Enéas de Carvalho

Análise das proteínas de *Leptospira* com possível papel hemolítico através de expressão recombinante: detecção de expressão nativa, atividade biológica e potencial vacinal.

São Paulo

2008

Enéas de Carvalho

Análise das proteínas de *Leptospira* com possível papel hemolítico através de expressão recombinante: detecção de expressão nativa, atividade biológica e potencial vacinal.

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências, na Área de Genética e Biologia Evolutiva.

Orientador: Dr. Paulo Lee Ho

São Paulo

2008

Ficha Catalográfica

Carvalho, Eneas

Análise das proteínas de *Leptospira* com possível papel hemolítico através de expressão recombinante: detecção de expressão nativa, atividade biológica e potencial vacinal.

100 pp

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. *Leptospira* 2. Leptospirose 3. Vacina
I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências.
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a) Dr(a)

Prof(a) Dr(a)

Prof(a) Dr(a)

Prof(a) Dr(a)

Prof(a) Dr(a)

à minha Família...

(a inovação é essencial) para conseguirmos tecnologia para fabricar a um preço muito baixo. (...) E para ter inovação é preciso ter pesquisador que faz pesquisa básica.

A convivência entre pesquisa básica e pesquisa aplicada é fundamental.

*O mundo não vai ser mais social ou socialista,
mas precisa ser socialmente responsável de algum jeito.*

Professor Isaias Raw

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Paulo Lee Ho, um exemplo de cientista produtivo, responsável, abnegado e justo, cujas influências sempre levarei comigo em minha vida acadêmica. Agradeço a oportunidade de doutoramento, por todos os ensinamentos e pela amizade.

À Dra. Toshie Kawano, minha querida chefe, que permitiu que eu terminasse meus estudos de doutoramento mesmo tendo sido designado como Pesquisador Científico do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan. Obrigado pelo carinho constante.

Ao Dr. Inácio de Loiola Meirelles Junqueira de Azevedo, meu grande amigo, quem primeiro me trouxe ao “mundo Butantan”. Obrigado por todas as oportunidades e pela amizade.

À Dra. Maria Leonor Sarno de Oliveira, que gentilmente – como lhe é característico – me auxiliou na manipulação de animais de laboratório em todos os experimentos, além da agradável convivência no laboratório.

Ao Prof. Silvio de Arruda Vasconcellos da FMVZ, pela colaboração nos experimentos de desafio e nos cultivos de *Leptospira*.

Às Dras. Angela Silva Barbosa e Patrícia Estima Abreu, amigas que muito auxiliaram no decorrer do meu doutoramento.

Ao Dr. Ricardo Gomes pela colaboração nos experimentos de detecção de expressão de proteínas *in vivo*.

Ao Dr. Lincoln Suesdek da Rocha, meu parceiro de pesquisa na Parasitologia, por todo o apoio e pela grande amizade.

A todas as pessoas do laboratório e dos laboratórios próximos. Cada um, de sua maneira e com uma intensidade, se tornaram meus amigos e me auxiliaram no período do doutoramento.

A todo o pessoal da Parasitologia, por sempre me bem receberem.

A todos os funcionários do Instituto Butantan, que proporcionam um ambiente excepcional de trabalho.

A todos os amigos e funcionários do Instituto de Biociências.

Aos amigos do Laboratório de zoonoses bacterianas da FMVZ, principalmente Zenaide, Amane e Gisele, por toda a ajuda com o cultivo de *Leptospira* e nos experimentos de desafio.

Aos amigos que sempre me apóiam, mesmo que à distância.

À FAPESP e CNPq, pelo auxílio concedido em forma de bolsa no início deste projeto e suporte financeiro durante a execução. Agradeço também o suporte financeiro da Fundação Butantan.

Um agradecimento especial para minha Família, por todo o amor, carinho e apoio.

Por fim, obrigado Glaucia, por todos os momentos ao meu lado, sempre com muito amor, carinho, apoio e paciência.

ÍNDICE

I	Introdução	01
	1. Biologia das leptospiiras	01
	2. Leptospirose	03
	2.1. Meios de infecção e epidemiologia	03
	2.2. Características clínicas em humanos e imunidade	07
	2.3. Diagnóstico	08
	2.4. Vacinas	09
	3. Seqüenciamento do genoma de leptospiiras	11
	4. Hemolisinas	13
	5. Vacinas antitoxinas	15
II	Objetivos	17
II	Materiais e Métodos	18
	Escolha dos candidatos vacinais	18
	Inferências filogenéticas	18
	Obtenção e cultivo de cepas de <i>Leptospira</i>	19
	Isolamento do DNA e amplificação dos genes de interesse	19
	Extração de RNA e análise do cDNA	20
	Clonagem	21
	Obtenção de proteínas recombinantes	23

Purificação das proteínas recombinantes	24
Díálise das amostras purificadas	25
Obtenção de antisoros	25
Eletroforese de proteínas	26
<i>Western blot</i>	26
Titulação dos soros	27
Detecção da expressão de proteínas de <i>Leptospira</i> durante a infecção em hamsters	28
Dicroísmo circular	28
Ensaio hemolítico	28
Adesão a componentes de matriz extracelular (MEC)	30
Curvas de dose-resposta	31
Inibição competitiva da adesão ao fragmento F30 com heparina	31
Adesão à laminina em condições de oxidação crescente	31
Inibição da adesão de <i>Leptospira</i> ao Matrigel	32
Desafio animal	33
 IV Resultados	 34
Alguns genes escolhidos possuem domínios relacionados à hemólise	34
Bactérias não patogênicas possuem ortólogos dos genes escolhidos.	34
Sete das proteínas recombinantes foram expressas e purificadas	40
Integridade estrutural das proteínas recombinantes	40

Fatores secretados por <i>Leptospira</i> patogênica são hemolíticos	44
Nenhuma das proteínas recombinantes possui atividade hemolítica	44
TlyC liga-se a componentes da matriz extracelular (MEC)	49
TlyC parcialmente inibe a adesão de <i>Leptospira</i> ao Matrigel	54
Expressão das proteínas por <i>Leptospira</i>	57
Reconhecimento cruzado por diferentes antisoros	57
O soro de pacientes reconhece Sph2 e TlyC	63
Nenhuma proteína testada foi protetora em um desafio animal	63
Resumo dos resultados obtidos	64
 V Discussão	 71
 VI Conclusões	 84
 VII Resumo	 86
 VIII <i>Abstract</i>	 87
 IX Referências bibliográficas	 88

I – INTRODUÇÃO

1. Biologia das leptospiros

As leptospiros são bactérias gram negativas, de formato alongado e espiralado (FAINE *et al.* 1999) (Figura 1). Possuem dois flagelos, um em cada uma de suas extremidades, que se encontram imersos no espaço periplasmático, ao contrário do que acontece com a maioria das bactérias; a rotação destes flagelos induz alterações morfológicas (como o característico formato de gancho) que permitem a mobilidade das leptospiros em ambientes aquosos ou mesmo com consistência gelatinosa (WOLGEMUTH *et al.* 2006). As leptospiros pertencem às espiroquetas, um grupo primitivo de bactérias (PASTER *et al.* 1991), no qual são encontrados tanto gêneros de vida exclusivamente livre (e.g. *Spirochaeta*), como gêneros exclusivamente dependentes de hospedeiros (e.g. *Borrelia*) (PASTER e DEWHIRST 2000). As leptospiros são o único gênero patogênico de espiroquetas que também é capaz de sobreviver no meio ambiente, fora do hospedeiro (VINETZ 2001). O gênero *Leptospira* é composto de cerca de 19 espécies, e estas espécies são subagrupadas em mais de 260 sorovares (BRENNER *et al.* 1999). De fato, embora a classificação em espécies seja baseada na similaridade de DNA (acessada por hibridação diferencial), a classificação sorológica (sorovar), em que um antisoro é utilizado para estabelecer uma relação antigênica, continua sendo utilizada, devido à sua utilidade clínica (BHARTI *et al.* 2003). Existe uma grande divisão no gênero *Leptospira*: (1) as leptospiros saprofíticas, de vida livre; (2) as leptospiros patogênicas; e (3) as

leptospiras intermediárias, cuja patogenicidade ainda é indeterminada (MOREY *et al.* 2006). De qualquer maneira, esta divisão com base no modo de vida das leptospiras parece refletir o desenvolvimento de três linhagens filogenéticas distintas (monofiléticas) (LETOCART *et al.* 1999; MOREY *et al.* 2006). Hipotetiza-se que as leptospiras de vida livre sejam as bactérias ancestrais e que, portanto, a capacidade de viver em hospedeiros tenha sido adquirida posteriormente neste gênero (FAINE *et al.* 1999). A análise do genoma destas bactérias mostra diferenças entre os genes que podem ser atribuídas a esta nova habilidade adquirida na evolução deste gênero (PICARDEAU *et al.* 2008).

Figura 1: Microscopia eletrônica de varredura de dois espécimes de *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae aderidos a uma membrana de filtração de 0,2 µm. Reproduzido de Levett (2001).

De acordo com Faine *et al.* (1999), as diversas espécies e sorovores de *Leptospira* patogênicas são, de uma maneira geral, adaptadas a um determinado

hospedeiro ou a um número pequeno de hospedeiros (chamados hospedeiros definitivos ou reservatórios). No entanto, é comum que leptospiros adaptadas aos seus hospedeiros definitivos também sejam capazes de infectar outros hospedeiros (chamados hospedeiros incidentais ou ocasionais). As características da infecção são diferenciadas entre os hospedeiros definitivos e os hospedeiros ocasionais: nos definitivos, a infecção tende a gerar sintomas leves por um curto período de tempo, ou mesmo nenhum sintoma, até que se estabeleça nos túbulos renais do animal, onde geralmente as bactérias permanecem por toda a vida dos animais; já no caso de hospedeiros ocasionais, os sintomas tendem a ser mais intensos, e a infecção pode resultar em morte do hospedeiro (FAINE *et al.* 1999). Aparentemente, a ruptura da associação adaptativa entre hospedeiro definitivo e patógeno é a responsável pelos efeitos desregulados da infecção no hospedeiro ocasional.

2. Leptospirose

2.1 Meios de infecção e epidemiologia

A leptospirose é causada pela infecção por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*. Segundo Levett (2001), os maiores reservatórios de leptospiros na natureza são os hospedeiros definitivos, que geralmente são infectados por via direta, através do contato com fluidos provenientes de animais contaminados. Estes contatos podem ocorrer em uma gama variada de situações: durante o desenvolvimento uterino, no ninho, no contato sexual, durante a alimentação em grupo, etc. Por outro lado, a contaminação de hospedeiros

incidentais é rara, e tais hospedeiros não parecem possuir papel significativo na manutenção das leptospiros na natureza. Ao contrário do que acontece nos hospedeiros definitivos, a contaminação incidental geralmente é indireta, através do contato com fatores ambientais (e.g. solo, água, lama) contaminados por fluidos de animais reservatórios infectados. As portas de entrada mais comuns pelas quais as leptospiros penetram em seus hospedeiros são a pele, as conjuntivas e as mucosas em geral. Para a penetração através da pele, é necessário que esta possua abrasões, cortes ou arranhões; embora a penetração em pele íntegra imersa por muito tempo na água também tenha sido observada, este fenômeno pode estar ligado à fácil ocorrência de abrasões quando a pele é exposta a este tratamento (FAINE *et al.* 1999).

Atualmente, a leptospirose é considerada a zoonose mais difundida do mundo (SMYTHE 1999), assim como uma doença reemergente (VINETZ 2001). Acometendo praticamente todos os mamíferos (FAINE *et al.* 1999), ela também é observada em répteis (GLOSSER *et al.* 1974; HYAKUTAKE *et al.* 1980) e anfíbios (DIESCH *et al.* 1967; EVERARD *et al.* 1988). Até mesmo aves podem apresentar sorologia para leptospirose (EVERARD *et al.* 1985). Uma vez que os animais reservatórios continuam excretando leptospiros por toda a vida na sua urina, a contaminação de hospedeiros incidentais é recorrente. O ser humano, que aparentemente não se comporta como hospedeiro definitivo de nenhuma leptospiros, é constantemente acometido por leptospirose, podendo ser contaminado por diversos sorovares (FAINE *et al.* 1999). Animais de importância econômica (e.g. gado, cavalos, ovelhas, porcos) e domésticos também são

constantemente contaminados por leptospiros das quais não são hospedeiros definitivos, o que lhes ocasiona, portanto, sintomas mais intensos (LEVETT 2001).

A leptospirose humana é um modelo de uma doença infecciosa em que a globalização e inigualdades sociais produziram padrões epidemiológicos divergentes para os pobres e ricos (MCBRIDE *et al.* 2005). Faine *et al.* (1999) definiram três padrões epidemiológicos para a leptospirose: (1) em regiões temperadas, onde poucos sorovares estão envolvidos e a exposição está geralmente relacionada a fatores ocupacionais, como a criação de gado ou a esportes aquáticos; (2) em regiões tropicais úmidas, onde existem muitos sorovares infectando homens e animais, e existe um grande número de espécies reservatórios, incluindo roedores, animais de fazenda e cães; nestas regiões, a exposição não se limita a fatores ocupacionais, estando ligada majoritariamente a uma ampla contaminação ambiental, particularmente nas épocas de chuva, e às enchentes, que tendem a espalhar material contaminado por um grande raio em relação ao foco central; (3) em ambientes urbanos, associada principalmente à grande população de roedores encontrada nas cidades.

A ocorrência da leptospirose obedece a um padrão sazonal (LEVETT 2001). Em climas temperados, o número de casos diminui no inverno, uma vez que existe uma grande mortalidade de leptospiros em baixas temperaturas. Já nos climas tropicais a incidência aumenta no período de chuvas, devido às enchentes e ao aumento da sobrevivência das leptospiros em contraste com o período mais seco.

A incidência de leptospirose em regiões tropicais úmidas é grandemente aumentada por dois motivos principais (LEVETT 2001): primeiramente porque as leptospirosas não resistem ao ressecamento e tendem a permanecer mais tempo vivas em ambientes úmidos, aumentando a chance de contágio; o segundo motivo reside no fato de haver uma maior incidência de países em desenvolvimento em regiões tropicais. Nestes países, o número de pessoas vivendo com baixa renda e em condições precárias é elevado, aproximando-os muitas vezes de contato com lixo, com roedores e com esgotos. De fato, estima-se que a incidência de leptospirose em países tropicais seja cerca de 10 a 100 vezes maior que em países temperados (WORLDWATERDAY 2001). No Brasil, foi relatado ao SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) uma média de 3400 casos por ano na década de 1995 a 2005, com um total de 350 mortes anuais. No entanto os números de casos de leptospirose são sempre subestimados, uma vez que a leptospirose é constantemente confundida com outras doenças (devido à profusão de sintomas inespecíficos) e que somente os casos mais graves exigem hospitalização (BHARTI *et al.* 2003).

A leptospirose possui, portanto, um grande impacto médico e econômico. Esta afirmação é baseada no grande número de casos (2 casos/100.000 habitantes/ano no Brasil, 1995 – 2005, segundo o SINAN), na elevada mortalidade (~10% no Brasil, 1995 – 2005), na necessidade de internação e de cuidados intensivos nos casos graves e mesmo na diminuição de produtividade e faltas no trabalho (em decorrência de dores, febre e mal estar) nos casos mais suaves. Além disso, a leptospirose acarreta um grande prejuízo veterinário, uma

vez que causa mortalidades, queda de peso do rebanho, diminuição da produção de leite e abortos (FAINE *et al.* 1999).

2.2 Características clínicas em humanos e imunidade

Em humanos, segundo Levett (LEVETT 2001), a leptospirose pode se desenvolver de duas maneiras: a amena, também chamada anictérica ou a severa, também chamada ictérica. Na forma amena, que caracteriza a grande maioria dos casos (~ 90%), a infecção é subclínica ou possui sintomas muito suaves, e os pacientes geralmente não precisam de atenção médica. Os sintomas mais comuns desta apresentação da doença são inespecíficos, e incluem febre, dores de cabeça e no corpo. Na forma amena, a mortalidade é praticamente nula, e geralmente os sintomas regredem naturalmente em uma semana.

Já na forma severa, que acomete cerca de 10% dos infectados, os sintomas passam por aqueles descritos na forma amena para complicações mais sérias, que incluem disfunção renal, fenômenos hemorrágicos, alterações hemodinâmicas, cardíacas, pulmonares e até de consciência. A mortalidade dos pacientes acometidos com esta forma da doença varia entre 5 a 20% dos casos.

Os fatores que levam a infecção a se desenvolver de maneira amena ou severa não são totalmente claros. No entanto, existem evidências de que a quantidade de leptospiras que penetra o organismo é determinante da direção que a infecção tomará (FAINE *et al.* 1999). Outro fator que parece ser decisivo é a virulência da linhagem infectante, que outrora fora correlacionada a determinados sorovares, embora nenhuma evidência populacional confirme tal associação (VINETZ 2001). Especula-se que a susceptibilidade do hospedeiro

também interfira no desenvolvimento da infecção; uma recente associação entre um genótipo específico (HLA-DQ6) de um antígeno leucocitário humano e a susceptibilidade de adquirir leptospirose foi demonstrada por Lingappa *et al.* (2004). Esta associação foi a primeira interação gene-ambiente identificada para uma doença infecciosa.

O combate à infecção por leptospiras é realizado com antibióticos. As leptospiras são sensíveis às penicilinas e tetraciclinas, o que faz com que estes sejam os antibióticos mais utilizados para o tratamento da leptospirose, embora outros antibióticos estejam sendo estudados (GRIFFITH *et al.* 2006). O tratamento com início precoce tende a reduzir a intensidade dos sintomas em geral (MCCLAIN *et al.* 1984; WATT *et al.* 1988).

A imunidade à infecção inicial por leptospira é dependente basicamente de resposta humoral, majoritariamente contra os LPSs (ADLER e FAINE 1978); a resposta celular ainda não é bem entendida na leptospirose (FAINE *et al.* 1999). A opsonização das bactérias permite que estas sejam fagocitadas e eliminadas da corrente sanguínea no começo da infecção (FAINE *et al.* 1964). Indivíduos que contraíram leptospirose ficam protegidos contra reinfecção pelo mesmo sorovar ou por sorovares relacionados (LEVETT 2001), por um curto período de tempo (LUPIDI *et al.* 1991).

2.3. Diagnóstico

O diagnóstico preciso de leptospirose não pode ser feito sem uma confirmação laboratorial (FAINE *et al.* 1999). No entanto, os testes laboratoriais em uso atual – como os de microscopia de campo escuro ou o teste sorológico de

aglutinação microscópica (MAT) – possuem deficiências, como a insensibilidade e pouca especificidade (microscopia de campo escuro) ou as dificuldades no controle, na padronização, na leitura e até na interpretação (MAT), de maneira que as suas utilizações ainda são controversas na identificação de sorovares (LEVETT 2003). Outras formas de diagnóstico têm sido relatadas ou estão em desenvolvimento, como testes baseados em detecção de IgMs através de ELISA (MCBRIDE *et al.* 2007), *imunoblots* (DOUNGCHAWEE *et al.* 2008) ou dipsticks (GUSSENHOVEN *et al.* 1997); e testes baseados em PCR (FONSECA CDE *et al.* 2006; JOUGLARD *et al.* 2006; PALANIAPPAN *et al.* 2005).

2.4. Vacinas

Atualmente existem diversas vacinas contra leptospirose para uso veterinário, e estas são baseadas em preparações de *Leptospira* atenuada/inativada; porém, embora as vacinas contra gado e suínos sejam usadas há anos, ainda existem relatos conflitantes sobre sua eficácia (FAINE *et al.* 1999). Por outro lado, as vacinas humanas disponíveis atualmente são raras; também baseadas em preparações de *Leptospira* atenuada/inativada ou em preparações da membrana externa, elas são licenciadas somente nos países em que foram desenvolvidas. Entre elas destacam-se a vacina produzida em Cuba (proteção de 78%), na China (proteção de 75%) e no Japão (proteção de 60 a 100%) (KOIZUMI e WATANABE 2005; MCBRIDE *et al.* 2005). Basicamente, as vacinas atualmente em estudo contra leptospirose podem ser compostas por (KOIZUMI e WATANABE 2005; WANG *et al.* 2007): (1) leptospiros mortas/inativadas/atenuadas; esta categoria, onde se incluem as vacinas cubanas e japonesas, gera proteção contra

os sorovares que foram utilizados na composição da vacina (proteção homóloga), porém não exibe a propriedade de causar proteção cruzada contra outros sorovares (proteção heteróloga). Outras desvantagens destas preparações vacinais são a proteção por curto tempo (cerca de um ano) e os efeitos colaterais, que incluem até mesmo o desenvolvimento de doenças autoimunes; (2) preparações da membrana externa de leptospira; esta categoria, que inclui a vacina produzida na China, gera maiores títulos de anticorpos que a vacina com a bactéria inteira, assim como menores efeitos colaterais, embora possua as mesmas desvantagens de proteção de curto tempo e de falta de proteção heteróloga. (3) Preparações com lipopolisacarídeos (LPS); embora os LPS sejam os antígenos majoritários da resposta sorológica contra leptospira, eles são característicos de cada sorovar, portanto este tipo de vacina tende a gerar somente proteção homóloga; (4) Proteínas recombinantes; as vantagens destas preparações incluem a composição definida e a capacidade de gerar proteção heteróloga. Por outro lado, o estudo de vacinas que utilizam proteínas recombinantes é o mais recente e ainda existem poucos dados na literatura. (5) Vacinas de DNA; alguns antígenos foram recentemente testados em vacinas de DNA, e exibiram proteção (BRANGER *et al.* 2005; FAISAL *et al.* 2008).

A grande desvantagem de uma vacina que não confira proteção heteróloga reside no fato de novos surtos de leptospirose poderem ser associadas a sorovares que não fazem parte da composição da vacina. Recentemente, a vacina cubana foi modificada para incluir o sorovar Balum, após um surto de leptospirose causado por este sorovar (MCBRIDE *et al.* 2005).

De fato, o que se busca atualmente é uma vacina com componente(s) bem definido(s), com o objetivo de alcançar máxima proteção por longo tempo, com o mínimo de efeitos adversos. Algumas proteínas recombinantes têm se mostrado promissoras como componentes de uma vacina anti-leptospirose, uma vez que foi observada proteção em experimentos com modelo animal (CHANG *et al.* 2007; HAAKE *et al.* 1999; PALANIAPPAN *et al.* 2006; SILVA *et al.* 2007).

3. Seqüenciamento do genoma de leptospiras

A seqüência nucleotídica do genoma de cinco linhagens de leptospiras foi determinada. O primeiro genoma a ser seqüenciado foi realizado na China, com a *L. interrogans* sorovar Lai, em 2003 (REN *et al.* 2003); a seguir, o genoma da *L. interrogans* sorovar Copenhageni foi realizado no Brasil em 2004 (NASCIMENTO *et al.* 2004a; NASCIMENTO *et al.* 2004b); já os genomas de duas linhagens de *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo foram seqüenciados em um mesmo projeto realizado na Austrália em 2006 (BULACH *et al.* 2006); por fim, recentemente foi publicado um trabalho sobre o seqüenciamento da espécie de leptospira de vida livre *L. biflexa* sorovar Patoc, realizado na França, em 2008 (PICARDEAU *et al.* 2008). As duas espécies patogênicas possuem dois cromossomos, um deles grande (4,3 a 3,6 mb) e outro pequeno (358 a 316 kb); na espécie de vida livre, observa-se, além dos dois cromossomos semelhantes ao das espécies patogênicas, uma terceira unidade de replicação de cerca de 74 kb.

A comparação entre os genomas dos sorovares Lai e Copenhageni de *L. interrogans* mostrou uma ampla semelhança geral, embora uma grande inversão

cromossômica tenha sido detectada (NASCIMENTO *et al.* 2004a). Por outro lado, observou-se que o genoma da bactéria *L. borgpetersenii* é cerca de 700 kb menor que o genoma de *L. interrogans*, e que esta diminuição parece estar relacionada à atividade de elementos de inserção (IS) (BULACH *et al.* 2006). Os genes ausentes nesta espécie são principalmente aqueles relacionados à detecção de sinais ambientais, e ao transporte e utilização de metabólitos; esta diferença sugere que a capacidade de sobreviver em ambientes fora do hospedeiro estaria sendo prejudicada em *L. borgpetersenii*. Segundo os autores, esta espécie estaria se especializando em um ciclo de vida com dependência estrita à transmissão de hospedeiro para hospedeiro. De fato a sobrevivência de *L. borgpetersenii* em ambiente aquático é muito menor que a de *L. interrogans* (BULACH *et al.* 2006). A comparação do genoma das duas leptospiros patogênicas com o genoma de *L. biflexa* fortifica esta hipótese, uma vez que *L. biflexa* possui um maior número de genes de detecção de sinais ambientais (287), seguido de *L. interrogans* (214) e por fim de *L. borgpetersenii* (167). Outro ponto destacado por Picardeau *et al.* (2008) é que o genoma de *L. biflexa* e *L. borgpetersenii*, ambas espécies especializadas em um único ambiente (aquático e hospedeiro mamífero, respectivamente), é menor que o genoma de *L. interrogans*, que teria se tornado maior ao adquirir novas informações genéticas necessárias à sobrevivência nestes dois ambientes.

De qualquer maneira, vários genes identificados no genoma das leptospiros patogênicas podem ser classificados como potenciais candidatos vacinais (GAMBERINI *et al.* 2005; YANG *et al.* 2006), baseados na estratégia de

vacinologia reversa formalizada por Rapoulli (2000). Essa estratégia tem revolucionado a forma de estudo dos microorganismos, e tem mostrado excelentes resultados na habilidade de predição de alvos potenciais para agentes anti-patógenos e candidatos vacinais (WACK e RAPPUOLI 2005). O grupo brasileiro que realizou o seqüenciamento de *L. interrogans* sorovar Copenhageni iniciou o estudo de genoma funcional e de potencial vacinal de proteínas com provável exposição na membrana de leptospira, que atuem na adesão ao hospedeiro ou que possuam atividade tóxica.

4. Hemolisinas

As leptospiros são bactérias que dependem de ferro para crescer e se multiplicar (FAINE 1959; LOUVEL *et al.* 2006). No entanto, este metal não é facilmente encontrado em forma livre no hospedeiro, restando como a maior fonte para as bactérias o ferro complexado no grupo heme (WANDERSMAN e STOJILJKOVIC 2000). Logo, a capacidade de gerar hemólise parece ser essencial para a sobrevivência e para o sucesso reprodutivo das leptospiros patogênicas, uma vez que o rompimento dos eritrócitos libera uma grande quantidade deste nutriente. Muitas bactérias, como a *Listeria* (VAZQUEZ-BOLAND *et al.* 2001), *Staphylococcus* (HUSEBY *et al.* 2007), *Streptococcus* (NIZET 2002), e a *Leptospira* (LEE *et al.* 2002), causam hemólise em seus hospedeiros. Um conjunto de enzimas parece atuar de forma conjunta e sinérgica nesse processo bacteriano (KASAROV 1970; POMERANTSEV *et al.* 2003; TITBALL 1993). Em leptospiros, a hemólise é caracterizada pela atividade de fosfolipases

(TROWBRIDGE *et al.* 1981), de esfingomielinases (SEGERS *et al.* 1990) e de outras proteínas auxiliares (LEE *et al.* 2000).

De fato, diversas proteínas foram anotadas como possíveis hemolisinas no sequenciamento de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Entre elas destacam-se as esfingomielinases e as proteínas TlyA, B e C. As esfingomielinases são uma classe de enzimas responsáveis pela hidrólise das esfingomielinas (um fosfolípido constituinte da membrana plasmática), resultando em ceramida e fosforilcolina (GONI e ALONSO 2002). Essas enzimas podem também estar presentes em eucariotos, possuindo diversas funções, entre elas aquelas envolvidas no metabolismo de lipídios (GONI e ALONSO 2002), na mudança das propriedades da membrana celular (carga, fluidez, permeabilidade) (MONTES *et al.* 2002), e em sinalizações celulares (apoptose, diferenciação, proliferação) (JAYADEV e HANNUN 1996; PETTUS *et al.* 2002). Nos procariotos, no entanto, não são usualmente necessárias para seu ciclo de vida. Nesse caso, são encontradas freqüentemente em patógenos, atuando como toxinas (HEINZ *et al.* 1998; RODRIGUES-LIMA *et al.* 2000). De fato, em *Leptospira*, os genes que codificam para esfingomielinases são encontrados somente em linhagens patogênicas (SEGERS *et al.* 1992), embora tal fato não ocorra com os genes que codificam as outras hemolisinas (LOUVEL *et al.* 2006; PICARDEAU *et al.* 2008). É de se notar que as leptospirosas patogênicas possuem múltiplos genes que codificam para esfingomielinases, alcançando um total de cinco genes em *L. interrogans* sorovares Copenhageni e Lai, e três em *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo. A conservação de múltiplas cópias parece fortificar a idéia de estes genes

serem de fato importantes para as bactérias patogênicas. Segundo Segers *et al.* (1990) e também Del Real *et al.* (1989), as funções das esfingomielinases em *Leptospira* poderiam estar associadas, além de à aquisição de ferro, ao uso dos lipídios de membrana como fonte de carbono e energia e à geração de morte celular no hospedeiro (como, por exemplo, de macrófagos) (MERIEN *et al.* 1997; ZHANG *et al.* 2008), já que a ceramida produzida pela atividade enzimática das esfingomielinases atua como segundo mensageiro na determinação da apoptose (PETTUS *et al.* 2002). Já as proteínas Tly A, B e C foram inicialmente identificadas como hemolisinas na espiroqueta *Brachyspira hyodysenteriae*, causadora da disenteria suína (TER HUURNE *et al.* 1994). Estas proteínas, embora agrupadas sob o mesmo nome, não possuem similaridade estrutural, sendo também encontradas em *Leptospira*.

A forma de atuação das hemolisinas de leptospira ainda não está clara. A esfingomielinase H foi descrita como geradora de poros em células de mamíferos (LEE *et al.* 2002) e, recentemente, a habilidade de Sph2 em romper membranas também foi relatada (ZHANG *et al.* 2008). De qualquer maneira, o próprio papel das hemolisinas na patogenicidade de leptospira ainda não foi completamente definido, e necessita de maiores investigações (PICARDEAU *et al.* 2008).

5. Vacinas antitoxinas

A produção de hemolisinas por *Leptospira* permite a este patógeno a obtenção de recursos essenciais para o seu crescimento e multiplicação, conferindo-lhe, portanto, uma vantagem competitiva. Uma vez que a maioria das

toxinas bacterianas protéicas é secretada (LAHIRI 2000), sua utilização como antígeno vacinal geraria uma resposta contra uma partícula separada da bactéria. Portanto, neste caso, os anticorpos não atuam diretamente sobre o patógeno, mas sim indiretamente, ao impedir a ação da toxina. O patógeno privado do efeito da toxina se reproduziria a uma taxa reduzida, causando uma redução no desenvolvimento da doença e também diminuindo os graves sintomas associados às toxinas.

Além destes óbvios benefícios, a vacinação com toxóides (toxinas inativadas) pode gerar um ambiente onde exista a capacidade de se “gerenciar a virulência” dos patógenos (ZIMMER 2003b). Quando se associa um custo metabólico inútil à produção de toxinas – devido à sua neutralização nas pessoas vacinadas –, os patógenos com maiores taxas de produção de toxinas se encontrarão em uma desvantagem competitiva, o que tende a elevar a frequência de patógenos menos virulentos (SOUBEYRAND e PLOTKIN 2002). Esta alteração na virulência da população de patógenos beneficia até mesmo as pessoas não vacinadas. As vacinas com esta propriedade foram chamadas de vacinas Darwinianas por Zimmer (2003a).

De fato, tais predições se mostraram bastante robustas para explicar uma série de dados históricos sobre patógenos, como no caso da difteria (BERGAMINI *et al.* 2000; GALAZKA 2000) ou da pertussis (SCHNEERSON *et al.* 1996; TARANGER *et al.* 2001).

II – OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são:

- 1.** Clonagem, expressão e purificação de proteínas de leptospira com possível atividade hemolítica;
- 2.** Caracterização da produção destas proteínas pelas leptospiras:
 - 2.1. Transcrição gênica;
 - 2.2. Expressão em cultivo e *in vivo*;
- 3.** Caracterização destas proteínas recombinantes quanto a sua:
 - 3.1. Atividade biológica;
 - 3.2. Potencial antigênico e protetor contra leptospirose.

III – MATERIAIS E MÉTODOS

Escolha dos candidatos vacinais: Escolheram-se como candidatos vacinais proteínas com possível função hemolítica. Essa escolha foi feita através de busca na sequência nucleotídica do genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (número de acesso do GenBank AE016823). Basicamente foi atribuída uma possibilidade de função hemolítica àquelas proteínas com alta similaridade às proteínas já descritas na literatura como possuindo tal atividade. Em alguns casos, a detecção de domínios conservados relacionados à hemólise auxiliou na classificação da proteína como possível hemolisina. A busca por similaridade entre proteínas foi feita através do algoritmo BLASTP no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), e a procura por domínios conservados foi feita no PFam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>).

Inferências filogenéticas: Sequências protéicas similares aos candidatos escolhidos foram obtidas no GenBank através de busca de similaridade utilizando-se o BLASTP, e alinhadas utilizando-se o programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>). O conjunto de dados obtidos foi utilizado para a inferência filogenética Bayesiana, baseada na probabilidade de distribuição posterior das árvores. A estimativa filogenética foi realizada utilizando-se o programa MrBayes (versão 3.1.2) (<http://mrbayes.csit.fsu.edu/>), com a realização de 10⁶ ciclos do algoritmo da cadeia de Monte Carlo.

Obtenção e cultivo de cepas de *Leptospira*: As linhagens de *Leptospira* utilizadas neste trabalho foram obtidas do Laboratório de Zoonoses Bacterianas, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. O cultivo de leptospiros foi feito em meio EMJH líquido, suplementado com soro de coelho (10%), L-asparagina (0,015% m/v), piruvato sódico (0,001% m/v), cloreto de cálcio (0,001% m/v), cloreto de magnésio (0,001% m/v), peptona (0,03% m/v) e extrato de carne (0,02% m/v). As bactérias foram cultivadas a 29° C, em condições aeróbicas, por cerca de 7 a 10 dias, período em que o cultivo tende a se encontrar na fase estacionária. Uma linhagem de *L. interrogans* sorovar Pomona, chamada Fronn, foi mantida em ciclos constantes de passagens por hamsters alternadas com passagens em meio de cultura, para assegurar sua virulência.

Isolamento do DNA e amplificação dos genes de interesse: Culturas de leptospiros foram submetidas à centrifugação a 5400 RCF (g) por 30 min e lavadas por duas vezes em PBS. O DNA genômico foi isolado das bactérias com uma solução de guanidina-detergente (DNAzol® Reagent, Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. As regiões preditas para codificarem as possíveis hemolisinas foram amplificadas utilizando-se os *primers* descritos na Tabela 1, desenhados de acordo com a sequência genômica de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. A PCR foi feita em um volume de 25 µl, contendo 100 ng de DNA genômico, 1x tampão de PCR (20 mM Tris.Cl (pH 8,4), 50 mM KCl), 2 mM MgCl₂, 20 pmoles de cada *primer* específico para cada gene, 200 µM de cada dNTP, e 2,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen). A termociclagem

utilizada foi: 94° C por 10 min, seguido por 35 ciclos de 94° C por 1 min, 52° C por 1 min, 72° C por 1 min 30 seg, e um ciclo final de extensão de 10 min a 72° C. Os fragmentos amplificados foram separados eletroforéticamente em gel de agarose a 1,5% e visualizados através de coloração com brometo de etídeo.

Extração de RNA e análise do cDNA: Culturas de *L. interrogans* sorovar Pomona Fronn foram submetidas à centrifugação a 5400 RCF (g) por 30 min e lavadas por duas vezes em PBS. Para a obtenção do cDNA, o RNA total foi isolado de leptospiras cultivadas em diferentes temperaturas: 20°, 29° e 37° C. A extração de RNA foi feita utilizando-se método do ácido guanidino tiocianato fenol-clorofórmio, utilizando-se o reagente TRIzol® (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Um micrograma do RNA de cada amostra foi tratado com 1 U de DNase I (Invitrogen) por 15 min em temperatura ambiente. A DNase I foi inativada através da adição de 1 µl de uma solução de 25mM EDTA, seguido por uma incubação a 65° C por 10 min. Os RNAs tratados com DNase foram reversamente transcritos utilizando-se o kit comercial *SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen). Um décimo do produto da transcrição reversa foi amplificado em uma reação de PCR de 25µl, como descrito acima. Os primers utilizados são descritos na Tabela 1, exceto o primer forward de TlyB, que foi substituído pelo primer com a seguinte sequência: 5' CCGAATCCGATAAACTAC 3'. As condições de termociclagem foram: 94° C por 10 min, seguido de 30 ciclos de 94° C por 1 min, 62° C por 1 min e 72° C por 1 min 30 seg, seguidos de um ciclo final de 72° C por 10 min. A integridade das amostras de cDNA foi analisada através da amplificação de um

fragmento de 1042 pb do gene ribossomal 16S. Um controle negativo para todas as amostras foi realizado utilizando-se o produto de uma transcrição reversa realizada sem a transcriptase reversa, para assegurar que a amplificação obtida não seja resultado de contaminação com DNA genômico. Os fragmentos amplificados foram separados eletroforéticamente em gel de agarose a 1,5% e visualizados através de coloração com brometo de etídeo.

Clonagem: As regiões preditas para codificarem as possíveis hemolisinas foram amplificadas do DNA de *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni Fiocruz L1-130 (ATCC número BAA-1198) através de PCR, conforme descrito. Os produtos do PCR foram digeridos com as enzimas de restrição que reconhecem as regiões que os flanqueavam, gerando pontas coesivas. Esse material digerido foi ligado ao plasmídeo pAE, também previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição. O vetor pAE (RAMOS *et al.* 2004) possui um promotor derivado do fago T7, adiciona uma cauda de seis histidinas à porção N-terminal da proteína recombinante e produz um fenótipo de resistência a ampicilina em bactérias portadoras deste plasmídeo. O produto da ligação foi transformado em *E. coli* DH5 α competente; as bactérias submetidas à transformação foram selecionadas em placas contendo ampicilina. Algumas das colônias selecionadas foram submetidas a uma extração de DNA seguida de eletroforese para determinar se o plasmídeo presente nestas bactérias possuía um tamanho compatível com a inserção de um fragmento correspondente ao produto de PCR clonado. A seguir, alguns clones que possuíam o plasmídeo com tamanho esperado foram cultivados em meio líquido (2YT) e foi realizada a

extração do DNA plasmidial do cultivo resultante através de uma mini-preparação, utilizando-se *kits* comerciais. Para assegurar uma correta inserção do gene clonado no vetor, os plasmídeos foram seqüenciados através do método de Sanger, em um seqüenciador automatizado ABI PRISM 3100 (Perkin Elmer).

Tabela 1: Seqüência dos *primers* de clonagem, tamanho do fragmento amplificado e massas esperadas da proteína recombinante e da proteína nativa.

Locus	Proteína	Primers (5' → 3') *	Tamanho do fragmento amplificado (pb)	Massa molecular esperada da proteína recombinante (kDa)	Massa molecular esperada da proteína nativa (kDa) **
LIC12632	Sph1	Forward: CCTGGCAAACAAAATTCATA Reverse: TATCATCATTAGAGTTGTTGA	1686	64.873	68.102
LIC12631	Sph2	Forward: CCCGAAAAAGAATCCTCATATAAG Reverse: CCTGGCCTCTTAAATCCGG	1823	71.212	70.970
LIC13198	Sph3	Forward: TCATTAGTATACAATAAATT Reverse: AAGGATCTAATTTATCGTTAG	1557	61.093	65.343
LIC11040	Sph4	Forward: GCAAAGTCTAAAACGACACGA Reverse: TTGGCGAAAGAGGGAATG	606	22.753	27.903
LIC10657	SphH	Forward: GCAAATATAAGTGCAGAAAGAATAGG Reverse: AGCGTTAGTCTTGACTTTGG	1501	58.774	64.434
LIC10284	TlyA	Forward: ATTAGGCTCGATGTTCTTTCTTTT Reverse: CTATAAGCTCCAAAACAAAAGGATTC	765	30.091	29.510
LIC10339	TlyB	Forward: CTGGAATTTACAAAAGAGCTAAAAGAG Reverse: TTAAACTAAGCAATTTCTTCCGACC	2538	96.382	95.316
LIC13143	TlyC	Forward: ACATCTTTTCTTTTGAAGCTGATTGG Reverse: TCATTTTTTAGACTGAGCTCGATTATT	852	33.391	50.437
LIC12134	HlpA	Forward: ATGTCATTAGCTCCGATTGCAC Reverse: AGACAAATCTAATTGCTCTAG	942	37.878	36.538
LIC20065	AcpP	Forward: ATGGCAGACTTTGAAAAGGTTA Reverse: CATCGACAACCTCAAGTCCTAA	234	9.458	8.503
LIC10156	HlyA	Forward: ATGAACCGATTGTAAATCCAAT Reverse: ACCACCAAACTAAAGGATGA	225	9.932	8.591

* = sítios de restrição não estão exibidos; ** = massa calculada para a toda a seqüência, incluindo possíveis seqüências sinais (preditas em Sph1, Sph2, Sph3, Sph4 e SphH)

Obtenção de proteínas recombinantes: As construções plasmidiais, contendo cada um dos genes clonados, foram transformadas em *E. coli* BL21(DE3) Star pLysS competentes. As bactérias transformadas foram selecionadas em placas contendo ampicilina e cloranfenicol. A seguir, algumas colônias foram analisadas para detectar se a expressão da proteína recombinante estava ocorrendo ou não. Para isso, alguns clones foram expandidos em cultivo líquido (EMJH), e estas culturas foram induzidas com a adição de 1,2 mM de IPTG quando atingiram uma densidade óptica (DO) de 0,6 em 600 nm. Alguns cultivos não foram induzidos. Após três horas de crescimento, tais cultivos foram submetidos à centrifugação para que as bactérias fossem precipitadas e separadas do meio de cultura. As bactérias foram, então, ressuspensas em tampão de amostra para eletroforese de proteínas e agitadas vigorosamente. A seguir, uma eletroforese foi realizada com as amostras induzidas e não induzidas. Através da observação de bandas presentes nas amostras induzidas e ausentes nas amostras não induzidas (na altura esperada para a proteína recombinante), foram escolhidos os clones produtores da proteína recombinante. Os clones escolhidos foram armazenados em 20% de glicerina a -80° C. Para a expressão da proteína recombinante em grande escala, um clone produtor foi crescido em um litro de meio 2YT até atingir a DO de 0,6 a 600 nm, quando foram induzidos por 3 horas com a adição de 1,2 mM de IPTG. A seguir, as bactérias foram recuperadas através de centrifugação (RCF=5400 g, 15 min), ressuspensas em 100 ml de PBS 1X e congeladas. Após isso, a ressuspensão bacteriana foi lisada fisicamente através de um *French Pressure*. Este lisado foi novamente centrifugado para a

separação do sobrenadante do corpúsculo de inclusão (RCF=12800 g, 30 min). O corpúsculo de inclusão foi lavado com 2M uréia e novamente centrifugado (RCF=12800 g, 10 min). Este procedimento foi realizado por duas vezes; após isso, o corpúsculo lavado foi solubilizado em uréia 8M em PBS por 24 horas. Um gel com uma amostra do sobrenadante e do corpúsculo de inclusão foi corrido para se determinar a localização da proteína recombinante nestas subfrações celulares.

Purificação das proteínas recombinantes: Uma vez localizada a proteína recombinante, a subfração que a continha foi submetida à cromatografia de afinidade a níquel. Se a purificação foi realizada com o sobrenadante do lisado celular, então toda a cromatografia foi realizada em condição não-desnaturante (em PBS); caso tenha-se utilizado o corpúsculo de inclusão, então o processo de cromatografia foi realizado em condição desnaturante (em uréia 8M em PBS). Basicamente, uma resina quelante (5 ml) foi saturada com uma solução de sulfato de níquel (0,3 M) por meia hora. Após esse tempo, o excesso de níquel foi removido passando-se água pela coluna. A seguir, a coluna foi equilibrada com PBS ou uréia 8M PBS e a subfração celular onde se encontrava a proteína foi passada pela coluna; o material não adsorvido pela coluna foi coletado. Após a passagem da amostra, a coluna foi lavada com 10 volumes (em relação ao volume da resina) de concentrações crescentes de imidazol: 5mM, 20mM, 40mM, 60mM, e uma lavagem final de 2 volumes com imidazol 100mM. Em alguns casos, outros esquemas de lavagens foram utilizados. Todas as lavagens foram coletadas em uma única fração, exceto as lavagens de 60mM e 100mM,

que foram coletadas em 2 frações de igual volume. A seguir, o material restante ainda aderido à coluna foi eluído através da passagem de cinco volumes de 1M imidazol, coletados em frações de um mililitro. Por fim, todas as amostras coletadas foram submetidas à eletroforese de proteína, para que fosse determinado em que fração cromatográfica a proteína recombinante se encontrava e se a mesma se encontrava purificada.

Diálise das amostras purificadas. Após a purificação, as amostras foram dialisadas contra dois litros de PBS por cinco vezes para a retirada do imidazol. Cada diálise foi realizada por pelo menos 4 horas, a 4° C. As proteínas purificadas em condições desnaturantes foram dialisadas alternativamente em PBS para a renaturação e retirada de imidazol ou em uréia 8M em PBS, somente para a retirada de imidazol, mantendo-se a condição desnaturante.

Obtenção de antisoros: Antisoros policlonais foram gerados contra todas as proteínas recombinantes obtidas. Para isso, seis camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados por quatro semanas, com a injeção intraperitoneal de dez microgramas da proteína recombinante e 100 microgramas de íon alumínio (no formato de $Al(OH)_3$) como adjuvante. Os camundongos foram sangrados antes da primeira imunização para a obtenção de um soro pré-imune. Durante o período de imunização, os animais foram semanalmente sangrados, por quatro vezes. Em todas as sangrias, os sangues foram misturados em uma única amostra. Em seguida, foi permitida a coagulação do sangue por 30 minutos a 37° C, seguido de uma permanência por uma hora a 4° C. Após esse tempo, o soro foi

separado do material coagulado através de centrifugação (RCF=400 g, 10 min, 4° C) e mantido congelado (-20° C) até o uso. O título de cada antisoro foi determinado por ELISA. Já o soro de pacientes de leptospirose foi obtido da coleção do Instituto Adolpho Lutz. Estes soros foram coletados após duas semanas do surgimento dos sintomas. O título dos soros foi determinado pelo teste de microaglutinação (MAT).

Eletroforese de proteínas: A separação eletroforética de proteínas foi baseada no sistema descrito por Laemmli (1970). Basicamente, um gel de acrilamida e bisacrilamida polimerizadas (29:1) contendo SDS foi utilizado para a separação das proteínas. A ligação inespecífica de SDS às proteínas, proporcionalmente às suas massas, permite que as proteínas migrem para o pólo positivo em função de sua massa em suporte restritivo de poliacrilamida. Após a corrida, o gel foi corado com *comassie blue* para a visualização das bandas, exceto quando seriam utilizados para o *Western blot*.

Western blot: Amostras foram submetidas à eletroforese de proteínas e logo em seguida transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Esta membrana foi corada com PonceauS para a visualização e marcação da posição das bandas. Após isso, o PonceauS foi lavado com PBS-T e a membrana foi bloqueada com leite desnatado a 10% em 0,05% Tween20 em PBS (PBS-T), a 4° C, durante toda uma noite. No dia seguinte, a membrana foi incubada com o antisoro de interesse diluído em PBS-T com leite desnatado a 5% por uma hora e meia sob agitação, em temperatura ambiente. A seguir, a membrana passou por

três lavagens de 10 minutos com PBS-T. Após as lavagens, a membrana foi incubada com o anticorpo específico conjugado à peroxidase, diluído de acordo com uma titulação prévia, em PBS-T com leite desnatado a 5% por uma hora sob agitação, em temperatura ambiente. Após isso, a membrana foi novamente lavada por três vezes com PBS-T e revelada com um substrato quimioluminescente (ECL[®] – GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante. Após a incubação com o substrato, a membrana foi exposta a filmes de raio-X.

Titulação dos soros: Para determinar o título dos soros gerados pelas imunizações, foi utilizado um ELISA, como descrito a seguir. Os poços de uma placa de micropoços foram revestidos com um micrograma da proteína recombinante de interesse, diluída em tampão carbonato-bicarbonato 100 mM, pH 9,6. O revestimento foi feito a 4° C por toda uma noite. A seguir, os poços foram lavados por três vezes com PBS-T e bloqueados com 10% leite desnatado diluído em PBS-T por uma hora a 37° C. A solução de bloqueio foi então descartada e os poços foram novamente lavados por três vezes com PBS-T. A seguir, os poços foram incubados por uma hora e meia a 37° C com diluições crescentes do soro em 1% BSA diluído em PBS-T. Então, os poços foram lavados por três vezes com PBS-T e incubados por uma hora a 37° C com um anticorpo específico conjugado a peroxidase, diluído em 1% BSA PBS-T, de acordo com uma titulação prévia. Após isso, os poços foram novamente lavados por três vezes com PBS-T e reveladas com a adição de 0.04% orthophenylenediamina e 0.05% H₂O₂, diluídos no tampão citrato-fosfato 100

mM, pH 5,5. Após cerca de 10 minutos, as reações foram interrompidas com a adição de ácido sulfúrico (8N). A seguir, as placas foram submetidas à espectrometria em 492 nm.

Deteção da expressão de proteínas de *Leptospira* durante a infecção em hamsters: Cortes histológicos do tecido renal de hamsters infectados com *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae foram incubados com o antisoro gerado contra as proteínas recombinantes. Para a detecção do complexo antígeno-anticorpo, foi utilizado o sistema colorimétrico Envision® (DAKO), de acordo com as instruções do fabricante. A visualização foi realizada em microscópio óptico.

Dicroísmo circular: A presença de uma estrutura secundária ordenada foi analisada por dicroísmo circular em um espectropolarímetro JASCO J-810. As medições foram realizadas entre os comprimentos de onda de 190 a 260 nm, a cada 0,5 nm. Cada medição foi repetida por cinco vezes, e o valor apresentado representa uma média destes valores. As proteínas foram dialisadas em tampão sódio fosfato 20 mM pH 7,4 antes das medições.

Ensaio hemolíticos: A mistura para o ensaio hemolítico (100 µl) continha uma suspensão de 5% de eritrócitos de carneiro (previamente lavados por três vezes com PBS) e 20 mM de cloreto de magnésio em PBS. A esta mistura foram adicionados oito microgramas de cada proteína recombinante. O controle negativo foi realizado com uma proteína recombinante de *Schistosoma mansoni* (Sm14), e o controle positivo foi realizado com 0,8 micrograma de

esfingomielinase C de *Staphylococcus aureus* comercial obtido da Sigma. A incubação das proteínas com os eritrócitos foi realizada por uma hora e meia a 37° C, quando, a seguir, a mistura de reação foi submetida à centrifugação por 15 min a 400 RCF (g) e o sobrenadante foi submetido à espectrometria em 420 nm. A hemólise foi expressa como o porcentual do total de hemólise, obtido com 5% eritrócitos incubados com água destilada. Cada proteína foi pré-tratada (1:20) antes da reação com: (1) PBS; (2) antisoro; ou (2) com soro não imune. Para as proteínas recombinantes, o antisoro utilizado foi o antisoro policlonal gerado em camundongos e o soro não imune foi aquele obtido dos camundongos antes da imunização; para a esfingomielinase C de *S. aureus*, foi utilizada uma mistura de soros de pacientes de leptospirose como antisoro e uma mistura de soros não imunes de camundongos como o soro não imune. Para os ensaios hemolíticos com *L. interrogans* Pomona Fronn e *L. biflexa* Patoc foram utilizados 70 µl (em um total de 100 µl de reação) de: (1) a cultura total de leptospira (sobrenadante da cultura mais bactérias); ou (2) somente as bactérias (previamente lavadas em PBS por três vezes); ou (3) somente o sobrenadante da cultura. As culturas foram crescidas por 10 dias antes dos ensaios, até alcançarem a fase estacionária (cerca de 5×10^4 bactérias por ml). As bactérias lavadas com PBS foram obtidas do mesmo volume de cultura usado na incubação com a cultura total. Tanto a cultura total quanto as bactérias lavadas foram submetidas a 10 minutos de agitação com microesferas de vidro para a lise bacteriana. Após as incubações (uma hora e meia a 37° C), as amostras foram centrifugadas e a absorbância foi lida a 420 nm. Também foi testado se a atividade hemolítica de *Leptospira*

poderia ser inibida por soro. Para tanto, a cultura total de *Leptospira* foi pré-incubada (1:20) com (1) PBS; ou (2) antisoros; ou (3) soros não imunes, por 30 minutos antes do ensaio hemolítico. As demais etapas do experimento foram realizadas como descrito acima. Os experimentos foram realizados por três vezes, todas em triplicatas.

Adesão a componentes de matriz extracelular (MEC): A adesão a componentes de matriz extracelular foi realizada de acordo com Barbosa *et al.* (2006). Brevemente, poços de uma placa de micropoços foram revestidos com um micrograma de cada MEC, diluídos em 100 µl de PBS, e incubados por toda uma noite a 4°C. A solução de revestimento foi então lavada por três vezes com PBS-T e os poços foram bloqueados com 200 µl de BSA 1% em PBS por duas horas a 37° C. Em seguida, um micromolar de cada proteína recombinante foi adicionado aos poços, e estas foram incubadas por uma hora e meia a 37° C. Após a incubação, os poços foram lavados por seis vezes com PBS-T e incubados com o antisoro específico da proteína de interesse, diluído em PBS (1:4000), por uma hora a 37° C. A seguir, as placas foram novamente lavadas por três vezes com PBS-T e incubadas com o anti-IgG de camundongos diluídos em PBS (1:5000), por uma hora a 37° C. Então, os poços foram lavados por três vezes com PBS-T e revelados com a adição de 0.04% orthophenylenediamina e 0.05% H₂O₂ diluídos no tampão citrato-fosfato 100 mM, pH5,5. Após cerca de 10 minutos, as reações foram interrompidas com a adição de ácido sulfúrico (8N). A seguir, as placas foram submetidas à espectrometria em 492 nm. Os experimentos foram realizados por três vezes, todas em triplicatas.

Curvas de dose-resposta: Para elaborar uma curva de dose-resposta, uma quantidade fixa de um componente da MEC de interesse (um micrograma) foi incubada com uma concentração crescente da proteína recombinante (de 0,002 a 4 μ M). A detecção da ligação da proteína recombinante ao componente da MEC foi realizada conforme o descrito acima. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

Inibição competitiva da adesão ao fragmento F30 com heparina: Este experimento foi realizado conforme já descrito, porém a ligação de um micromolar da proteína de interesse a um micrograma do fragmento proteolítico F30 da fibronectina plasmática foi realizado na presença de uma concentração crescente de heparina (de 0 a 1000 unidades internacionais), um conhecido ligante de F30. A detecção da ligação da proteína recombinante ao componente da MEC foi realizada conforme o descrito acima. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

Adesão à laminina em condições de oxidação crescente: Para analisar o efeito da oxidação da laminina na adesão, os poços revestidos com laminina foram pré-tratados com concentrações crescentes de um agente oxidante leve, o metaperiodato de sódio (de 0 a 100 mM) por 15 minutos, no escuro, como descrito por Barbosa *et al.* (2006). Em seguida, os poços foram lavados por três vezes e a detecção da ligação da proteína recombinante ao componente da MEC foi realizada conforme o descrito acima. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

Inibição da adesão de *Leptospira* ao Matrigel: *L. interrogans* Pomona

Frõnn lavadas por três vezes com PBS foram incubadas em poços revestidos com Matrigel. Para competitivamente inibir a adesão ao Matrigel, os poços foram pré-tratados com cada proteína recombinante. Para imunoinibir a adesão, as leptospiaras foram pré-tratadas com diferentes antisoros; o soro de paciente utilizado foi uma mistura de soros de sete pacientes de leptospirose. Para a realização dos ensaios, os poços foram revestidos com 100 µg de Matrigel diluído em PBS por toda uma noite a 4° C. No dia seguinte, no ensaio de inibição por competição, os poços foram lavados com 0,1% de BSA diluída em PBS (PBS-B) por três vezes e incubados com oito microgramas de cada proteína recombinante por uma hora e meia; no ensaio de imunoinibição, as leptospiaras foram pré-incubadas com os diferentes soros (1:10) por uma hora e meia (alguns soros foram submetidos à inativação do complemento em 56° C por 30 minutos antes da incubação). Ambas as incubações foram realizadas a 37° C. Após as incubações, as leptospiaras (1×10^7 bactéria por poço) foram adicionadas aos poços revestidos com Matrigel e incubadas por duas horas a 37° C. Em seguida, foram realizadas três lavagens com PBS-B para que as bactérias não aderidas fossem removidas. As leptospiaras aderidas ao Matrigel foram detectadas conforme descrito nos experimentos de adesão à ECM, com a exceção de as lavagens terem sido realizadas com PBS-B ao invés de PBS-T. Para o experimento de inibição por competição, utilizou-se soro contra LipL32 (a proteína de membrana mais expressa em *Leptospira*) (1:4000, diluído em PBS); para a detecção das bactérias e no experimento de imunoinibição utilizou-se soro

contra *Leptospira* gerado em coelhos (1:3000, diluído em PBS). Os experimentos foram realizados por três vezes, todas em triplicatas.

Desafio animal: um grupo de dez hamsters machos jovens foram imunizados intraperitonealmente (200 µl) por duas vezes com 50 microgramas de cada proteína recombinante juntamente com 500 microgramas do íon alumínio (na forma de $\text{Al}(\text{OH})_3$), com um intervalo de 21 dias. No 42º dia, os hamsters foram desafiados com cerca de 6×10^3 *Leptospira interrogans* sorovar Pomona Fronn (a dose letal 50 aproximada), injetadas intraperitonealmente. Após 21 dias do desafio, os animais sobreviventes foram sacrificados e seus fígados foram triturados e examinados quanto à presença de leptospiros através de cultivo em meio EMJH. O controle positivo foi realizado com uma vacina veterinária comercial (Bayer) e o controle negativo foi imunizado com PBS.

IV – RESULTADOS

Alguns genes escolhidos possuem domínios relacionados à hemólise.

A atribuição de uma possível atividade hemolítica aos genes escolhidos é fortificada quando existem domínios claramente relacionados à atividade hemolítica (Figura 2). Um destes domínios relacionados à hemólise, chamado Exo_Endo_Phos foi encontrado nas hemolisinas Sph1, Sph2, Sph3 e SphH, tornando mais robusta a previsão de atuação na hemólise. Por outro lado, as demais proteínas não possuem nenhum domínio detectável que esteja claramente relacionado à hemólise. Mesmo assim, todos os genes foram escolhidos porque existem informações na literatura que indicam que tais genes estão relacionados à hemólise em *Leptospira* ou que seus parálogos estão relacionados à hemólise em outras bactérias, de maneira que somente testes biológicos podem responder se tais proteínas são de fato hemolisinas.

Bactérias não patogênicas possuem ortólogos dos genes escolhidos.

Embora a hemólise seja primariamente uma função relacionada à patogenicidade, todas as proteínas escolhidas como candidatos a hemolisinas possuem ortólogos em bactérias não patogênicas (e.g. cianofíceas) (Figura 3). Mais ainda, todas as proteínas – com exceção das classificadas como esfingomielinases – foram encontradas também na leptospira de vida livre *L.*

biflexa sorovar Patoc. Por outro lado, a grande maioria dos genes escolhidos está presente em diversos sorovares de leptospiros patogênicos (Figura 4).

Figura 2: Representação esquemática das proteínas estudadas. A presença de domínios conservados e sua definição foram obtidas em uma busca no PFam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). Regiões preditas como sequência sinal (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) ou como transmembrana (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>) também estão representadas. As setas indicam os sítios de clonagem.

Figura 3: Relações filogenéticas entre proteínas similares a cada um dos candidatos escolhidos. As seqüências foram obtidas em uma busca por similaridade às seqüências de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, utilizando-se o algoritmo BLASTP no GenBank. O alinhamento foi realizado utilizando-se o algoritmo ClustalW2 (www.ebi.ac.uk/clustalw/), e as relações filogenéticas foram inferidas utilizando-se o programa MrBayes (<http://mrbayes.csit.fsu.edu/>). Os valores de probabilidades posteriores são indicados para cada ramo. A classificação de cada organismo, de acordo com o GenBank, é indicada por quadrados coloridos.

TlyB

TlyC

HlpA

Figura 3: (continuação)

AcpP

HlyA

■ Espiroquetas	■ Firmicutas	■ Cianobactérias
■ a proteobactérias	■ Enterobactérias	■ Criptomonadas (fitoplancton)
■ b proteobactérias	■ Bactérias grupo CFB	■ Algas verdes
■ d proteobactérias	■ Gran+ com AltoGC	■ Anemonas marinhas
■ e proteobactérias	■ Bactérias verdes sulfurosas	■ Mamíferos
■ g proteobactérias	■ Aquificales	

Figura 3: (continuação)

Figura 4: Detecção por PCR dos genes candidatos em sorovares patogênicos de *Leptospira*. Primers desenhados com base em *L. interrogans* Copenhageni foram utilizados no PCR. As setas indicam a altura esperada (em pb) para cada gene. As canaletas são: 1 – Marcador de massa molecular; 2 – *L. noguchii* Panama; 3 – *L. borgpetersenii* Javanica; 4 – *L. borgpetersenii* tarassovi; 5 – *L. kirshneri* Cynopteri; 6 – *L. kirshneri* Grippothyphosa; 7 – *L. interrogans* Canicola; 8 – *L. interrogans* Copenhageni; 9 – *L. interrogans* Hardjo; 10 – *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae; 11 – *L. interrogans* Pomona; 12 – Controle negativo.

Sete das proteínas recombinantes foram expressas e purificadas.

De um total de 11 genes clonados (Figura 5), somente a expressão de sete proteínas recombinantes foi detectada (Figura 6). A maioria delas foi expressa como corpúsculo de inclusão: Sph1, Sph2, Sph4, SphH e HlpA. As demais proteínas expressas se encontravam no sobrenadante do lisado celular: TlyB e TlyC. A pureza das proteínas expressas como corpúsculo de inclusão foi aumentada várias vezes em relação à sua pureza no lisado celular através da separação do sobrenadante por centrifugação e de duas lavagens do corpúsculo de inclusão com 2 M uréia. A passagem dessas proteínas na coluna de níquel aumentou a sua pureza, porém alguns contaminantes mínimos eram sempre co-purificados através desta cromatografia. Por outro lado, a purificação das proteínas encontradas no sobrenadante celular foi mais eficiente, e nenhum contaminante visível foi co-purificado.

Integridade estrutural das proteínas recombinantes.

Duas das proteínas foram expressas no sobrenadante celular (TlyB e TlyC), e as demais como corpúsculo de inclusão (Sph1, Sph2, Sph4, SphH e HlpA). Três das proteínas expressas como corpúsculo de inclusão (Sph1, Sph2 e SphH) foram renaturadas através de diálise após a purificação; por outro lado, as duas demais (Sph4 e HlpA) precipitaram durante o processo de renaturação e foram mantidas em uréia 8M e PBS. Para analisar se as proteínas que foram expressas no sobrenadante celular e aquelas que foram renaturadas possuíam

estrutura secundária regular, foi realizada uma espectrofotometria com luz polarizada. O espectro obtido para as proteínas (Figura 7) é típico de proteínas com estrutura secundária regular, indicando que todas as proteínas analisadas possuíam integridade estrutural. Mais ainda, o espectro indica que as proteínas são majoritariamente compostas por α -hélice, com exceção de SphH, que possui predominantemente estrutura de folhas β .

Figura 5: Amplificação por PCR das regiões codificantes das proteínas escolhidas. A amplificação foi realizada com DNA de *L. interrogans* sorovar Copenhageni FioCruz. Os fragmentos amplificados foram utilizados como insertos na clonagem. Um indicador de massa molecular (em pb) é mostrado em ambos os lados do gel.

Figura 6: Proteínas recombinantes purificadas. Após a cromatografia por afinidade a níquel, as proteínas foram separadas eletroforéticamente em gel de SDS-poli-acrilamida. As proteínas Sph4 e HlpA estão em solução desnaturante. Um indicador de massa molecular (em KDa) é mostrado à esquerda.

Figura 7: Espectro obtido em espectrofotometria com luz polarizada para cada proteína recombinante. A absorbância em luz polarizada foi obtida em um espectrofotômetro J-810 (Jasco), em solução 20 mM fosfato de sódio, pH 7,4. Os espectros obtidos evidenciam que as proteínas recombinantes possuem estrutura secundária regular. Um exemplo dos padrões de espectro associados a vários tipos de estruturas secundárias ordenadas é mostrado (adaptado de Kelly *et al.* (2005)).

Fatores secretados por *Leptospira* patogênica são hemolíticos.

Uma linhagem de *Leptospira* patogênica (Fronn) foi capaz de hemolisar eritrócitos de carneiro, enquanto tal capacidade não foi detectada em uma linhagem de *Leptospira* saprofítica (Patoc) (Figura 8). Esta habilidade pode ser inteiramente atribuída a fatores que a leptospira secreta para o meio de cultura, porque a mesma capacidade de hemólise está presente tanto no lisado da cultura total como no sobrenadante da cultura; em concordância, leptospias lavadas com PBS praticamente não possuíam capacidade hemolítica.

Nenhuma das proteínas recombinantes possui atividade hemolítica.

Todas as cinco proteínas recombinantes que se mostraram estruturadas (Sph1, Sph2, SphH, TlyB e TlyC) foram testadas quanto à sua capacidade hemolítica. Foram também testadas a capacidade hemolítica de uma combinação entre todas essas proteínas, com ou sem a presença da proteína LipL32, descrita como auxiliadora da hemólise (LEE *et al.* 2000). O resultado obtido mostrou que nenhuma das proteínas recombinantes ou de suas combinações possuía atividade hemolítica (Figura 9). Por outro lado, a esfingomielinase de *S. aureus* foi capaz de gerar 100% de hemólise. Além disso, antisoros gerados contra estas proteínas não foram capazes de inibir a hemólise causada por leptospias com maior intensidade que soros não imunes (Figura 10). Mesmo soros de pacientes não

foram capazes de inibir a hemólise com maior intensidade que os soros não imunes. A inativação do sistema complemento não afetou a intensidade da inibição inespecífica de um soro não imune (Figura 11).

Figura 8: Capacidade hemolítica de leptospiros. *Leptospira* patogênica (Pomona) foi capaz de hemolisar eritrócitos de carneiro, enquanto a *leptospira* saprofítica não o foi. Eritrócitos de carneiro foram incubados com o cultivo total de leptospiros, com as bactérias separadas do meio de cultivo ou somente com o sobrenadante do cultivo. Toda a atividade hemolítica presente em *Leptospira* foi encontrada no sobrenadante do cultivo bacteriano. Os 100% de hemólise foram obtidos com a incubação de eritrócitos com água destilada. Os asteriscos indicam significância estatística com alfa em 0,01 no teste Tukey-Kramer HSD em relação ao controle realizado com o meio de cultura. Os experimentos foram realizados em triplicatas e repetidos três vezes.

Figura 9: Teste da atividade hemolítica das proteínas recombinantes. Nenhuma das proteínas recombinantes obtidas (ou combinação entre elas) possui atividade hemolítica. Eritrócitos de carneiro foram incubados com oito microgramas de cada proteína recombinante ou com um micrograma de cada uma delas, quando combinadas. O controle positivo foi realizado com esfingomielinase de *Staphylococcus aureus* recombinante produzida pela Sigma e o controle negativo com a proteína recombinante não hemolítica Sm14, do verme *Schistosoma mansoni*. As proteínas foram pré-incubadas por 30 min com PBS, com antisoro, ou com soro não imune antes de entrarem em contato com os eritrócitos. O soro não imune utilizado no controle positivo foi uma mistura de soros de camundongos *naives*; o soro imune foi uma mistura do soro de sete pacientes com leptospirose. Ambos os soros reduziram significativamente a capacidade hemolítica da esfingomielinase de *S. aureus*. Os 100% de hemólise foram obtidos com a incubação de eritrócitos com água destilada. Os asteriscos indicam significância estatística com alfa em 0,01 no teste Tukey-Kramer HSD em relação ao controle realizado com Sm14. Os experimentos foram realizados em triplicatas e repetidos três vezes.

Figura 10: Inibição da capacidade hemolítica de *Leptospira* por antisoros. O cultivo de leptospira foi pré-icubado com diversos antisoros e em seguida adicionado a uma solução contendo eritrócitos de carneiro. Todos os soros, incluindo soros não imunes de camundongos e de humanos foram capazes de inibir parcialmente a hemólise. Esta inibição parcial foi similar (Tukey-Kramer HSD com alfa a 0,01) em todos os soros analisados, sejam gerados contra as proteínas recombinantes, seja soro de paciente com leptospirose, sejam soros não imunes. Os 100% de hemólise foram obtidos com a incubação de eritrócitos com água destilada. Os experimentos foram realizados em triplicatas e repetidos três vezes.

Figura 11: Análise da inativação do sistema complemento na inibição da capacidade hemolítica da esfingomielinase de *S. aureus* com soros não imunes. A proteína foi pré-incubado com uma mistura de soros não imunes de camundongos que passaram ou não por uma inativação do sistema complemento. Após 30 min, foi adicionada uma solução contendo eritrócitos de carneiro. A inibição causada por soros não imunes com complemento inativado e não inativado foi estatisticamente indistinguível (teste *t* de Student com alfa a 0,05). Os 100% de hemólise foram obtidos com a incubação de eritrócitos com água destilada. Os experimentos foram realizados em triplicatas e repetidos três vezes.

TlyC liga-se a componentes da matriz extracelular (MEC).

Um experimento de adesão a diversos componentes da MEC mostrou que TlyC liga-se especificamente à laminina, colágeno IV e à fibronectina plasmática (Figura 12). A ligação de TlyB aos componentes da MEC, por outro lado, foi inferior à sua ligação à BSA. A ligação de TlyC à laminina, seguida da ligação ao colágeno IV e à fibronectina plasmática foram aquelas com maiores magnitudes de adesão (que representa n -vezes a ligação média à BSA), indicando que mais moléculas de TlyC se ligam a um micrograma de laminina que a um micrograma de colágeno IV e assim sucessivamente. No entanto, curvas dose-resposta mostraram que TlyC possui maior afinidade (inferida pelo K_d aparente calculado) à fibronectina plasmática, seguido de afinidade à colágeno IV e à laminina (Figura 13). Foi realizada também uma curva dose-resposta ao Matrigel, um multicomposto de proteínas de matriz biologicamente ativo, que se assemelha à membrana basal de mamíferos; os componentes majoritários do Matrigel são a laminina, o colágeno IV, proteoglicanas de heparan sulfato e entactina. O K_d aparente calculado para a ligação ao Matrigel indica que TlyC possui alta afinidade à esse material. A ligação de TlyC à laminina foi reduzida pela oxidação crescente desta macromolécula por metaperiodato de sódio, indicando que os resíduos de açúcar são importantes para esta interação (Figura 14). Também foi analisada a ligação de TlyC aos fragmentos proteolíticos F30 e F45 da fibronectina plasmática (Figura 15). TlyC se liga à F30, mas somente marginalmente à F45. Estes resultados são reforçados pelas curvas dose-respostas obtidas na ligação a tais fragmentos, que indicam que TlyC se liga ao

F30 com alta afinidade. Esta adesão foi parcialmente inibida por uma competição com heparina, um conhecido ligante do domínio F30.

Figura 12: Adesão de rTlyB e rTlyC a componentes da MEC. Poços de microplacas foram revestidos com um micrograma de cada componente da MEC e incubados com um micromolar de cada proteína recombinante. A detecção das proteínas aderidas foi feita por ELISA. A magnitude de adesão representa n-vezes a adesão média da proteína recombinante ao controle BSA. Os asteriscos indicam significância estatística com alfa em 0,001 no teste Tukey-Kramer HSD em relação ao controle Fetuína. Os experimentos foram realizados em triplicatas e repetidos três vezes.

Figura 13: Ligação de rTlyC à laminina, colágeno IV, fibronectina plasmática e ao Matrigel, em função da concentração protéica. A concentração de rTlyC variou de 0 a 4μM. As Abs_{max} s e os K_d s aparentes são mostrados em cada caso. Cada ponto representa a absorbância média $\pm$ o desvio padrão de três experimentos independentes.

Figura 14: Ligação de rTlyC à laminina pré-tratada com concentrações crescentes de um agente oxidante. Laminina imobilizada foi tratada com metaperiodato de sódio (5 a 100 mM) por 15 min a 4° C no escuro. O valor médio da absorbância a 492 nm de três experimentos independentes foi comparado àquele obtido com laminina não tratada (0 mM). O porcentual de redução da ligação da proteína à laminina tratada com metaperiodato, como uma função do agente oxidante, é indicada acima de cada barra. Cada ponto representa a absorbância média $\pm$ o desvio padrão de três experimentos independentes.

A. Ligação diferencial aos fragmentos **B. Curva dose-resposta** **C. Inibição parcial da ligação de TlyC-F30 em um ensaio de competição com heparina**

Figura 15: Ligação de rTlyC a fragmentos proteolíticos da fibronectina plasmática (F30 e F45). **A.** Um micromolar de rTlyC foi incubado com um micrograma de F30 ou F45; o experimento foi realizado em triplicata e repetido três vezes. A ligação de rTlyC a F45 foi 64% menor que a F30 ($P < 0,001$ em um teste t de Student). **B.** Ligação aos fragmentos de fibronectina (1 μg cada) como uma função da concentração da proteína recombinante (0 a 1 μM). **C.** Inibição parcial (29%) da ligação de rTlyC (1 μM) ao fragmento F30 na presença de quantidades crescentes de heparina (0 a 1000 UI). Cada ponto representa o valor médio da absorbância a 492 nm $\pm$ o desvio padrão de três experimentos independentes.

TlyC parcialmente inibe a adesão de *Leptospira* ao Matrigel.

A adesão de *Leptospira* ao Matrigel foi reduzida em 17% quando TlyC foi utilizada como um competidor, mas nenhuma redução foi observada quando a proteína utilizada foi a TlyB (Figura 16). Embora modesta, a redução na adesão causada por TlyC foi significativa ($P < 0,01$). No entanto, em um ensaio de imunoinibição, a redução na adesão de *Leptospira* causada por anti-TlyB e por anti-TlyC não foi estatisticamente distinguível da redução causada por um soro não imune. Mais ainda, a redução causada por uma mistura de soro de sete pacientes de leptospirose também não é distinguível das outras reduções (Figura 17A). Portanto, foi observada uma inibição não específica da adesão de *Leptospira* na presença de qualquer soro. Para testar se o sistema complemento é o responsável por esta redução na adesão, foi feita a inativação de um soro não imune previamente ao pré-tratamento das leptospirosas com este soro. Como controle, leptospirosas foram também pré-tratadas com o soro com o complemento não inativado. O resultado obtido mostrou que leptospirosas tratadas com soro com complemento inativado possuem maior aderência ao Matrigel que as leptospirosas tratadas com um soro não inativado (Figura 17B). No entanto, ambos os grupos aderiram com uma menor intensidade ao Matrigel em comparação ao grupo tratado somente com PBS.

Figura 16: Adesão de leptospira ao Matrigel em um ensaio de competição com rTlyB e rTlyC. TlyC causou uma redução modesta (17%), mas significativa na adesão de leptospiros. Poços de microplaca revestidos com Matrigel foram incubados com oito microgramas de rTlyB ou rTlyC antes da adição de 1×10^7 leptospiros. Os dados são expressos como a média da absorbância a 492 nm, $\pm$ o desvio padrão de três experimentos independentes, cada um realizado em triplicatas. A significância estatística foi obtida por comparação com poços não tratados (PBS), através do teste *t* de Student.

A. Inibição da adesão de *Leptospira* utilizando-se soros

B. Efeito da inativação de complemento sobre a adesão

Figura 17: Inibição da adesão de leptopirras ao Matrigel com o uso de soros. As leptopirras (1×10^7 por poço) foram tratadas com soro (1:10) anteriormente à sua adição aos poços. **A.** A adesão foi similarmente reduzida por todos os soros testados. Barras conectadas com a mesma letra são estatisticamente indistinguíveis com alfa a 0,01(teste t de Student). **B.** O sistema complemento parece possuir pouca participação na inibição. Os asteriscos indicam significância estatística com alfa a 0,01(teste t de Student) em relação ao controle realizado com PBS.

Expressão das proteínas por *Leptospira*.

A expressão das proteínas por leptospiiras foi testada em cultura e *in vivo*. Inicialmente foi detectada a transcrição dos genes candidatos através da técnica de RT-PCR. Todos os genes estudados parecem ser transcritos por leptospiiras em cultura (Figura 18). Mais ainda, a detecção da transcrição de alguns deles foi mais evidente quando o cultivo foi realizado em temperaturas mais elevadas. Embora se tenha detectada a transcrição de todos os genes, a expressão protéica só foi observada, em cultivo, para Sph2, SphH, TlyB e TlyC (Figuras 19 e 20). A expressão destas mesmas quatro proteínas também foi observada *in vivo*, em túbulos renais de hamsters infectados com leptospiiras (Figura 21).

Reconhecimento cruzado por diferentes antisoros.

Soros gerados contra algumas das esfingomielinases reconheceram outras das esfingomielinases recombinantes ou mesmo as proteínas nativas, como visto nas Figuras 19 e 22 e sumariado na Tabela 2. Os resultados de não reconhecimento não foram mostrados.

Figura 18: Amplificação de transcritos gênicos de *Leptospira* cultivada em diferentes temperaturas. O RNA de cultivos crescidos a 20°, 29° e 37° C foi extraído e retro-transcrito. O cDNA obtido foi utilizado em um PCR com primers específicos para cada gene (RT+). Um controle negativo (RT-), sem retro-transcrição, foi realizado para cada amplificação para excluir a possibilidade de contaminação com DNA genômico. A amplificação de um fragmento do RNA ribossomal 16S foi realizada para confirmar a integridade do cDNA obtido. Um indicador de massa molecular (em pb) é mostrado à esquerda de cada gel.

Figura 19: Detecção da expressão de esfingomielinases em cultivos de *Leptospira*. Antiseros gerado contra as proteínas recombinantes Sph2 ou SphH foram utilizados em um *Western blot* contra um painel com extrato de diversos sorovares de *Leptospira*. Ambos os soros reconheceram cruzadamente as duas proteínas recombinantes, porém somente o soro contra Sph2 reconheceu as duas proteínas em extratos de *L. interrogans* Pomona. As canaletas são: 1 – *L. bifexa* Patoc; 2 – *L. interrogans* Hardjobovis; 3 – *L. interrogans* Autunalis; 4 – *L. interrogans* Pyrogenes; 5 – *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae; 6 – *L. interrogans* Copenhageni; 7 – *L. interrogans* Pomona (cultivo constante); 8 – *L. interrogans* Pomona Fronn (passagens em hamsters); 9 – *L. interrogans* Bratislavo; 10 – *L. interrogans* Canicola; 11 – *L. kirshneri* Grippothyphosa. Uma indicação de massa molecular (em KDa) é mostrada à esquerda.

Figura 20: Detecção da expressão de TlyB e TlyC em cultivos de *Leptospira*. Antiseros gerado contra as proteínas recombinantes TlyB ou TlyC foram utilizados em um *Western blot* contra um painel com extrato de diversos sorovares de *Leptospira*. As canaletas são: 1 – rTlyB ou rTlyC; 2 – *L. bifexa* Patoc; 3 – *L. interrogans* Copenhageni; 4 – *L. interrogans* Pomona (cultivo constante); 5 – *L. interrogans* Pomona Fronn (passagens em hamsters); 6 – *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae; 7 – *L. interrogans* Bratislavo; 8 – *L. interrogans* Hardjobovis; 9 – *L. interrogans* Autunalis; 10 – *L. interrogans* Pyrogenes; 11 – *L. interrogans* Canicola; 12 – *L. kirshneri* Grippothyphosa. Uma indicação de massa molecular (em KDa) é mostrada à esquerda.

Figura 21: Expressão de algumas das proteínas estudadas durante a infecção por *Leptospira* em hamsters. Cortes histológicos do tecido renal de animais infectados com leptospira foram incubadas com soro gerado contra proteínas recombinantes (Sph2, SphH, TlyB e TlyC). O complexo anticorpo-antígeno foi detectado utilizando-se anticorpos conjugados a peroxidase (Invision – DAKO) e fotografados em aumento de 280 vezes. As setas vermelhas indicam regiões onde houve detecção do complexo antígeno-anticorpo (regiões escurecidas). O controle negativo foi realizado sem a incubação com soros.

Figura 22: Antisoro contra rSph1 reconhece cruzadamente as esfingomeilinasas recombinantes Sph2 e SphH, porém não reconhece Sph4 em um *Western blot*. Uma indicação de massa molecular (em KDa) é mostrada à esquerda.

Tabela 2: Reconhecimento cruzado das esfingomielinasas por antisoros

Antisoro	Proteína recombinante reconhecida cruzadamente	Proteína nativa reconhecida cruzadamente
Anti-Sph1	rSph2, rSphH	Nenhuma
Anti-Sph2	rSphH	SphH
Anti-Sph4	Nenhuma	Nenhuma
Anti-SphH	rSph2	Nenhuma

O soro de pacientes reconhece Sph2 e TlyC.

O soro de pacientes infectados com leptospirosas apresentam IgG contra Sph2 e TlyC, como detectado por um *Western blot* (Figura 23). A presença destes anticorpos no soro de pacientes indica que estas proteínas são corretamente apresentadas ao sistema imune durante a infecção. Por outro lado, soro de um humano saudável pode reconhecer a maioria das esfingomielinases de leptospira e também a esfingomielinase de *S. aureus* (Figura 24).

Nenhuma proteína testada foi protetora em um desafio animal.

As proteínas recombinantes obtidas foram capazes de gerar uma resposta imune intensa em camundongos, como foi observado na imunização para obtenção de antisoro (Figura 25). Já no experimento de desafio animal, mesmo constatando-se que a imunização com Sph2, TlyB e TlyC tenha gerado uma resposta imune (IgG) detectável nos animais vacinados (nenhum anticorpo foi detectado contra SphH) (Figura 26), nenhuma das proteínas analisadas (Sph2, SphH, TlyB ou TlyC) foi protetora em um desafio contra leptospirose realizado em hamsters (Figura 27). A sobrevivência dos hamsters vacinados foi similar ou até mesmo inferior à dos animais vacinados com PBS, e mesmo alguns dos sobreviventes continuavam portando uma infecção por leptospirosas (Tabela 3), semelhante ao que ocorreu no grupo vacinado com PBS. Por outro lado, uma vacina comercial protegeu totalmente contra a infecção por leptospirosas, incluindo a ausência total de bactérias em seus organismos.

Resumo dos resultados obtidos.

A ausência da expressão de um grande número de proteínas (Sph3, TlyA, AcpP e HlyA) no sistema utilizado diminuiu a quantidade das possíveis hemolisinas analisadas; a impossibilidade de reestruturação de algumas delas (Sph4 e HlpA) também impediu que a atividade biológica destas proteínas fosse investigada. Portanto nem todas as análises puderam ser realizadas para todas as proteínas preditas como possuindo atividade hemolítica (Tabela 4).

Figura 23: Anticorpos IgG de soro de paciente com leptospirose reconhecem Sph2 e TlyC. Soro de paciente com leptospirose foi utilizado em um *Western blot* contra as proteínas recombinantes obtidas (Sph1, Sph2, Sph4, SphH, TlyB, TlyC e HlpA), uma proteína recombinante de *Schistosoma mansoni* como controle negativo (Sm14) e a proteína majoritariamente expressa de leptospira LipL32 como controle positivo. Uma indicação de massa molecular (em KDa) é mostrada à esquerda.

Figura 24: Anticorpos IgG de um humano saudável podem reconhecer algumas esfingomielinases de *Leptospira* e de *Staphylococcus*. Soro de um humano saudável foi utilizado em um *Western blot* contra as proteínas obtidas (Sph1, Sph2, Sph4, SphH, TlyB, TlyC e HlpA), a esfingomielinase de *S. aureus* (SMase) e uma proteína recombinante de *Schistosoma mansoni* (Sm14). Uma indicação de massa molecular (em KDa) é mostrada à esquerda.

Figura 25: Titulação dos soros obtidos durante a imunização semanal de camundongos com as proteínas recombinantes, através de ELISA. Os títulos foram definidos como a última diluição em que uma absorbância de 0,1 tenha sido obtida. Todas as proteínas foram imunogênicas, e a resposta imune foi detectada mesmo após as doses iniciais de imunização.

Figura 27: Porcentagem diária de animais sobreviventes após o desafio. Dez hamsters foram imunizados por duas vezes com as proteínas recombinantes (Sph2, SphH, TlyB ou TlyC), com PBS ou com uma vacina comercial contra leptospirose (Bayer). Após isso, foram desafiados com *L. interrogans* serovar Pomona, linhagem Fronn. Nenhuma das proteínas recombinantes foi protetora no desafio animal. O número de animais sobreviventes foi acompanhado por 21 dias após o desafio.

Tabela 3: Resumo dos resultados obtidos no desafio. Uma amostra do fígado dos animais sobreviventes foi adicionada a meio de cultura de leptospiros para detecção de animais positivos para leptospirose.

Grupo	Número amostral	Mortos	Sobreviventes	Positivos para Leptospirose
PBS	15	9	6	1
Vacina Comercial	10	0	0	0
Sph2	10	7	3	2
SphH	10	7	3	2
TlyB	10	10	0	0
TlyC	10	7	3	1

Tabela 4: Resumo dos resultados obtidos, agrupados segundo categorias

Identificação		Obtenção da proteína recombinante				Atividade biológica		Transcrição e expressão			Avaliação do potencial antígeno e protetor			
Gene	Nome	Clonagem	Expressão em <i>E. coli</i>	Purificação	Estrutura secundária	Atividade hemolítica	Atividade de adesão	Transcrição em cultivo	Expressão nativa em cultivo	Expressão nativa <i>in vivo</i>	Imunogenicidade em camundongos	Imunogenicidade em hamster	Deteção de anticorpos em pacientes	Capacidade protetora em desafio animal
LIC12632	Sph1	Seqüenciado 3'e 5'	Sim	Sim	Sim	ND	—	Sim	ND	—	Sim	—	ND	—
LIC12631	Sph2	Seqüenciado 3'e 5'	Sim	Sim	Sim	ND	—	Sim	Sim Pomona	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
LIC10657	Sph3	Seqüenciado 3'e 5'	ND	—	—	—	—	Sim	—	—	—	—	—	—
LIC11040	Sph4	Seqüenciado total	Sim	Sim	Não	ND	—	Sim	ND	—	Sim	—	ND	—
LIC13198	SphH	Seqüenciado 3'e 5'	Sim	Sim	Sim	ND	—	Sim	Sim Pomona	Sim	Sim	ND	ND	Não
LIC10284	TlyA	Seqüenciado 3'e 5'	ND	—	—	—	—	Sim	—	—	—	—	ND	—
LIC10339	TlyB	Seqüenciado total	Sim	Sim	Sim	ND	Não	Sim	Sim todos sorovares	Sim	Sim	Sim	ND	Não
LIC13143	TlyC	Seqüenciado 3'e 5'	Sim	Sim	Sim	ND	Sim	Sim	Sim, alguns sorovares	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
LIC12134	HlpA	Seqüenciado total	Sim	Sim	Não	ND	—	Sim	ND	—	Sim	—	ND	—
LIC20065	AcpP	Seqüenciado total	ND	—	—	—	—	Sim	—	—	—	—	—	—
LIC10156	HlyA	Seqüenciado total	ND	—	—	—	—	Sim	—	—	—	—	—	—

Legenda: ND = Não detectado; — = Não se aplica ou não realizado

V – DISCUSSÃO

Ainda existe controvérsia sobre o real papel biológico das proteínas classificadas como hemolisinas em *Leptospira* (PICARDEAU et al. 2008). Podemos dividir tais proteínas em duas categorias: aquelas semelhantes à esfingomielinases e as demais. As semelhantes à esfingomielinases são mais fortemente associadas à hemólise, porque: (1) ocorrem somente em leptospira patogênica; (2) proteínas similares a elas são comprovadamente ligadas à hemólise em diversas bactérias; (3) possuem um domínio conservado (exceto Sph4) que é comum em proteínas com atividade hemolítica; e (4) possuem uma predição de sequência sinal (o que sugere a sua secreção), já que os fatores hemolíticos de leptospira são secretados (Figura 8). As demais prováveis hemolisinas possuem papel ainda mais controverso, uma vez que: (1) estão presentes na leptospira não patogênicas *L. biflexa*; (2) mesmo as proteínas similares a ela não apresentam uma clara associação à hemólise (uma busca no GenBank resulta em proteínas anotadas ora como hemolisinas, ora como não hemolisinas); e (3) nenhuma delas possui um domínio claramente associado à hemólise. Porém, ainda não existe comprovação da exata função de nenhuma destas proteínas durante a infecção por *Leptospira*. Sabe-se que SphH (LEE et al. 2002) e Sph2 (ZHANG et al. 2008) são citotóxicas para células de mamíferos, fortalecendo a idéia de que a função das esfingomielinases esteja relacionada à virulência de leptospira.

Sabe-se que a expressão de Sph1, Sph2, Sph3, Sph4, SphH, TlyA, TlyC e HlpA é capaz de conferir um fenótipo hemolítico em *E. coli* (ZHANG *et al.* 2005). No entanto, tal observação pode ser colocada em dúvida devido à existência de relatos da expressão de uma hemolisina críptica de *E. coli* relacionada a obtenção de um fenótipo hemolítico (DEL CASTILLO *et al.* 1997; LUDWIG *et al.* 1995; OSCARSSON *et al.* 1996). Hsu *et al.* (2001) apontam que *E. coli* pode expressar proteínas hemolíticas crípticas, e que a expressão heteróloga de um gene pode induzir um fenótipo hemolítico nas bactérias pela ativação transcricional de genes hemolíticos. De fato, este fenômeno foi reportado em estudos da proteína de *Salmonella* SlyA, inicialmente apontada como uma hemolisina (LIBBY *et al.* 1994), mas posteriormente identificada como um regulador transcricional que ativa a expressão da hemolisina críptica SheA em *E. coli*. (DEL CASTILLO *et al.* 1997; LUDWIG *et al.* 1995; OSCARSSON *et al.* 1996). Portanto, para confirmar o papel das proteínas classificadas como hemolisinas em *Leptospira*, nós clonamos, expressamos e purificamos estas proteínas, e posteriormente submetemo-as a ensaios hemolíticos.

Em nossos ensaios, no entanto, as proteínas recombinantes Sph1, Sph2, SphH, TlyB ou TlyC não possuíram atividade hemolítica, mesmo analisadas em conjunto ou em associação com a proteína auxiliadora de hemólise LipL32 (LEE *et al.* 2000). Estes resultados estão em oposição àqueles obtidos por Zhang *et al.* (2005), que apontam estas proteínas como hemolíticas (exceto TlyB, que não foi estudada por estes autores). No entanto, nos experimentos conduzidos por Zhang *et al.* (2005), uma mistura complexa de proteínas foi utilizada (o lisado total de

E. coli) no ensaio hemolítico, e a conclusão de que as proteínas recombinantes são as responsáveis pela hemólise observada é baseada somente em um controle negativo realizado com *E. coli* portando um vetor vazio. Não há garantias que *E. coli* não esteja expressando outras proteínas que possam ser responsáveis pela hemólise observada. De fato, como já mencionado, a conversão de um fenótipo não-hemolítico para um hemolítico pode ser uma consequência da expressão de hemolisinas crípticas de *E. coli*. De qualquer maneira, uma possível explicação para a ausência de atividade hemolítica das esfingomielinases recombinantes poderia ser baseada na diferença estrutural entre a proteína recombinante e a proteína nativa. Embora as esfingomielinases tenham apresentado estrutura secundária regular após a renaturação (Figura 8), esta estrutura pode representar uma versão parcial ou intermediária da estruturação completa presente nas esfingomielinases nativas.

Também realizamos experimentos de inibição da atividade hemolítica de *Leptospira* através de soros. Os resultados obtidos apontam que os soros gerados contra as proteínas recombinantes ou mesmo uma mistura de soros de pacientes de leptospirose não foram capazes de inibir especificamente a atividade hemolítica de *Leptospira*. Na verdade, qualquer soro analisado foi igualmente capaz de inibir (parcialmente) a hemólise, mesmo o soro de camundongos ou humanos não imunes. A inibição inespecífica da atividade hemolítica de leptospira através de soros já havia sido relatada anteriormente (KOJIMA *et al.* 1984); este mesmo trabalho demonstra que os fosfolipídios e esfingomielinas presentes no soro são os responsáveis por esta inibição. Aparentemente, a

presença de anticorpos contra Sph2 e TlyC presentes no soro de pacientes (Figura 23) não foi capaz de aumentar a inibição gerada pelos fosfolipídios. Algo similar foi observado nos ensaios de hemólise com proteínas, em que a atividade hemolítica do controle positivo, realizado com uma esfingomielinase comercial de *S. aureus*, foi grandemente inibida por soro de camundongo não imune e também pela mistura de soros de pacientes de leptospirose. Kojima *et al.* especulam que os fosfolipídeos e esfingomielinas competitivamente inibam a interação entre as hemolisinas e os eritrócitos. Podemos imaginar que talvez a ligação destes substratos às esfingomielinases impeça a ligação dos anticorpos nestas toxinas, explicando porque o soro de pacientes não foi capaz de gerar uma inibição maior que a dos outros soros neste experimento.

Embora os experimentos *in vitro* realizados neste trabalho e por Kojima *et al.* (1984) mostrem que a atividade das hemolisinas de leptospira é inibida pela presença de fatores do soros, provavelmente as hemolisinas de *Leptospira* e mesmo de *S. aureus* são capazes de gerar hemólise *in vivo*; portanto, existiria uma habilidade bacteriana de contornar este ambiente adverso à atividade hemolítica durante a infecção. Esta habilidade pode estar relacionada a fatores que atuem conjuntamente às hemolisinas, eventualmente se ligando às mesmas ou aos fosfolipídios e esfingomielinas do hospedeiro, de maneira a favorecer a interação entre as hemolisinas e os eritrócitos. De fato, já foi descrito uma proteína que possui a propriedade de auxiliar a hemólise; Lee *et al.* (2000) sugerem que a capacidade hemolítica de SphH é aumentada por LipL32.

Supondo que as leptospiras são realmente capazes de gerar hemólise *in vivo*, a presença de anticorpos que reconhecem as hemolisinas de leptospira no hospedeiro deve reduzir a ação destas toxinas nesta condição. Como anticorpos que reconheçam as esfingomielinases de leptospira podem ocorrer até mesmo em pessoas saudáveis (Figura 24), a colonização em humanos deve ser dificultada, devido à redução do acesso ao ferro em consequência da imunoinibição destas hemolisinas. Este fato pode estar associado ao grande número de casos de amenos de leptospirose, com pouca duração, efeitos leves e autolimitados (aproximadamente 90% do total). A pressão seletiva generalizada contra uma categoria de hemolisinas também pode estar relacionada à presença de uma grande variedade de hemolisinas (preditas) em leptospira. O imunoreconhecimento das esfingomielinases de leptospira por humanos saudáveis pode ser o resultado de reconhecimento cruzado por anticorpos gerados contra esfingomielinases de outras bactérias, comuns aos seres humanos, como é o caso do próprio *S. aureus*. De fato, observamos que antisoro gerado contra uma esfingomielinase é capaz de reconhecer outras esfingomielinases, provavelmente porque estas proteínas possuem grande similaridade de sequência aminoácida.

Portanto, nossos dados não permitem classificar nenhuma das proteínas analisadas como hemolisinas. No entanto, esta possível atividade não está descartada para estas proteínas, principalmente para as semelhantes às esfingomielinases, uma vez que uma série de evidências aponta para o seu papel hemolítico (já discutido).

Uma vez que não conseguimos comprovar o papel destas proteínas como hemolisinas, resolvemos investigar outra atividade em que algumas destas proteínas poderiam estar envolvidas. LipL32, por exemplo, foi previamente associada a propriedades hemolíticas (LEE *et al.* 2000), mas recentemente provou possuir uma função adicional relacionada à ligação a componentes de MEC (HOKE *et al.* 2008). Este relato ilustra como, de fato, é importante que se avaliem propriedades diversas de uma dada proteína, principalmente quando a função a ela atribuída não é confirmada.

Como TlyC foi especificamente reconhecida por soro de paciente com leptospirose, indicando que esta proteína é exposta para o sistema imune, questionamos se ela poderia interagir com outras proteínas do hospedeiro, notavelmente com as macromoléculas da MEC. TlyB, por não ser reconhecida pelo soro e, portanto, não esperada a interagir com as proteínas do hospedeiro, foi também testada. Em nossos experimentos, observamos que TlyC especificamente liga-se a vários componentes da MEC, enquanto TlyB não. TlyC interage com laminina, colágeno IV e com fibronectina plasmática. TlyC liga-se à laminina com uma menor avidéz ($K_d = 184$ nM) que LenB ($K_d = 118$ nM), o membro de uma família de proteínas ligadoras de laminina (Len) de *Leptospira* que apresenta a maior avidéz por esta macromolécula (STEVENSON *et al.* 2007). O K_d aparente calculado para a ligação TlyC-fibronectina (89 nM) foi similar ao K_d calculado para os fragmentos de outras proteínas ligantes de componentes de MEC, LigA e LigB (alcançando entre 69 a 132 nM) (CHOY *et al.* 2007). TlyC ligou-se ao fragmento proteolítico F30 da fibronectina, porém somente

marginalmente ao fragmento F45, em oposição a fragmentos de LigA e LigB, que se ligam igualmente aos dois fragmentos (CHOY *et al.* 2007). Quando examinamos os K_d s aparentes da ligação TlyC-F30 (11 nM), observamos uma avidéz muito grande, cerca de 7 a 18 vezes menor que o K_d s calculados para os fragmentos de LigA e LigB (CHOY *et al.* 2007). A alta avidéz por F30 é corroborada pelo fato de ser necessário uma alta concentração de um conhecido ligante de F30 (heparina) para causar uma pequena inibição (29%) no total de ligação de TlyC-F30. De fato, o fragmento F30 contém o sítio acceptor majoritário para a ligação de bactérias (COSSART *et al.* 2004). A alta avidéz nestas ligações indicam que uma baixa expressão de TlyC por leptospiros poderia ser suficiente para assegurar uma adesão eficiente a MEC. Analisados conjuntamente, nossos resultados indicam que TlyC interage com os componentes principais da MEC, incluindo uma matriz biologicamente ativa (Matrigel). Então, nós sugerimos que TlyC pode estar envolvida na adesão de *Leptospira* ao hospedeiro.

De fato, nós mostramos que a adesão de *Leptospira* ao Matrigel pode ser parcialmente inibida através de competição com TlyC. A inibição obtida foi modesta (17%), mas similar àquela obtida utilizando-se LenA/Lsa24 (em ligação à laminina) obtida por Barbosa *et al.* (2006), mas menor que aquela obtida com LigA (39%) (em ligação à fibronectina) (CHOY *et al.* 2007). As leptospiros provavelmente possuem várias adesinas, de maneira que a inibição por somente uma proteína nunca será completa.

Nós também realizamos um experimento de inibição utilizando soro de pacientes, anti-TlyB, anti-TlyC e soro não imune. Nossos resultados indicam que qualquer soro reduz similarmente a adesão de leptospira ao Matrigel. Os soros de pacientes provaram reconhecer varias proteínas de superfície de *Leptospira* (CHAPMAN *et al.* 1988; CHAPMAN *et al.* 1991; FLANNERY *et al.* 2001; GUERREIRO *et al.* 2001; MATSUNAGA *et al.* 2003; SRIMANOTE *et al.* 2008), incluindo proteínas descritas como ligadoras de MEC (e.g. LipL32 (HOKE *et al.* 2008), TlyC (este trabalho), LigA e LigB (CHOY *et al.* 2007)) e provavelmente muitas outras adesinas de superfície de *Leptospira*. Logo, esta inibição por qualquer soro parece indicar que anticorpos contra as adesinas de leptospira não afetam significativamente a adesão de *Leptospira* ao Matrigel. De fato, ensaios *in vitro* usando soro contra LipL32, o antígeno majoritariamente expresso durante a infecção de leptospira, não foram capazes de bloquear a adesão de leptospiros ao Matrigel (HOKE *et al.* 2008).

A diminuição da adesão na presença de soros poderia ser explicada por uma inibição competitiva, de maneira similar ao que ocorre na inibição da hemólise. Neste caso, as fibronectinas plasmáticas presentes no soro poderiam estar competindo com o Matrigel na ligação às adesinas de leptospira. De fato, algumas das adesinas descritas até o momento ligam-se à fibronectina plasmática (CHOY *et al.* 2007; STEVENSON *et al.* 2007). O fato de a inibição ser parcial (Figura 17A) pode indicar que outras adesinas continuam mediando a adesão das leptospiros nas condições testadas. Estas outras adesinas não possuiriam afinidade por fibronectina plasmática e se ligariam especificamente às MECs que

compõem a membrana basal (o Matrigel se assemelha à membrana basal de mamíferos). Exemplos de adesinas que se ligam especificamente aos componentes da membrana basal são, por exemplo, LenA/Lsa24 (liga-se à laminina) (BARBOSA *et al.* 2006) e LipL32 (liga-se à laminina e colágeno IV) (HOKE *et al.* 2008). Como supusemos no caso das hemolisinas, a ligação da fibronectina plasmática poderia impedir a ligação dos anticorpos (presentes no soro de pacientes) nas adesinas, explicando porque mesmo o soro de pacientes não foi capaz de gerar uma inibição maior que a dos outros soros. Outras proteínas poderiam estar colaborando para este efeito, uma vez que o revestimento da superfície de leptospira com proteínas do soro poderia obstruir fisicamente a ligação dos anticorpos aos seus possíveis alvos, entre eles as proteínas com função de adesão.

Entretanto, o revestimento da superfície de leptospira com outras proteínas do soro do hospedeiro poderia estar colaborando também para uma diminuição generalizada da adesão ao Matrigel. De maneira semelhante à inibição da atuação dos anticorpos, o revestimento geraria uma obstrução física da ligação das adesinas ao Matrigel. Logo, o mesmo fenômeno poderia, por um lado, aumentar a chance das leptospiros evadirem-se do sistema imune, mas, por outro lado, diminuir sua capacidade de aderir ao hospedeiro. De fato, soro (não imune) com o sistema complemento não inativado aumentou a inibição da adesão, talvez porque alguns componentes do complemento possam se depositar na superfície de *Leptospira*. Outra possível explicação para o efeito do sistema complemento poderia ser atribuída a um impacto de mortalidade que ele possa causar em

Leptospira. No entanto, Meri *et al.* (2005) não detectaram diferenças na viabilidade celular quando leptospiras patogênicas foram tratadas com um soro com complemento inativado ou não inativado.

A expressão das proteínas Sph2, SphH, TlyB e TlyC foi detectada em cultivo e *in vivo*. Em cultivo, a detecção da expressão de Sph2 e SphH somente foi observada no sorovar Pomona, enquanto a de TlyB foi detectada em todos os sorovares analisados e a de TlyC foi fracamente observada em quase todos os sorovares que analisamos. Já *in vivo*, durante a infecção de *Leptospira* em hamsters, foi detectada a expressão destas quatro proteínas, embora, uma vez que existe um reconhecimento cruzado entre os soros anti-Sph2 e anti-SphH, não seja possível afirmar com certeza que as duas proteínas estão sendo expressas ou somente uma delas. Além disso, pudemos detectar a transcrição dos genes candidatos durante o cultivo de leptospira em diversas temperaturas. A detecção de alguns transcritos gênicos (*TlyA*, *TlyC* e *HlpA*) foi mais evidente quando o cultivo foi realizado em maiores temperaturas. Isto pode indicar que um aumento de temperatura eleva a transcrição destes genes; tal relação entre expressão gênica e temperatura foi recentemente associada à patogenicidade e à habilidade de proliferação no interior do hospedeiro (LO *et al.* 2006). A presença comum de transcritos dos genes estudados (Figura 18) contrasta com a não detecção da expressão de algumas proteínas (o que ocorreu para Sph2, Sph4 e HlpA); tal fato parece indicar que as condições para a transcrição destes genes são amplas, mas que, porém, a regulação traducional parece ser mais estrita.

Uma vez que a expressão das proteínas Sph2, SphH, TlyB e TlyC foi detectada tanto em cultivo quanto *in vivo*, questionamos se estas proteínas poderiam ser protetoras em um desafio animal em hamsters. Além disso, outros fatores sugeriam que estas proteínas pudessem ser bons candidatos vacinais: (1) elas foram imunogênicas em camundongos; (2) os genes que codificam para estas proteínas estão presentes em diversos sorovares patogênicos de leptospira; e (3) existe certo reconhecimento cruzado entre soro gerado contra alguns antígenos (Sph2 e SphH); isto os tornaria – teoricamente – antígenos eficientes, uma vez que a imunização com somente um deles geraria anticorpos capazes de reconhecer outros antígenos do patógeno, eventualmente bloqueando a função exercida por toda esta classe de proteínas.

Nossos resultados indicaram que, como esperado, estas proteínas (com exceção de SphH) foram capazes de gerar uma resposta imune em hamsters, embora os títulos obtidos tenham sido inferiores àqueles obtidos em camundongos, possivelmente devido ao maior peso dos hamsters ou devido a diferenças no protocolo de imunização. No entanto, embora expressas *in vivo* e imunogênicas, nenhuma das proteínas foi protetora no desafio animal. Logo, nota-se que *Leptospira* possui a capacidade de desenvolver-se em um hospedeiro que possua anticorpos contra algumas proteínas que possivelmente estão envolvidas em toxidez e em adesão. Isto parece indicar que esta bactéria possui sistemas com múltiplos componentes envolvidos na adesão e na obtenção de nutrientes, o que é evidenciado pela presença de múltiplos genes possivelmente associados à hemólise e pelas muitas proteínas já descritas como participantes da

adesão ao hospedeiro. Talvez a indução de anticorpos protetores contra leptospirose seja mais provável utilizando-se uma combinação de proteínas na imunização, para que se maximize a chance de os anticorpos gerados serem realmente capazes de neutralizar os complexos processos bacterianos que são essenciais ao desenvolvimento das leptospirosas.

Além disso, a detecção de anticorpos que reconheçam as esfingomielinases de leptospira em humanos saudáveis pode indicar que *Leptospira* muitas vezes pode encontrar um ambiente hostil em seu hospedeiro, em que anticorpos já existentes reconhecem muitas de suas proteínas. A necessidade de suplantar o efeito de tais anticorpos contra suas proteínas pode ser uma das causas que explique o surgimento de sistemas complexos com múltiplos componentes em *Leptospira*, uma vez que a diversidade de moléculas e de padrões de expressão pode aumentar a chance de sucesso em um ambiente já povoado de anticorpos reativos contra suas proteínas.

Neste trabalho, clonamos, expressamos e purificamos diversas proteínas preditas como hemolisinas em *Leptospira*. No entanto, nenhuma das proteínas recombinantes obtidas foi capaz de hemolisar eritrócitos de carneiro, nem o antisoro gerado contra elas foi capaz de inibir especificamente a atividade hemolítica de elementos expressos por *Leptospira*. Logo, não conseguimos comprovar a predição de atuação como hemolisinas destas proteínas. Então, investigamos outra função em que uma destas proteínas poderia estar envolvida: a adesão a componentes de MEC. Nós mostramos que TlyC interage com os componentes de MEC majoritários, e que estas interações possuem, em geral,

alta avidéz. Por estes motivos, sugerimos que TlyC pode estar envolvida na interação de *Leptospira* com as proteínas do hospedeiro, o que é corroborado pela inibição parcial da adesão de *Leptospira* ao Matrigel através de competição com TlyC. Nós também mostramos que qualquer soro pode parcialmente inibir a adesão de *Leptospira* assim como a sua atividade hemolítica. Estas inibições podem ser o resultado de competição entre os alvos das hemolisinas e adesinas (o eritrócito e o Matrigel, respectivamente) e fatores presentes no soro (os fosfolipídios/esfingomielinas e as fibronectinas plasmáticas, respectivamente). *In vivo*, a hemólise também poderia estar sendo inibida em pessoas saudáveis, devido à presença prévia de anticorpos que reconhecem antígenos de *Leptospira*. Estas observações, embora precisem de maiores confirmações, podem ter implicações no desenvolvimento de futuras vacinas contra leptospirose.

VI – CONCLUSÕES

01. Algumas das proteínas preditas como hemolisinas em *Leptospira* são encontradas em leptospira de vida livre e não possuem domínios claramente relacionados à hemólise.
02. *Leptospira* patogênica secreta elementos hemolíticos, mas a saprofítica não.
03. Nenhuma das proteínas recombinantes obtidas nas condições testadas foi capaz de causar hemólise em eritrócitos de carneiro.
04. Soro gerado contra algumas das esfingomielinases recombinantes é capaz de detectar cruzadamente outras esfingomielinases.
05. Soro de paciente de leptospirose possui anticorpos contra Sph2 e TlyC, no entanto, soro de uma pessoa saudável também pode ser capaz de reconhecer Sph2.
06. TlyC liga-se a laminina, colágeno IV e fibronectina plasmática. Estas interações possuem alta afinidade.
07. A ligação de TlyC à laminina é dependente dos resíduos dos açúcar desta macromolécula.

- 08.** A região de ligação preferencial de TlyC à fibronectina plasmática é o fragmento proteolítico F30. Esta interação possui alta afinidade.
- 09.** TlyC inibe parcialmente a adesão de *Leptospira* ao Matrigel, e deve possuir papel de adesina em *Leptospira*.
- 10.** A capacidade adesiva de *Leptospira* e sua atividade hemolítica são inibidas inespecificamente por qualquer soro, talvez devido a uma inibição competitiva com fatores do soro.
- 11.** *Lepstospira* transcreve todos os genes estudados em cultura, porém somente a expressão de Sph2, SphH, TlyB e TlyC foi detectada, tanto em cultura como *in vivo*.
- 12.** As proteínas recombinantes Sph2, SphH, TlyB e TlyC não foram protetoras em um desafio animal contra leptospirose em hamsters.

VII – RESUMO

A leptospirose é considerada a zoonose mais difundida do mundo, assim como uma doença reemergente. Esta enfermidade, causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*, possui altas taxas de infecção em países em desenvolvimento, ocasionando graves prejuízos econômicos e de saúde pública. Até o momento, não existem vacinas humanas licenciadas contra leptospirose. Após o seqüenciamento do genoma de três espécies de leptospirosas, vários genes foram apontados como candidatos vacinais promissores. Uma categoria importante de genes candidatos são aqueles com possível atividade hemolítica. Neste trabalho, clonamos e expressamos diversas proteínas com possível atuação hemolítica. As proteínas recombinantes obtidas, no entanto, não exibiram atividade hemolítica. Uma destas proteínas, TlyC, foi investigada quanto à sua capacidade de interagir com os componentes da matriz extracelular (MEC). Os resultados obtidos indicam que TlyC liga-se com alta afinidade a diversos componentes da MEC, e que esta proteína é capaz de inibir competitivamente a adesão de leptospirosas à um material biológico que se assemelha à MEC. A transcrição e expressão destas proteínas foi detectada em cultura de *Leptospira*. Algumas das proteínas recombinantes foram utilizadas em um desafio animal contra leptospirose, mas nenhum delas foi protetora. Concluímos que estas proteínas não parecem ser bons candidatos vacinais e que TlyC é uma proteína que interage com componentes da MEC.

VIII – ABSTRACT

Leptospirosis is considered the most disseminated zoonosis of the world, and also a reemerging disease. This disease, caused by pathogenic bacteria of the genus *Leptospira*, has high rates of infection in developing countries, leading to severe economic and medical costs. There is not a licensed vaccine against leptospirosis for human use. After the genome sequencing of three species of leptospires, several genes were pointed to be promising vaccinal candidates. An important category of these candidates are those with putative hemolytic activity. In this work, we cloned and expressed some proteins with putative hemolytic activity. The recombinant proteins obtained, however, did not show hemolytic activity. One of these proteins, TlyC, was investigated with regard to its possible ability to interact to extracellular matrix (ECM) components. The results obtained indicate that TlyC binds with high affinity to several ECM components and that this protein can inhibit the leptospira bind to a biological material that ressembles the ECM. The transcription and expression of these proteins were detected in leptospires cultures. Some of the recombinant proteins were used in an animal challenge against leptospirosis, but none of them were protective. We conclude that these proteins do not seem to be good vaccine candidates and that TlyC is a protein that interacts with the ECM and its components.

IX – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, B., E S. FAINE, 1978 THE ANTIBODIES INVOLVED IN THE HUMAN IMMUNE RESPONSE TO LEPTOSPIRAL INFECTION. *J MED MICROBIOL* **11**: 387-400.
- BARBOSA, A. S., P. A. ABREU, F. O. NEVES, M. V. ATZINGEN, M. M. WATANABE *ET AL.*, 2006 A NEWLY IDENTIFIED LEPTOSPIRAL ADHESIN MEDIATES ATTACHMENT TO LAMININ. *INFECT IMMUN* **74**: 6356-6364.
- BERGAMINI, M., P. FABRIZI, S. PAGANI, A. GRILLI, R. SEVERINI *ET AL.*, 2000 EVIDENCE OF INCREASED CARRIAGE OF *CORYNEBACTERIUM* SPP. IN HEALTHY INDIVIDUALS WITH LOW ANTIBODY TITRES AGAINST DIPHTHERIA TOXOID. *EPIDEMIOL INFECT* **125**: 105-112.
- BHARTI, A. R., J. E. NALLY, J. N. RICALDI, M. A. MATTHIAS, M. M. DIAZ *ET AL.*, 2003 LEPTOSPIROSIS: A ZOONOTIC DISEASE OF GLOBAL IMPORTANCE. *LANCET INFECT DIS* **3**: 757-771.
- BRANGER, C., B. CHATRENET, A. GAUVRIT, F. AVIAT, A. AUBERT *ET AL.*, 2005 PROTECTION AGAINST *LEPTOSPIRA INTERROGANS* SENSU LATO CHALLENGE BY DNA IMMUNIZATION WITH THE GENE ENCODING HEMOLYSIN-ASSOCIATED PROTEIN 1. *INFECT IMMUN* **73**: 4062-4069.
- BRENNER, D. J., A. F. KAUFMANN, K. R. SULZER, A. G. STEIGERWALT, F. C. ROGERS *ET AL.*, 1999 FURTHER DETERMINATION OF DNA RELATEDNESS BETWEEN SEROGROUPS AND SEROVARS IN THE FAMILY LEPTOSPIRACEAE WITH A PROPOSAL FOR *LEPTOSPIRA ALEXANDERI* SP. NOV. AND FOUR NEW *LEPTOSPIRA* GENOMOSPECIES. *INT J SYST BACTERIOL* **49 Pt 2**: 839-858.

- BULACH, D. M., R. L. ZUERNER, P. WILSON, T. SEEMANN, A. MCGRATH *ET AL.*, 2006
GENOME REDUCTION IN LEPTOSPIRA BORGPETERSENII REFLECTS LIMITED
TRANSMISSION POTENTIAL. *PROC NATL ACAD SCI U S A* **103**: 14560-14565.
- CHANG, Y. F., C. S. CHEN, R. U. PALANIAPPAN, H. HE, S. P. McDONOUGH *ET AL.*, 2007
IMMUNOGENICITY OF THE RECOMBINANT LEPTOSPIRAL PUTATIVE OUTER
MEMBRANE PROTEINS AS VACCINE CANDIDATES. *VACCINE* **25**: 8190-8197.
- CHAPMAN, A. J., B. ADLER E S. FAINE, 1988 ANTIGENS RECOGNISED BY THE HUMAN
IMMUNE RESPONSE TO INFECTION WITH LEPTOSPIRA INTERROGANS SEROVAR
HARDJO. *J MED MICROBIOL* **25**: 269-278.
- CHAPMAN, A. J., C. O. EVERARD, S. FAINE E B. ADLER, 1991 ANTIGENS RECOGNIZED
BY THE HUMAN IMMUNE RESPONSE TO SEVERE LEPTOSPIROSIS IN BARBADOS.
EPIDEMIOL INFECT **107**: 143-155.
- CHOY, H. A., M. M. KELLEY, T. L. CHEN, A. K. MOLLER, J. MATSUNAGA *ET AL.*, 2007
PHYSIOLOGICAL OSMOTIC INDUCTION OF LEPTOSPIRA INTERROGANS ADHESION:
LIGA AND LIGB BIND EXTRACELLULAR MATRIX PROTEINS AND FIBRINOGEN.
INFECT IMMUN **75**: 2441-2450.
- COSSART, P., P. BOQUET, S. NORMARK E R. RAPPUOLI, 2004 *CELLULAR MICROBIOLOGY*
ASM PRESS, WASHINGTON, D.C.
- DEL CASTILLO, F. J., S. C. LEAL, F. MORENO E I. DEL CASTILLO, 1997 THE ESCHERICHIA
COLI K-12 SHEA GENE ENCODES A 34-kDA SECRETED HAEMOLYSIN. *MOL*
MICROBIOL **25**: 107-115.
- DEL REAL, G., R. P. SEGERS, B. A. VAN DER ZEIJST E W. GAASTRA, 1989 CLONING OF A
HEMOLYSIN GENE FROM LEPTOSPIRA INTERROGANS SEROVAR HARDJO. *INFECT*
IMMUN **57**: 2588-2590.

- DIESCH, S. L., W. F. McCULLOCH E J. L. BRAUN, 1967 EXPERIMENTAL LEPTOSPIROSIS IN FROGS. NATURE **214**: 1139-1140.
- DOUNGCHAWEE, G., U. KOSITANONT, A. NIWETPATHOMWAT, T. INWISAI, P. SAGARASAERANEE *ET AL.*, 2008 EARLY DIAGNOSIS OF LEPTOSPIROSIS BY IMMUNOGLOBULIN M IMMUNOBLOT TESTING. CLIN VACCINE IMMUNOL **15**: 492-498.
- EVERARD, C. O., D. CARRINGTON, H. KORVER E J. D. EVERARD, 1988 LEPTOSPIRES IN THE MARINE TOAD (BUFO MARINUS) ON BARBADOS. J WILDL Dis **24**: 334-338.
- EVERARD, C. O., G. M. FRASER-CHANPONG, A. C. JAMES E L. V. BUTCHER, 1985 SEROLOGICAL STUDIES ON LEPTOSPIROSIS IN LIVESTOCK AND CHICKENS FROM GRENADA E TRINIDAD. TRANS R SOC TROP MED HYG **79**: 859-864.
- FAINE, S., 1959 IRON AS A GROWTH REQUIREMENT FOR PATHOGENIC LEPTOSPIRA. J GEN MICROBIOL **20**: 246-251.
- FAINE, S., B. ADLER, C. BOLIN E P. PEROLAT, 1999 *LEPTOSPIRA AND LEPTOSPIROSIS*. MEDI SCI, MELBOURNE, AUSTRALIA.
- FAINE, S., A. SHAHAR E M. ARONSON, 1964 PHAGOCYTOSIS AND ITS SIGNIFICANCE IN LEPTOSPIRAL INFECTION. AUST J EXP BIOL MED SCI **42**: 579-588.
- FAISAL, S. M., W. YAN, C. S. CHEN, R. U. PALANIAPPAN, S. P. McDONOUGH *ET AL.*, 2008 EVALUATION OF PROTECTIVE IMMUNITY OF LEPTOSPIRA IMMUNOGLOBULIN LIKE PROTEIN A (LIGA) DNA VACCINE AGAINST CHALLENGE IN HAMSTERS. VACCINE **26**: 277-287.
- FLANNERY, B., D. COSTA, F. P. CARVALHO, H. GUERREIRO, J. MATSUNAGA *ET AL.*, 2001 EVALUATION OF RECOMBINANT LEPTOSPIRA ANTIGEN-BASED ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAYS FOR THE SERODIAGNOSIS OF LEPTOSPIROSIS. J CLIN MICROBIOL **39**: 3303-3310.

- FONSECA CDE, A., M. M. TEIXEIRA, E. C. ROMERO, F. M. TENGAN, M. V. SILVA *ET AL.*, 2006 LEPTOSPIRA DNA DETECTION FOR THE DIAGNOSIS OF HUMAN LEPTOSPIROSIS. *J INFECT* **52**: 15-22.
- GALAZKA, A., 2000 THE CHANGING EPIDEMIOLOGY OF DIPHTHERIA IN THE VACCINE ERA. *J INFECT DIS* **181 SUPPL 1**: S2-9.
- GAMBERINI, M., R. M. GOMEZ, M. V. ATZINGEN, E. A. MARTINS, S. A. VASCONCELLOS *ET AL.*, 2005 WHOLE-GENOME ANALYSIS OF LEPTOSPIRA INTERROGANS TO IDENTIFY POTENTIAL VACCINE CANDIDATES AGAINST LEPTOSPIROSIS. *FEMS MICROBIOL LETT* **244**: 305-313.
- GLOSSER, J. W., C. R. SULZER, M. EBERHARDT E W. G. WINKLER, 1974 CULTURAL AND SEROLOGIC EVIDENCE OF LEPTOSPIRA INTERROGANS SEROTYPE TARASSOVI INFECTION IN TURTLES. *J WILDL DIS* **10**: 429-435.
- GONI, F. M., E A. ALONSO, 2002 SPHINGOMYELINASES: ENZYMOLOGY AND MEMBRANE ACTIVITY. *FEBS LETT* **531**: 38-46.
- GRIFFITH, M. E., D. R. HOSPENTHAL E C. K. MURRAY, 2006 ANTIMICROBIAL THERAPY OF LEPTOSPIROSIS. *CURR OPIN INFECT DIS* **19**: 533-537.
- GUERREIRO, H., J. CRODA, B. FLANNERY, M. MAZEL, J. MATSUNAGA *ET AL.*, 2001 LEPTOSPIRAL PROTEINS RECOGNIZED DURING THE HUMORAL IMMUNE RESPONSE TO LEPTOSPIROSIS IN HUMANS. *INFECT IMMUN* **69**: 4958-4968.
- GUSSENHOVEN, G. C., M. A. VAN DER HOORN, M. G. GORIS, W. J. TERPSTRA, R. A. HARTSKEERL *ET AL.*, 1997 LEPTO DIPSTICK, A DIPSTICK ASSAY FOR DETECTION OF LEPTOSPIRA-SPECIFIC IMMUNOGLOBULIN M ANTIBODIES IN HUMAN SERA. *J CLIN MICROBIOL* **35**: 92-97.

- HAAKE, D. A., M. K. MAZEL, A. M. MCCOY, F. MILWARD, G. CHAO *ET AL.*, 1999
LEPTOSPIRAL OUTER MEMBRANE PROTEINS OMP_{L1} AND LIP_{L41} EXHIBIT
SYNERGISTIC IMMUNOPROTECTION. *INFECT IMMUN* **67**: 6572-6582.
- HEINZ, D. W., L. O. ESSEN E R. L. WILLIAMS, 1998 STRUCTURAL AND MECHANISTIC
COMPARISON OF PROKARYOTIC AND EUKARYOTIC PHOSPHOINOSITIDE-SPECIFIC
PHOSPHOLIPASES C. *J MOL BIOL* **275**: 635-650.
- HOKE, D. E., S. EGAN, P. A. CULLEN E B. ADLER, 2008 LIP_{L32} IS AN EXTRACELLULAR
MATRIX-INTERACTING PROTEIN OF LEPTOSPIRA AND PSEUDOALTEROMONAS
TUNICATA. *INFECT IMMUN*.
- HSU, T., D. L. HUTTO, F. C. MINION, R. L. ZUERNER E M. J. WANNEMUEHLER, 2001
CLONING OF A BETA-HEMOLYSIN GENE OF BRACHYSPIRA (SERPULINA)
HYODYSENTERIAE AND ITS EXPRESSION IN ESCHERICHIA COLI. *INFECT IMMUN* **69**:
706-711.
- HUSEBY, M., K. SHI, C. K. BROWN, J. DIGRE, F. MENGISTU *ET AL.*, 2007 STRUCTURE
AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF BETA TOXIN FROM STAPHYLOCOCCUS AUREUS. *J*
BACTERIOL **189**: 8719-8726.
- HYAKUTAKE, S., P. D. BIASI, H. E. BELLUOMINI E C. A. SANTA ROSA, 1980
LEPTOSPIROSES IN BRAZILIAN SNAKES. *INT J ZOONOSES* **7**: 73-77.
- JAYADEV, S., E Y. A. HANNUN, 1996 CERAMIDE: ROLE IN GROWTH INHIBITORY
CASCADES. *J LIPID MEDIAT CELL SIGNAL* **14**: 295-301.
- JOUGLARD, S. D., S. SIMIONATTO, F. K. SEIXAS, F. L. NASSI E O. A. DELLAGOSTIN,
2006 NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION FOR DETECTION OF PATHOGENIC
LEPTOSPIRES. *CAN J MICROBIOL* **52**: 747-752.

- KASAROV, L. B., 1970 DEGRADATION OF THE ERYTHROCYTE PHOSPHOLIPIDS AND HAEMOLYSIS OF THE ERYTHROCYTES OF DIFFERENT ANIMAL SPECIES BY LEPTOSPIRAE. J MED MICROBIOL **3**: 29-37.
- KELLY, S. M., T. J. JESS E N. C. PRICE, 2005 HOW TO STUDY PROTEINS BY CIRCULAR DICHROISM. BIOCHIM BIOPHYS ACTA **1751**: 119-139.
- KOIZUMI, N., E H. WATANABE, 2005 LEPTOSPIROSIS VACCINES: PAST, PRESENT, AND FUTURE. J POSTGRAD MED **51**: 210-214.
- KOJIMA, T., Y. YANAGIHARA E I. MIFUCHI, 1984 CHARACTERIZATION OF INHIBITOR TO LEPTOSPIRAL HEMOLYSIN PRESENT IN BOVINE SERUM. MICROBIOL IMMUNOL **28**: 291-302.
- LAEMMLI, U. K., 1970 CLEAVAGE OF STRUCTURAL PROTEINS DURING THE ASSEMBLY OF THE HEAD OF BACTERIOPHAGE T4. NATURE **227**: 680-685.
- LAHIRI, S. S., 2000 BACTERIAL TOXINS--AN OVERVIEW. J NAT TOXINS **9**: 381-408.
- LEE, S. H., K. A. KIM, Y. G. PARK, I. W. SEONG, M. J. KIM *ET AL.*, 2000 IDENTIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF A NOVEL HEMOLYSIN FROM LEPTOSPIRA INTERROGANS SEROVAR LAI. GENE **254**: 19-28.
- LEE, S. H., S. KIM, S. C. PARK E M. J. KIM, 2002 CYTOTOXIC ACTIVITIES OF LEPTOSPIRA INTERROGANS HEMOLYSIN SPH_H AS A PORE-FORMING PROTEIN ON MAMMALIAN CELLS. INFECT IMMUN **70**: 315-322.
- LETOCART, M., P. BOERLIN, F. BOERLIN-PETZOLD, J. GOUDET, G. BARANTON *ET AL.*, 1999 GENETIC STRUCTURE OF THE GENUS LEPTOSPIRA BY MULTILOCUS ENZYME ELECTROPHORESIS. INT J SYST BACTERIOL **49**: 231-238.
- LEVETT, P. N., 2001 LEPTOSPIROSIS. CLIN MICROBIOL REV **14**: 296-326.

- LEVETT, P. N., 2003 USEFULNESS OF SEROLOGIC ANALYSIS AS A PREDICTOR OF THE INFECTING SEROVAR IN PATIENTS WITH SEVERE LEPTOSPIROSIS. *CLIN INFECT DIS* **36**: 447-452.
- LIBBY, S. J., W. GOEBEL, A. LUDWIG, N. BUCHMEIER, F. BOWE *ET AL.*, 1994 A CYTOLYSIN ENCODED BY *SALMONELLA* IS REQUIRED FOR SURVIVAL WITHIN MACROPHAGES. *PROC NATL ACAD SCI U S A* **91**: 489-493.
- LINGAPPA, J., T. KUFFNER, J. TAPPERO, W. WHITWORTH, A. MIZE *ET AL.*, 2004 HLA-DQ6 AND INGESTION OF CONTAMINATED WATER: POSSIBLE GENE-ENVIRONMENT INTERACTION IN AN OUTBREAK OF LEPTOSPIROSIS. *GENES IMMUN* **5**: 197-202.
- LO, M., D. M. BULACH, D. R. POWELL, D. A. HAAKE, J. MATSUNAGA *ET AL.*, 2006 EFFECTS OF TEMPERATURE ON GENE EXPRESSION PATTERNS IN *LEPTOSPIRA INTERROGANS* SEROVAR LAI AS ASSESSED BY WHOLE-GENOME MICROARRAYS. *INFECT IMMUN* **74**: 5848-5859.
- LOUVEL, H., S. BOMMEZZADRI, N. ZIDANE, C. BOURSAUX-EUDE, S. CRENO *ET AL.*, 2006 COMPARATIVE AND FUNCTIONAL GENOMIC ANALYSES OF IRON TRANSPORT AND REGULATION IN *LEPTOSPIRA* SPP. *J BACTERIOL* **188**: 7893-7904.
- LUDWIG, A., C. TENDEL, S. BAUER, A. BUBERT, R. BENZ *ET AL.*, 1995 *SLYA*, A REGULATORY PROTEIN FROM *SALMONELLA* TYPHIMURIUM, INDUCES A HAEMOLYTIC AND PORE-FORMING PROTEIN IN *ESCHERICHIA COLI*. *MOL GEN GENET* **249**: 474-486.
- LUPIDI, R., M. CINCO, D. BALANZIN, E. DELPRETE E P. E. VARALDO, 1991 SEROLOGICAL FOLLOW-UP OF PATIENTS INVOLVED IN A LOCALIZED OUTBREAK OF LEPTOSPIROSIS. *J CLIN MICROBIOL* **29**: 805-809.
- MATSUNAGA, J., M. A. BAROCCHI, J. CRODA, T. A. YOUNG, Y. SANCHEZ *ET AL.*, 2003 PATHOGENIC *LEPTOSPIRA* SPECIES EXPRESS SURFACE-EXPOSED PROTEINS

- BELONGING TO THE BACTERIAL IMMUNOGLOBULIN SUPERFAMILY. *MOL MICROBIOL* **49**: 929-945.
- MCBRIDE, A. J., D. A. ATHANAZIO, M. G. REIS E A. I. KO, 2005 LEPTOSPIROSIS. *CURR OPIN INFECT DIS* **18**: 376-386.
- MCBRIDE, A. J., F. A. PEREIRA, E. D. DA SILVA, R. B. DE MATOS, A. G. FERREIRA *ET AL.*, 2007 EVALUATION OF THE EIE-IGM-LEPTOSPIROSE ASSAY FOR THE SERODIAGNOSIS OF LEPTOSPIROSIS. *ACTA TROP* **102**: 206-211.
- MCCLAINE, J. B., W. R. BALLOU, S. M. HARRISON E D. L. STEINWEG, 1984 DOXYCYCLINE THERAPY FOR LEPTOSPIROSIS. *ANN INTERN MED* **100**: 696-698.
- MERI, T., R. MURGIA, P. STEFANEL, S. MERI E M. CINCO, 2005 REGULATION OF COMPLEMENT ACTIVATION AT THE C3-LEVEL BY SERUM RESISTANT LEPTOSPIRES. *MICROB PATHOG* **39**: 139-147.
- MERIEN, F., G. BARANTON E P. PEROLAT, 1997 INVASION OF VERO CELLS AND INDUCTION OF APOPTOSIS IN MACROPHAGES BY PATHOGENIC LEPTOSPIRA INTERROGANS ARE CORRELATED WITH VIRULENCE. *INFECT IMMUN* **65**: 729-738.
- MONTES, L. R., M. B. RUIZ-ARGUELLO, F. M. GONI E A. ALONSO, 2002 MEMBRANE RESTRUCTURING VIA CERAMIDE RESULTS IN ENHANCED SOLUTE EFFLUX. *J BIOL CHEM* **277**: 11788-11794.
- MOREY, R. E., R. L. GALLOWAY, S. L. BRAGG, A. G. STEIGERWALT, L. W. MAYER *ET AL.*, 2006 SPECIES-SPECIFIC IDENTIFICATION OF LEPTOSPIRACEAE BY 16S rRNA GENE SEQUENCING. *J CLIN MICROBIOL* **44**: 3510-3516.
- NASCIMENTO, A. L., A. I. KO, E. A. MARTINS, C. B. MONTEIRO-VITORELLO, P. L. HO *ET AL.*, 2004A COMPARATIVE GENOMICS OF TWO LEPTOSPIRA INTERROGANS SEROVARS REVEALS NOVEL INSIGHTS INTO PHYSIOLOGY AND PATHOGENESIS. *J BACTERIOL* **186**: 2164-2172.

- NASCIMENTO, A. L., S. VERJOVSKI-ALMEIDA, M. A. VAN SLUYS, C. B. MONTEIRO-VITORELLO, L. E. CAMARGO *ET AL.*, 2004B GENOME FEATURES OF LEPTOSPIRA INTERROGANS SEROVAR COPENHAGENI. *BRAZ J MED BIOL RES* **37**: 459-477.
- NIZET, V., 2002 STREPTOCOCCAL BETA-HEMOLYSINS: GENETICS AND ROLE IN DISEASE PATHOGENESIS. *TRENDS MICROBIOL* **10**: 575-580.
- OSCARSSON, J., Y. MIZUNOE, B. E. UHLIN E D. J. HAYDON, 1996 INDUCTION OF HAEMOLYTIC ACTIVITY IN ESCHERICHIA COLI BY THE SLYA GENE PRODUCT. *MOL MICROBIOL* **20**: 191-199.
- PALANIAPPAN, R. U., Y. F. CHANG, C. F. CHANG, M. J. PAN, C. W. YANG *ET AL.*, 2005 EVALUATION OF LIG-BASED CONVENTIONAL AND REAL TIME PCR FOR THE DETECTION OF PATHOGENIC LEPTOSPIRES. *MOL CELL PROBES* **19**: 111-117.
- PALANIAPPAN, R. U., S. P. McDONOUGH, T. J. DIVERS, C. S. CHEN, M. J. PAN *ET AL.*, 2006 IMMUNOPROTECTION OF RECOMBINANT LEPTOSPIRAL IMMUNOGLOBULIN-LIKE PROTEIN A AGAINST LEPTOSPIRA INTERROGANS SEROVAR POMONA INFECTION. *INFECT IMMUN* **74**: 1745-1750.
- PASTER, B. J., E F. E. DEWHIRST, 2000 PHYLOGENETIC FOUNDATION OF SPIROCHETES. *J MOL MICROBIOL BIOTECHNOL* **2**: 341-344.
- PASTER, B. J., F. E. DEWHIRST, W. G. WEISBURG, L. A. TORDOFF, G. J. FRASER *ET AL.*, 1991 PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE SPIROCHETES. *J BACTERIOL* **173**: 6101-6109.
- PETTUS, B. J., C. E. CHALFANT E Y. A. HANNUN, 2002 CERAMIDE IN APOPTOSIS: AN OVERVIEW AND CURRENT PERSPECTIVES. *BIOCHIM BIOPHYS ACTA* **1585**: 114-125.
- PICARDEAU, M., D. M. BULACH, C. BOUCHIER, R. L. ZUERNER, N. ZIDANE *ET AL.*, 2008 GENOME SEQUENCE OF THE SAPROPHYTE LEPTOSPIRA BIFLEXA PROVIDES

- INSIGHTS INTO THE EVOLUTION OF LEPTOSPIRA AND THE PATHOGENESIS OF LEPTOSPIROSIS. PLoS ONE **3**: e1607.
- POMERANTSEV, A. P., K. V. KALNIN, M. OSORIO E S. H. LEPPA, 2003 PHOSPHATIDYLCHOLINE-SPECIFIC PHOSPHOLIPASE C AND SPHINGOMYELINASE ACTIVITIES IN BACTERIA OF THE BACILLUS CEREUS GROUP. INFECT IMMUN **71**: 6591-6606.
- RAMOS, C. R., P. A. ABREU, A. L. NASCIMENTO E P. L. HO, 2004 A HIGH-COPY T7 ESCHERICHIA COLI EXPRESSION VECTOR FOR THE PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEINS WITH A MINIMAL N-TERMINAL HIS-TAGGED FUSION PEPTIDE. BRAZ J MED BIOL RES **37**: 1103-1109.
- RAPPUOLI, R., 2000 REVERSE VACCINOLOGY. CURR OPIN MICROBIOL **3**: 445-450.
- REN, S. X., G. FU, X. G. JIANG, R. ZENG, Y. G. MIAO *ET AL.*, 2003 UNIQUE PHYSIOLOGICAL AND PATHOGENIC FEATURES OF LEPTOSPIRA INTERROGANS REVEALED BY WHOLE-GENOME SEQUENCING. NATURE **422**: 888-893.
- RODRIGUES-LIMA, F., A. C. FENSOME, M. JOSEPHS, J. EVANS, R. J. VELDMAN *ET AL.*, 2000 STRUCTURAL REQUIREMENTS FOR CATALYSIS AND MEMBRANE TARGETING OF MAMMALIAN ENZYMES WITH NEUTRAL SPHINGOMYELINASE AND LYSOPHOSPHOLIPID PHOSPHOLIPASE C ACTIVITIES. ANALYSIS BY CHEMICAL MODIFICATION AND SITE-DIRECTED MUTAGENESIS. J BIOL CHEM **275**: 28316-28325.
- SCHNEERSON, R., J. B. ROBBINS, J. TARANGER, T. LAGERGARD E B. TROLLFORS, 1996 A TOXOID VACCINE FOR PERTUSSIS AS WELL AS DIPHTHERIA? LESSONS TO BE RELEARNED. LANCET **348**: 1289-1292.

- SEGERS, R. P., A. VAN DER DRIFT, A. DE NIJS, P. CORCIONE, B. A. VAN DER ZEIJST *ET AL.*, 1990 MOLECULAR ANALYSIS OF A SPHINGOMYELINASE C GENE FROM LEPTOSPIRA INTERROGANS SEROVAR HARDJO. *INFECT IMMUN* **58**: 2177-2185.
- SEGERS, R. P., J. A. VAN GESTEL, G. J. VAN EYS, B. A. VAN DER ZEIJST E W. GAASTRA, 1992 PRESENCE OF PUTATIVE SPHINGOMYELINASE GENES AMONG MEMBERS OF THE FAMILY LEPTOSPIRACEAE. *INFECT IMMUN* **60**: 1707-1710.
- SILVA, E. F., M. A. MEDEIROS, A. J. MCBRIDE, J. MATSUNAGA, G. S. ESTEVES *ET AL.*, 2007 THE TERMINAL PORTION OF LEPTOSPIRAL IMMUNOGLOBULIN-LIKE PROTEIN LIGA CONFERS PROTECTIVE IMMUNITY AGAINST LETHAL INFECTION IN THE HAMSTER MODEL OF LEPTOSPIROSIS. *VACCINE* **25**: 6277-6286.
- SINAN, 2008 GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA IN [HTTP://DTR2004.SAUDE.GOV.BR/SINANWEB/NOVO/](http://DTR2004.SAUDE.GOV.BR/SINANWEB/NOVO/).
- SMYTHE, L., 1999 LEPTOSPIROSIS WORLDWIDE, 1999. *WKLY EPIDEMIOL REC* **74**: 237-242.
- SOUBEYRAND, B., E S. A. PLOTKIN, 2002 MICROBIAL EVOLUTION: ANTITOXIN VACCINES AND PATHOGEN VIRULENCE. *NATURE* **417**: 609-610; DISCUSSION 610.
- SRIMANOTE, P., N. WONGDEETHAI, P. JIEANAMPUNKUL, S. SAMONKIERT, C. LEEPIYASAKULCHAI *ET AL.*, 2008 RECOMBINANT LIGA FOR LEPTOSPIROSIS DIAGNOSIS AND LIGA AMONG THE LEPTOSPIRA SPP. CLINICAL ISOLATES. *J MICROBIOL METHODS* **72**: 73-81.
- STEVENSON, B., H. A. CHOY, M. PINNE, M. L. ROTONDI, M. C. MILLER *ET AL.*, 2007 LEPTOSPIRA INTERROGANS ENDOSTATIN-LIKE OUTER MEMBRANE PROTEINS BIND HOST FIBRONECTIN, LAMININ AND REGULATORS OF COMPLEMENT. *PLOS ONE* **2**: e1188.

- TARANGER, J., B. TROLLFORS, E. BERGFORS, N. KNUTSSON, V. SUNDH *ET AL.*, 2001
MASS VACCINATION OF CHILDREN WITH PERTUSSIS TOXOID--DECREASED
INCIDENCE IN BOTH VACCINATED AND NONVACCINATED PERSONS. *CLIN INFECT*
Dis **33**: 1004-1010.
- TER HUURNE, A. A., S. MUIR, M. VAN HOUTEN, B. A. VAN DER ZEIJST, W. GAASTRA *ET*
AL., 1994 CHARACTERIZATION OF THREE PUTATIVE SERPULINA HYODYSENTERIAE
HEMOLYSINS. *MICROB PATHOG* **16**: 269-282.
- TITBALL, R. W., 1993 BACTERIAL PHOSPHOLIPASES C. *MICROBIOL REV* **57**: 347-366.
- TROWBRIDGE, A. A., J. B. GREEN, 3RD, J. D. BONNETT, S. B. SHOHET, B. D. PONNAPPA
ET AL., 1981 HEMOLYTIC ANEMIA ASSOCIATED WITH LEPTOSPIROSIS.
MORPHOLOGIC AND LIPID STUDIES. *AM J CLIN PATHOL* **76**: 493-498.
- VAZQUEZ-BOLAND, J. A., M. KUHN, P. BERCHE, T. CHAKRABORTY, G. DOMINGUEZ-
BERNAL *ET AL.*, 2001 LISTERIA PATHOGENESIS AND MOLECULAR VIRULENCE
DETERMINANTS. *CLIN MICROBIOL REV* **14**: 584-640.
- VINETZ, J. M., 2001 LEPTOSPIROSIS. *CURR OPIN INFECT DIS* **14**: 527-538.
- WACK, A., E R. RAPPUOLI, 2005 VACCINOLOGY AT THE BEGINNING OF THE 21ST
CENTURY. *CURR OPIN IMMUNOL* **17**: 411-418.
- WANDERSMAN, C., E I. STOJILJKOVIC, 2000 BACTERIAL HEME SOURCES: THE ROLE OF
HEME, HEMOPROTEIN RECEPTORS AND HEMOPHORES. *CURR OPIN MICROBIOL* **3**:
215-220.
- WANG, Z., L. JIN E A. WEGRZYN, 2007 LEPTOSPIROSIS VACCINES. *MICROB CELL FACT*
6: 39.
- WATT, G., L. P. PADRE, M. L. TUAZON, C. CALUBAQUIB, E. SANTIAGO *ET AL.*, 1988
PLACEBO-CONTROLLED TRIAL OF INTRAVENOUS PENICILLIN FOR SEVERE AND
LATE LEPTOSPIROSIS. *LANCET* **1**: 433-435.

- WOLGEMUTH, C. W., N. W. CHARON, S. F. GOLDSTEIN E R. E. GOLDSTEIN, 2006 THE FLAGELLAR CYTOSKELETON OF THE SPIROCHETES. *J MOL MICROBIOL BIOTECHNOL* **11**: 221-227.
- WORLDWATERDAY, 2001 DISEASE FACT SHEET: LEPTOSPIROSIS IN [HTTP://WWW.WORLDWATERDAY.ORG/WWDAY/2001/DISEASE/LEPTOSPIROSIS.HTM](http://www.worldwaterday.org/wwday/2001/disease/leptospirosis.htm) L.
- YANG, H. L., Y. Z. ZHU, J. H. QIN, P. HE, X. C. JIANG *ET AL.*, 2006 IN SILICO AND MICROARRAY-BASED GENOMIC APPROACHES TO IDENTIFYING POTENTIAL VACCINE CANDIDATES AGAINST LEPTOSPIRA INTERROGANS. *BMC GENOMICS* **7**: 293.
- ZHANG, Y. X., Y. GENG, B. BI, J. Y. HE, C. F. WU *ET AL.*, 2005 IDENTIFICATION AND CLASSIFICATION OF ALL POTENTIAL HEMOLYSIN ENCODING GENES AND THEIR PRODUCTS FROM LEPTOSPIRA INTERROGANS SEROGROUP ICTEROHAE-MORRHAGIAE SEROVAR LAI. *ACTA PHARMACOL SIN* **26**: 453-461.
- ZHANG, Y. X., Y. GENG, J. W. YANG, X. K. GUO E G. P. ZHAO, 2008 CYTOTOXIC ACTIVITY AND PROBABLE APOPTOTIC EFFECT OF SPH2, A SPHIGOMYELINASE HEMOLYSIN FROM LEPTOSPIRA INTERROGANS STRAIN LAI. *BMB REP* **41**: 119-125.
- ZIMMER, C., 2003A INFECTIOUS DISEASES. DARWINIAN VACCINES. *SCIENCE* **300**: 1363.
- ZIMMER, C., 2003B INFECTIOUS DISEASES. TAMING PATHOGENS: AN ELEGANT IDEA, BUT DOES IT WORK? *SCIENCE* **300**: 1362-1364.