M(c)*	*Total (b+c)*	
Pura	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 mortes pela infecção por *L. interrogans* Copenhageni
Os animais foram inoculados com 200µl da cultura ($2x10^5$ leptospiras/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%

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

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

Cálculo da DL_{50} em número de leptospiras: $Log_{10}(DL_{50}) = log_{10}(a) + [D \times log_{10}(d)]$

Sendo:
DL_{50}= 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

$Log_{10}(DL_{50}) = log_{10}(10^5) + [0,48 \times log_{10}(10)] = 4,48$

$DL_{50} = \sim 3 \times 10^4$ leptospiras

APÊNDICE C – Desvios-padrão das médias

Análise da interação das proteínas recombinantes com FH e C4BP (Figura 14)

Fator H	LcpA	N-Terminal	Intermediária	C-Terminal	10301	BSA
0	0,009	0,000	0,048	0,003	0,006	0,007
0,625	0,045	0,003	0,076	0,059	0,004	0,019
1,25	0,065	0,011	0,082	0,082	0,010	0,022
2,5	0,125	0,017	0,218	0,093	0,018	0,050
5	0,261	0,026	0,590	0,357	0,012	0,074

C4BP	LcpA	N-Terminal	Intermediária	C-Terminal	10301	BSA
0	0,030	0,006	0,014	0,021	0,005	0,023
0,625	0,122	0,015	0,075	0,048	0,025	0,028
1,25	0,077	0,006	0,051	0,021	0,018	0,038
2,5	0,235	0,048	0,043	0,156	0,016	0,091
5	0,260	0,116	0,204	0,319	0,023	0,041

APÊNDICE D- Desvios-padrão das médias das curvas de titulação do primeira sangria (Figura 22)

Controle do Inóculo		**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
A	LigAC	0,098	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,025
B	LcpA	0,018	0,013	0,009	0,005	0,003	0,002	0,000	0,004	0,000	0,000	0,002
		100	**200**	**400**	**800**	**1.600**	**3.200**	**6.400**	**12.800**	**25.600**	**51.200**	**102.400**

PBS + Al(OH)3		**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
A	LigAC	0,027	0,023	0,016	0,008	0,005	0,002	0,025	0,000	0,000	0,000	0,000
B	LcpA	0,015	0,017	0,012	0,011	0,005	0,003	0,006	0,002	0,010	0,001	0,003
		100	**200**	**400**	**800**	**1.600**	**3.200**	**6.400**	**12.800**	**25.600**	**51.200**	**102.400**

Vacina Comercial		**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
A	LigAC	0,056	0,025	0,014	0,024	0,002	0,004	0,000	0,000	0,000	0,008	0,043
B	LcpA	0,011	0,013	0,006	0,002	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,003	0,063
		100	**200**	**400**	**800**	**1.600**	**3.200**	**6.400**	**12.800**	**25.600**	**51.200**	**102.400**

LigAc + Al(OH)3		**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
A	LigAC	0,942	1,169	1,115	0,831	0,476	0,223	0,110	0,037	0,003	0,000	0,013
B	LcpA	0,020	0,010	0,008	0,026	0,002	0,000	0,012	0,000	0,000	0,000	0,051
		100	**200**	**400**	**800**	**1.600**	**3.200**	**6.400**	**12.800**	**25.600**	**51.200**	**102.400**

LcpA + Al(OH)3		**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
A	LigAC	0,022	0,025	0,022	0,011	0,002	0,002	0,000	0,000	0,001	0,000	0,003
B	LcpA	0,064	0,017	0,006	0,005	0,006	0,001	0,008	0,001	0,009	0,000	0,000
		100	**200**	**400**	**800**	**1.600**	**3.200**	**6.400**	**12.800**	**25.600**	**51.200**	**102.400**

LcpA + LigAc + Al(OH)3		**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
A	LigAC	0,216	0,403	0,374	0,239	0,149	0,055	0,026	0,017	0,011	0,008	0,006
B	LcpA	0,018	0,020	0,008	0,016	0,002	0,001	0,001	0,000	0,000	0,000	0,006
		100	**200**	**400**	**800**	**1.600**	**3.200**	**6.400**	**12.800**	**25.600**	**51.200**	**102.400**

APÊNDICE E- Desvios-padrão das médias das curvas de titulação do segunda sangria (Figura 23)

Controle do Inóculo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	LigAC	0,058	0,044	0,014	0,004	0,003	0,000	0,000	0,000	0,012	0,055	0,000
B	LcpA	0,024	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,035	0,007
		100	**200**	**400**	**800**	**1.600**	**3.200**	**6.400**	**12.800**	**25.600**	**51.200**	**102.400**

PBS + Al(OH)3		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	LigAC	0,047	0,032	0,020	0,006	0,014	0,011	0,017	0,002	0,000	0,000	0,000
B	LcpA	0,009	0,055	0,065	0,017	0,051	0,024	0,007	0,012	0,013	0,000	0,008
		100	**200**	**400**	**800**	**1.600**	**3.200**	**6.400**	**12.800**	**25.600**	**51.200**	**102.400**

Vacina Comercial		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	LigAC	0,029	0,038	0,422	0,018	0,011	0,031	0,007	0,726	0,016	0,058	0,020
B	LcpA	0,042	0,081	0,027	0,025	0,013	0,054	0,072	0,000	0,225	0,030	0,033
		100	**200**	**400**	**800**	**1.600**	**3.200**	**6.400**	**12.800**	**25.600**	**51.200**	**102.400**

LigAc + Al(OH)3		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	LigAC	0,276	0,547	0,874	0,814	0,491	0,275	0,128	0,072	0,051	0,036	0,026
B	LcpA	0,039	0,049	0,039	0,035	0,033	0,006	0,007	0,007	0,016	0,004	0,005
		100	**200**	**400**	**800**	**1.600**	**3.200**	**6.400**	**12.800**	**25.600**	**51.200**	**102.400**

LcpA + Al(OH)3		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	LigAC	0,429	0,149	0,106	0,095	0,085	0,105	0,078	0,091	0,088	0,092	0,104
B	LcpA	0,019	0,018	0,049	0,006	0,014	0,001	0,001	0,000	0,035	0,032	0,002
		100	**200**	**400**	**800**	**1.600**	**3.200**	**6.400**	**12.800**	**25.600**	**51.200**	**102.400**

LcpA + LigAc + Al(OH)3		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	LigAC	0,127	0,250	0,466	0,617	0,458	0,308	0,186	0,085	0,046	0,030	0,029
B	LcpA	0,054	0,042	0,036	0,048	0,039	0,007	0,013	0,033	0,007	0,056	0,013
		100	**200**	**400**	**800**	**1.600**	**3.200**	**6.400**	**12.800**	**25.600**	**51.200**	**102.400**