Mônica Larucci Vieira

**Análise da expressão de proteínas de
Leptospira interrogans virulentas e
avirulentas pela proteômica**

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

São Paulo
2008

Mônica Larucci Vieira

**Análise da expressão de proteínas de
Leptospira interrogans virulentas e
avirulentas pela proteômica**

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Ana Lúcia Tabet Oller do Nascimento

São Paulo
2008

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Vieira, Mônica Larucci.

Análise da expressão de proteínas de *Leptospira interrogans*
virulentas e avirulentas / Mônica Larucci Vieira. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Ana Lucia Tabet Oller do Nascimento.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia EP/IPT/ICB/Butantan. Área de concentração:
Biotecnologia. Linha de pesquisa: Genômica funcional.

Versão do título para o inglês: Protein expression analysis of virulent
and attenuated *Leptospira interrogans*.

Descritores: 1. *Leptospira interrogans* 2. Proteômica 3. Genômica
funcional 4. Patogenicidade bacteriana I. Nascimento, Ana Lucia
Tabet Oller do II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III.
Título.

ICB/SBIB082/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Mônica Larucci Vieira.

Título da Dissertação: Análise da expressão de proteínas de *Leptospira interrogans* virulentas e avirulentas.

Orientador(a): Ana Lucia Tabet Oller do Nascimento.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

A Glauco e Sandra, meus pais,
responsáveis pela minha
formação, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao terminar esta Dissertação de Mestrado, aproveito para registrar meus agradecimentos àqueles e às instituições que de várias formas contribuíram para a sua realização.

À Dra. Ana Lúcia Tabet Oller do Nascimento pela orientação, confiança e incentivo, e por ter tornado possível o desenvolvimento deste trabalho que tanto incrementou na minha formação.

Ao Instituto Butantan, principalmente ao Centro de Biotecnologia, onde cresci pessoal e cientificamente, e usufruí do ambiente agradável e da excelente estrutura oferecida.

À Universidade de São Paulo (USP) que desde a graduação me propiciou crescimento humano e intelectual.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado e financiamento do projeto, bem como à Fundação Butantan, sem os quais este trabalho não teria sido viável.

Ao Dr. Daniel Carvalho Pimenta pela ajuda e ensinamentos na área de espectrometria de massas, pelas discussões científicas e não-científicas durante as horas de experimentos e, principalmente, pelo apoio e amizade.

Ao Dr. Sílvio Arruda de Vasconcellos e à Zenaide de Moraes pela colaboração com a cultura de leptospiros.

À Dra. Eliete Romero pelo fornecimento de soros de pacientes diagnosticados com leptospirose.

À Dra. Adriana Paes Leme pela ajuda na etapa final de eletroforese bidimensional e à Dra. Solange Serrano pelas discussões científicas.

Ao Dr. Paolo Di Mascio do Instituto de Química da USP e à direção do CAT/CEPID do Instituto Butantan pela disponibilização do equipamento de espectrometria de massas.

Aos companheiros e amigos de laboratório pelo apoio nas horas em que deu tudo errado, sorrisos nas horas em que deu tudo certo, conversas, almoços e discussões de todos os dias: Marina, Tatiane, Mariana, Gabriela, Daniel, Rosane e Raquel.

Aos estudantes, pesquisadores e funcionários do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan pela amizade e convivência durante os últimos anos.

Aos professores de contribuíram para a minha formação.

A todos os amigos que sempre me apoiaram incondicionalmente em todas as horas com seus sorrisos, companheirismo e carinho: da Biologia da USP, do Instituto Butantan, do Badminton, do Rosário e das minhas andanças por este mundo.

Um especial agradecimento aos meus familiares pelo conforto, compreensão e estímulo: meu pai Glauco, minha mãe Sandra, minha irmã Carolina e minha avó Alice.

“Cada coisa tem uma expressão própria, e essa expressão vem-lhe de fora. Cada coisa é a intersecção de três linhas, e essas três linhas formam essa coisa: uma quantidade de matéria, o modo como interpretamos, e o ambiente em que está.”

(Livro do Desassossego, Fernando Pessoa)

“Para o espírito científico, todo o conhecimento é resposta a uma pergunta. Se não há pergunta, não pode haver conhecimento científico. Nada é evidente. Nada é gratuito. Tudo é construído.”

(Gaston Bachelard)

RESUMO

Vieira, M.L. **Análise da expressão de proteínas de *Leptospira interrogans* virulentas e avirulentas pela proteômica.** 2008. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil, 2008.

A leptospirose é considerada a zoonose mais disseminada mundialmente, causada por bactérias da ordem das Spirochaetales, gênero *Leptospira*. A melhor maneira de contornar o problema é através de medidas preventivas, já que a contenção da proliferação de roedores é inviável, e não há vacina eficaz disponível. As estratégias empregadas na genômica funcional têm identificado um número bastante grande de proteínas a serem estudadas. Este fato aliado a dados da literatura, que identificaram proteínas envolvidas na patogenicidade e que são expressas somente em bactérias em condição de virulência, levou à proposição da utilização da proteômica para tentar canalizar os estudos. A metodologia proposta envolveu obtenção de extratos proteicos de leptospiros retiradas de fígados e rins de animais infectados, sua separação por eletroforese bidimensional, e identificação dos *spots* por espectrometria de massas MALDI-TOF. O objetivo central foi a identificação de proteínas expressas em bactérias virulentas e ausentes (não expressas) em leptospiros não-virulentas. A identificação dessas proteínas pode facilitar a busca de proteínas envolvidas na virulência e no processo infeccioso da leptospirose. Adicionalmente, é um avanço para o esclarecimento de aspectos da biologia e da patogenicidade das leptospiros, bem como para o reconhecimento de candidatos potencialmente importantes para a composição de vacinas, e/ou para o desenvolvimento de métodos diagnósticos mais eficientes.

Palavras-chave: *Leptospira interrogans*. Proteômica. Patogenicidade bacteriana. Genômica funcional.

ABSTRACT

Vieira, M.L. **Protein expression analysis of virulent and attenuated *Leptospira interrogans* by proteomics.** 2008. Master thesis (Biotechnology) – Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil, 2008.

Leptospirosis, one of the most spread zoonosis worldwide, is caused by bacteria of the order Spirochaetales, genus *Leptospira*. Preventive measures represent the best alternative to control the disease due to the difficulty to impair the proliferation of rodents and because no efficient vaccine is currently available. Functional genomics strategies have identified a large number of proteins that could be important immunogens that deserve further studies. This fact allied to the published data that reported the identification of proteins involved in pathogenesis and that are expressed only in virulent strains of leptospira, led us to propose the use of proteomics as a tool to narrow down these studies. The methodology involved the preparation of total protein extracts from tissue-derived leptospires, the separation by bidimensional gel electrophoresis and the identification of the protein spots by MALDI-TOF mass spectrometry. The central objective was to identify proteins expressed only in virulent bacteria and absent (non expressed) in avirulent leptospires. The identification of these proteins could help the search for proteins involved in virulence with a role during the infectious process of leptospirosis. Additionally, the data presented here represent a large step to clarify important aspects of the biology and pathogenicity of leptospires, as well as the identification of potentially important vaccine candidates and/or proteins to compose more efficient diagnostic methods.

Key words: *Leptospira interrogans*. Proteomics. Bacterial pathogenicity. Functional genomics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa do vetor pGEM-T-Easy (Promega) de clonagem.	44
Figura 2. Mapa do vetor de expressão pAE.	45
Figura 3. Géis bidimensionais de amostras de extratos protéicos totais de <i>L. interrogans</i> sorovar Pomona cepa LPF utilizando <i>strips</i> da faixa de pH 3 a 10.	67
Figura 4. Géis bidimensionais de amostras de extratos protéicos totais de <i>L. interrogans</i> sorovar Pomona cepa LPF utilizando <i>strips</i> da faixa de pH 3 a 10.	69
Figura 5. Exemplos de proteínas identificadas em múltiplos <i>spots</i> .	72
Figura 6. Distribuição das proteínas identificadas em cada categoria funcional das amostras virulenta de rim, virulenta de fígado e não-virulenta.	79
Figura 7. Distribuição em categorias funcionais de todas as proteínas de leptospira identificadas, baseando-se no banco de dados do genoma de <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni. Predições de localização subcelular com base no programa <i>P-Classififer</i> .	83
Figura 8. Distribuição em categorias funcionais de todas as proteínas de leptospira identificadas, baseando-se no banco de dados do genoma de <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni. Predições com base no programa LipoP.	86
Figura 9. Amplificação por PCR a partir do cDNA de <i>L. interrogans</i> sorovar Pomona cepa LPF virulenta e não-virulenta dos genes LIC11885, LIC11003 e LIC10973.	86
Figura 10. Amplificação por PCR dos genes selecionados para clonagem.	97
Figura 11. Digestão enzimática das construções dos genes de interesse clonados no vetor de expressão pAE.	99

Figura 12. Análise de expressão e solubilidade das proteínas rLIC10314 e rLIC10672 por SDS-PAGE 12%.	.	101
Figura 13. Análise de expressão e solubilidade das proteínas rLIC11003 e rLIC11228 por SDS-PAGE 12%.	.	101
Figura 14. Análise do processo de purificação das proteínas recombinantes rLIC10314 e rLIC10672 em SDS-PAGE 12%.	.	103
Figura 15. Análise, por gel de SDS-PAGE 12%, das proteínas rLIC10314 e rLIC10672 purificadas por cromatografia de afinidade a níquel.	.	103
Figura 16. Análise por <i>Western Blotting</i> da reatividade das proteínas rLIC10314 e rLIC10672 com soros de pacientes diagnosticados com leptospirose.	.	105
Figura 17. Análise por <i>Western Blotting</i> da ligação das proteínas rLIC10314 e rLIC10672 a componentes de matriz extracelular.	.	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação dos dados genômicos de <i>Leptospira</i> spp. seqüenciados.	31
Tabela 2. Protocolo de isoeletrofocalização utilizado.	48
Tabela 3. Oligonucleotídeos sintéticos desenhados para a amplificação dos genes LIC10314, LIC10672, LIC11003 e LIC11228 por PCR, a partir do DNA genômico de <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni.	58
Tabela 4. Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados no seqüenciamento dos genes clonados no vetor pAE.	60
Tabela 5. Soros de pacientes diagnosticados com leptospirose utilizados na avaliação da reatividade das proteínas recombinantes purificadas.	62
Tabela 6. Balanço do número de <i>spots</i> excisados e identificados de cada gel 2D de culturas independentes de cada tipo amostral.	66
Tabela 7. Balanço do número de <i>spots</i> excisados e identificados das amostras obtidas das triplicatas de géis 2D das condições de virulência e não-virulência.	68
Tabela 8. Listagem das 134 proteínas diferentes de leptospira identificadas significativamente no programa MASCOT a partir dos PMF obtidos por espectrometria de massas MALDI-TOF.	73
Tabela 9. Distribuição das proteínas identificadas nas categorias funcionais.	78
Tabela 10. Análise pelo programa <i>Pathway Analyst</i> das proteínas identificadas integrantes de 10 rotas metabólicas.	81
Tabela 11: Genes codificantes das proteínas selecionadas para clonagem (sorovar Copenhageni), e homólogos gênicos nas outras cepas de <i>Leptospira</i> seqüenciadas.	95

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. Espectro obtido através da técnica de espectrometria de massas MALDI-TOF para um <i>spot</i> de amostra virulenta de rim.	123
ANEXO B. Predição do mapa metabólico de <i>L. interrogans</i> baseado nas informações genômicas.	124
ANEXO C. Predição da localização celular de todas as proteínas de leptospira identificadas significativamente.	125
ANEXO D. Seqüências de aminoácidos das proteínas nativas de <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni LIC10314, LIC10672, LIC11003 e LIC11228.	129
ANEXO E. Seqüenciamentos das regiões 5' das construções pAE-LIC10314, pAE-LIC10672, pAE-LIC11003 e pAE-LIC11228.	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μA – microampere

μg – micrograma

μL – microlitro

μm – micrômetro

2D – Bidimensional

2DE – Eletroforese bidimensional (*Two-dimensional gel electrophoresis*)

ACN - Acetonitrila

ASB-14 – Amidosulfobetaina-14

ATP – Adenosil tri-fosfato

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

BSA – Albumina sérica bovina

CD – *Conserved Domains*

cDNA – Ácido desoxiribonucleico complementar

CHAPS – 3-[(3-cholamidopropil)-dimetilamonio]-1 propanosulfonato

Clp – Protease caseinólítica

cm – centímetro

Da – dalton

ddNTP – 2',3'didesoxirribonucleotídeos

DNA – Ácido desoxiribonucleico

dNTP – Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DTT – Ditioteitol

EDTA – Ácido etilenodiamino tetracético

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

EMJH – Meio de cultura Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris

ESI – Ionização eletrospray (*Electrospray ionization*)

FKBP – Proteínas ligadoras de *FK506*

FMV – Faculdade de Medicina Veterinária

g – grama

h – hora

IPG – Fitas de gel com pH imobilizado em gradiente

IS – Elementos genéticos móveis (*insertion sequences*)

Kb – quilobase

KDa – quilodalton

LIC – *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni (denominação das ORFs)

LipL – Lipoproteína de leptospira (*leptospiral lipoprotein*)

LPS – Lipopolissacarídeo

M – molar

m/z – Relação massa/carga

mA – miliampere

MALDI-TOF – *Matrix assisted laser desorption ionization – Time-of-flight*

MAT – Teste de microaglutinação

Mb – megabase

mg – miligrama

min – minuto

mL – mililitro

mM – milimolar

MOUSE – *Molecular Weight Search* (programa)

MSDB – *Comprehensive, non-identical protein database* (banco de dados)

ng – nanograma

nm – nanômetro

°C – graus Celsius

Omp – Proteína de membrana externa (*outer membrane protein*)

ORF – quadros de leitura (*Open reading frame*)

pb – Pares de bases

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

PCR – Reação em cadeia de polimerase

pH – Potencial de hidrogênio

pI – Ponto isoelétrico

PMF – *Peptide mass fingerprint*

pmoles – picomoles

PMSF – Fenilmetilsulfonil fluoreto

RNA – Ácido ribonucleico

RNA_m – Ácido ribonucleico mensageiro

RNA_r – Ácido ribonucleico ribossomal

rpm – Rotações por minuto

RT – Transcriptase reversa

s – segundo

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

SES-SP – Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo

SpI – Sinal peptidase I

SpII – Sinal peptidase II

spp. – Espécies

TCA – Ácido tricarboxílico

TFA – Ácido trifluoroacético

Tris - Hidroximetilaminometano

U - Unidade

UV – Ultra-violeta

V – Volt

V/h – Volt por hora

W – Watt

x g – Força centrífuga relativa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 A leptospirose	21
1.2 Impactos econômicos da leptospirose	22
1.3 Taxonomia e classificação das leptospirosas	23
1.4 Aspectos biológicos e morfológicos das leptospirosas	24
1.5 Metabolismo e cultivo de leptospirosas	25
1.6 Leptospirose humana	26
1.7 Diagnóstico laboratorial e tratamento da leptospirose	27
1.8 Vacinas profiláticas	28
1.9 Seqüenciamento genômico de <i>Leptospira</i> spp.	29
1.10 Patogenicidade de <i>Leptospira</i> spp.	32
1.11 Proteômica	35
1.12 Estado da arte: Proteoma de <i>Leptospira</i> spp.	38
2 OBJETIVO	41
2.1 Objetivos Específicos	41
3 MATERIAIS E METODOLOGIA	43
3.1 Bactérias e vetores	43
3.2 Cultura de leptospirosas virulentas e não-virulentas	46
3.3 Obtenção dos extratos protéicos totais	47
3.4 Dosagem de proteínas	47
3.5 Eletroforese em gel Bidimensional	48
3.6 Coloração dos géis	49
3.7 Visualização e análise dos géis	50
3.8 Preparação das amostras para Espectrometria de Massas	50
3.9 Determinação da massa dos peptídeos por MALDI-TOF	52
3.10 Identificação das proteínas em bancos de dados a partir da massa dos peptídeos identificados por MALDI-TOF	53
3.11 Análise bioinformática complementar das proteínas identificadas	53
3.12 Extração de RNA das cepas virulenta e não-virulenta	55
3.13 Tratamento dos RNAs extraídos com DNase I	56

3.14 Transcrição Reversa	56
3.15 Extração de DNA de leptospiros	57
3.16 Amplificação dos genes de interesse por PCR	57
3.17 Clonagem em vetor de amplificação	58
3.18 Clonagem em vetor de expressão	58
3.19 Seqüenciamento	59
3.20 Expressão das proteínas recombinantes	60
3.21 Análise de solubilidade das proteínas recombinantes	60
3.22 Purificação das proteínas recombinantes	61
3.23 Reatividade das proteínas recombinantes purificadas com soros de pacientes diagnosticados com leptospirose	61
3.24 Avaliação da capacidade de adesão das proteínas recombinantes purificadas a componentes de matriz extracelular	63
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1 Cultura de leptospiros	64
4.2 Géis Bidimensionais	64
4.3 Proteínas identificadas	70
4.4 Categorias funcionais	77
4.5 Rotas metabólicas	79
4.6 Localização celular	82
4.7 Proteínas de membrana e lipoproteínas	84
4.8 Proteínas hipotéticas	87
4.9 Metabolismo de proteínas	89
4.10 Comparação com dados da literatura	90
4.11 Proteínas selecionadas para clonagem e expressão	94
4.12 Amplificação das proteínas selecionadas para clonagem	96
4.13 Clonagem dos genes amplificados no vetor pGEM-T-Easy	97
4.14 Clonagem em vetor de expressão pAE	98
4.15 Seqüenciamento	98
4.16 Expressão e análise de solubilidade das proteínas recombinantes	99
4.17 Purificação das proteínas rLIC10314 e rLIC10672	102

4.18 Análise da reatividade de rLIC10314 e rLIC10672 com soros de	
pacientes diagnosticados com leptospirose	104
4.19 Avaliação da capacidade de adesão de rLIC10314 e rLIC10672 a	
componentes de matriz extracelular	106
5 CONCLUSÃO	109
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
ANEXOS	123

1 INTRODUÇÃO

1.1 A leptospirose

A leptospirose é considerada uma das zoonoses mais disseminadas mundialmente, causada por bactérias patogênicas da ordem Spirochaetales, gênero *Leptospira* (FAINE *et al.*, 1999; VINETZ, 2001). Mesmo tendo uma distribuição mundial, a doença ocorre, principalmente, em regiões tropicais devido ao ambiente quente e úmido que favorece a sobrevivência das bactérias livres no ambiente durante seu ciclo de transmissão. É uma doença endêmica de característica sazonal no Brasil e em outros países da América Latina, com surtos epidêmicos nas épocas chuvosas associados aos eventos de inundações e enchentes (KO *et al.*, 1999; LOMAR *et al.*, 2000).

É uma doença de caráter recreativo ou ocupacional, oferecendo como principal risco de contágio atividades nas quais ocorre contato com a água, como trabalhadores de esgoto e praticantes de esportes aquáticos (HAAKE, 2002). Há incidência de leptospirose tanto em áreas urbanas quanto rurais. Entretanto, a maior parte dos casos ocorre em regiões metropolitanas periféricas de países pobres ou em desenvolvimento, associados às precárias ou inexistentes redes de saneamento básico, que propiciam a proliferação dos roedores - principais vetores das leptospirosas. Assim, no contexto urbano, a leptospirose atinge principalmente pessoas de baixo nível sócio-econômico, e o seu controle está diretamente relacionado a melhorias nas condições de saneamento básico (REIS *et al.*, 2008).

Os humanos são hospedeiros acidentais e terminais dentro da cadeia de transmissão do agente patogênico *Leptospira* (FAINE *et al.*, 1999), sendo a principal fonte para a sua infecção o contato com águas contaminadas com a urina dos animais infectados (PLANK e DEAN, 2000). Esses animais albergam as bactérias nos rins e as eliminam vivas no meio ambiente, re-infectando constantemente o solo, a água e outros animais. Os principais reservatórios urbanos das leptospirosas são os roedores sinantrópicos, como *Rattus norvegicus* (ratazana ou rato de esgoto), *Rattus rattus* (rato-preto) e *Mus musculus*

(camundongo); outros mamíferos de menor importância são os caninos, suínos, bovinos, eqüinos, ovinos e caprinos.

O rápido crescimento populacional, o aumento de favelas, eventos de enchentes e a falta de saneamento básico têm contribuído para a manutenção de condições para a proliferação dos roedores nas cidades. Como o controle de roedores nos centros urbanos é difícil, a melhor estratégia para combater o problema da doença é a adoção de medidas preventivas como cuidados pessoais, higiene, saneamento e vacinação.

1.2 Impactos econômicos da leptospirose

No Brasil, em outros países da América Latina e em países asiáticos como a Índia, por exemplo, a leptospirose é um grave problema de saúde pública (KO *et al.*, 1999, LOMAR *et al.*, 2000; BHARADWAJ *et al.*, 2002). Quando diagnosticada, o tratamento envolve uma combinação de antibióticos e medidas de suporte. Nos casos mais graves, o tratamento requer hospitalização com necessidade de diálise renal, tratamento dos quadros hemorrágicos e acompanhamento intensivo. Assim, além de sua alta letalidade, a leptospirose representa um problema econômico para o sistema de saúde pública, uma vez que o tratamento é de alto custo hospitalar (FAINE *et al.*, 1999).

A leptospirose é uma doença de notificação compulsória no Brasil desde 1985, com 53.444 casos confirmados no período de 1985 a 2003, e média anual de 309 óbitos, tendo a letalidade variado de 6,6% (1996) até 20% (1987) (dados da Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo – SES-SP, 2006). Apenas no estado de São Paulo, segundo documento do ano de 2008 do Centro de Vigilância Epidemiológica “Professor Alexandre Vranjac”, do Governo do Estado de São Paulo, 13.748 casos foram confirmados no período de 1986 a 2007, com média anual de 625 casos, sendo o coeficiente médio de incidência de 1,79 para cada 100.000 habitantes. Ainda baseando-se nesses dados, foi reportada uma média de 80 óbitos anuais devido à leptospirose no mesmo período (letalidade de 13,18%).

Apesar de bastante significativos, acredita-se que esses números sejam subestimados devido à falha no diagnóstico, ou falta de notificação dos órgãos

competentes pelos hospitais. Tendo em vista isso, fica evidente a importância da leptospirose na Saúde Pública brasileira.

Além do impacto econômico social, essa zoonose ainda acarreta grande impacto econômico na pecuária, pois, além de humanos e roedores, as leptospirosas infectam outros mamíferos. Deste modo, é uma importante doença infecciosa relacionada a transtornos da reprodução, acometendo rebanhos de bovinos, suínos, eqüinos e outros. Nos bovinos, as leptospiroses causam consideráveis perdas econômicas em decorrência de repetições de cio, infertilidade, mastites, abortos, natimortalidade, bezerros prematuros, nascimento de bezerros fracos, mortes, e decréscimo na produção leiteira e de carne (MOREIRA, 1994; FAINE *et al.*, 1999; SHELDON e DOBSON, 2003).

1.3 Taxonomia e classificação das leptospirosas

As leptospirosas são filogeneticamente classificadas dentro do *filum* Spirochetes, ordem Spirochaetales, pertencendo à família Leptospiraceae, composta pelos gêneros *Leptospira* spp., *Turneria* spp. e *Leptonema* spp. (HAAKE, 2000). Análises filogenéticas baseadas em seqüências de RNAr 16S, indicam que membros da família Leptospiraceae formam o ramo mais antigo na evolução das espiroquetas, com a divergência de espécies saprofíticas e patogênicas de *Leptospira* sendo resultado de um único evento (HAAKE *et al.*, 2004; PICARDEAU *et al.*, 2008). Compõem a ordem das espiroquetas, juntamente com *Leptospira* spp., outras bactérias patogênicas como *Borrelia burgdorferi*, causadora da doença de Lyme, e *Treponema pallidum*, causadora da sífilis.

Há duas formas de classificação de *Leptospira* spp.: uma molecular, baseada em técnicas gênicas; e outra sorológica, baseada em determinantes antigênicos. Ambas reconhecem espécies patogênicas e saprofíticas.

A sorologia foi o método utilizado para a classificação das leptospirosas até o final da década de 1980 (DIKKEN e KMETZ, 1978), e, hoje em dia, as amostras ainda são comumente referidas pelo sorovar. A classificação sorológica é fundamentada em testes de aglutinação microscópica, sendo agrupados no mesmo sorovar os isolados que apresentam reatividade cruzada com soros de animais

infectados com sorovares determinados. Atualmente, as leptospiros são classificadas em mais de 250 sorovares distribuídos em 24 sorogrupos diferentes (FARR, 1995; FAINE *et al.*, 1999; LEVETI, 2001; BHARTI *et al.*, 2003). Os sorovares mais patogênicos ao homem e prevalentes nos centros urbanos são o Copenhageni e o Icterohaemorrhagiae.

A diversidade de sorovares reside na heterogeneidade de carboidratos que compõem a cadeia lateral dos lipopolissacarídeos (LPSs) da membrana bacteriana, que podem refletir um caráter adaptativo para a infecção de uma gama maior de novas espécies hospedeiras (FARR, 1995; FAINE *et al.*, 1999; BHARTI *et al.*, 2003). Por analogia com outros patógenos bacterianos, acredita-se que o LPS de leptospiros desempenhe um papel essencial na evasão imune durante a patogênese, impedindo a ação de macrófagos e prevenindo a ativação da via alternativa do sistema complemento (MERI *et al.*, 2005).

Com o advento de técnicas moleculares, a classificação por sorovares começou a ser revisada. Apesar da reclassificação por genotipagem ser taxonomicamente mais confiável, ainda requer maior amplitude e refinamento, permanecendo motivo de controvérsia entre os microbiologistas por ser incompatível com o sistema sorológico adotado por clínicos e epidemiologistas (BHARTI *et al.*, 2003). A classificação molecular do gênero *Leptospira* é baseada no grau de hibridização de DNA. Assim, o gênero divide-se em 17 espécies definidas, com pelo menos 70% de similaridade gênica, e com divergência de pelo menos 5% de bases não pareadas.

1.4 Aspectos biológicos e morfológicos das leptospiros

As leptospiros são bactérias móveis flageladas, gram-negativas e aeróbicas obrigatórias (HAAKE, 2000). São células longas, finas e helicoidais, exibindo espiras curtas e regulares para o lado direito. Suas extremidades são encurvadas em forma de ganchos típicos. Apresentam algumas características únicas entre as bactérias, como a presença de dois flagelos periplasmáticos axiais, ancorados em ambas as extremidades da célula. Sua mobilidade se dá por rotação, impulsionada pelos flagelos periplasmáticos. Em geral, têm tamanho de 0,1 a 0,15 µm de

diâmetro por 6,0 a 12,0 μm de comprimento. Não é possível observá-las em microscópio ótico comum, mas podem ser visualizadas em microscópio de campo escuro ou contraste de fase (FAINE *et al.*, 1999). A maioria não é corada pela coloração de Gram, mas podem ser coradas por impregnação por sais de prata.

As leptospiros possuem membrana de bicamada lipídica externa envolvendo a parede celular de peptidoglicanos delimitando o espaço periplasmático (CHARON e GOLDSTEIN, 2002). Distribuídos na membrana externa, possuem LPSs de composição semelhante aos de outras bactérias gram-negativas. Os LPSs são compostos por três segmentos ligados covalentemente: lipídeo A, *core*, e antígeno O. O lipídeo A é uma porção lipídica altamente conservada, que ancora o LPS à membrana externa celular. O *core* é uma porção polissacarídica que forma a região intermediária, e, mais externamente, localiza-se o antígeno O, que consiste em grupos polissacarídicos altamente variáveis. O antígeno O é considerado o principal agente antigênico dos LPSs das bactérias gram-negativas (FAINE *et al.*, 1999). Mas, um fato interessante a ser ressaltado é que em leptospiros o LPS parece conferir menor endotoxidade, sendo várias ordens de magnitude menos potente na ativação de macrófagos do que endotoxinas de gram-negativas (WERTS *et al.*, 2001).

1.5 Metabolismo e cultivo de leptospiros

As leptospiros são microorganismos quimiorganotróficos aeróbicos, que utilizam oxigênio como aceptor final da cadeia de transporte de elétrons. Em condições de cultivo em laboratório, não utilizam açúcares ou aminoácidos como fonte energética, apesar de possuírem em seu genoma os genes codificantes para todas as enzimas componentes da via glicolítica, com uma alteração notável: presença da enzima pirofosfato-frutose-6-fosfato-1-fosfotransferase, ao invés da fosfofrutoquinase (NASCIMENTO *et al.*, 2004a). A fonte de carbono e energia utilizada são ácidos graxos de cadeia longa com mais de 15 carbonos, dos quais grande parte da energia, se não inteiramente, é obtida através de β -oxidação (FAINE *et al.*, 1999). Os carboidratos podem ser sintetizados pelo ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), via das pentoses-fosfato não-oxidativa, e vias do glicoxalato

ou fosfogluconato (FAINE *et al.*, 1999). São catalase e oxidase positivas, mas não possuem superóxido dismutase (NASCIMENTO *et al.*, 2004a).

As leptospirosas podem ser cultivadas *in vitro* em meios de cultura artificiais, porém, a disponibilidade de CO₂ e ácidos graxos de cadeia longa são essenciais. O meio de cultura mais utilizado é o Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), que possui *tweens* – ácidos graxos complexados a sorbitol – como fonte de carbono, e albumina sérica bovina (BSA) como agente detoxificante. Geralmente, utiliza-se uma suplementação do meio EMJH com 8-12% de soro de coelho levemente hemolisado como fonte de ferro, cianocobalamina, albumina, ácidos graxos, e outros nutrientes (FAINE *et al.*, 1999).

As culturas crescem em temperatura ótima de 28 a 30°C, e pH ótimo de 7.2 a 7.6, tendo tempo de geração de 6 a 16h (LEVETT, 2001). As densidades das culturas não alcançam as obtidas com bactérias convencionais, mas atingem concentrações de 10⁷ a 10⁸ células/mL, com turbidez visível a partir do 4º ou 5º dia (FAINE *et al.*, 1999). Isolados clínicos de mamíferos são dificilmente cultiváveis, podendo permanecer em fase estacionária por dias ou semanas, não apresentando bom crescimento nem em temperatura fisiológica de 37°C. Curiosamente, sorovares diferentes são *in vitro* comumente mutuamente exclusivos, o que parece não ocorrer *in vivo* (FAINE *et al.* 1999).

1.6 Leptospirose humana

Geralmente, a leptospirose humana não é uma doença fatal. A doença ocorre pela penetração ativa dos microrganismos através das mucosas (ocular, digestiva, respiratória e genital), ou por meio da pele lesada ou mesmo íntegra (FAINE *et al.*, 1999; LEVETT, 2001; BHARTI *et al.*, 2003). Após a penetração, as leptospirosas percorrem as vias linfáticas e sanguíneas, atingindo sítios imunologicamente privilegiados, como túbulos renais, fígado, cérebro e olhos, onde persistem e se multiplicam (FAINE *et al.*, 1999). O tempo de incubação da doença, até o surgimento dos sintomas, pode ser de algumas horas até 28 dias, sendo em média de 7 a 15 dias.

A fase inicial, denominada leptospiremia, caracteriza-se por sintomatologia ampla e inespecífica, como febre, calafrios, cefaléia e mialgia, podendo ser confundida com outras doenças como gripe, dengue e algumas doenças virais. O amplo espectro de sintomas clínicos é o principal motivo da doença ser subdiagnosticada ou não reportada na maioria das vezes (PLANK e DEAN, 2000), gerando, assim, um baixo índice de casos notificados.

A leptospirose ainda pode evoluir para uma condição mais severa, conhecida como síndrome de Weil (descrita por Weil em 1886), que corresponde a aproximadamente 5% a 15% dos casos, que podem se desenvolver para quadros caracterizados por hemorragias, icterícia, falência renal, meningite e hipotensão (FAINE *et al.*, 1999; LEVETT, 2001; VINETZ, 2001). Esses casos chegam a atingir uma letalidade de 15%, geralmente associada à falência múltipla de órgãos e hemorragias pulmonares (BHARTI *et al.*, 2003).

1.7 Diagnóstico laboratorial e tratamento da leptospirose

Como os sintomas da leptospirose são amplos e inespecíficos para a doença, a experiência clínica, a avaliação do ambiente epidemiológico e história clínica do paciente podem contribuir para o diagnóstico médico; porém, a confirmação da leptospirose só é possível através de diagnóstico laboratorial. Os métodos de diagnóstico de leptospirose disponíveis atualmente incluem microscopia, histopatologia, cultivo e sorologia – como teste de aglutinação microscópica (MAT), aglutinação macroscópica, hemaglutinação indireta, aglutinação microcapsular, ou ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) (THONGBOONKERD, 2008).

Entre os métodos sorológicos, o mais utilizado é o MAT. No entanto, é um teste de difícil padronização, controle e interpretação, sendo realizado apenas em alguns laboratórios de referência. É um método relativamente pouco sensível e subjetivo. Além disso, um dos maiores problemas da sua realização é a necessidade de manutenção de culturas de diferentes sorovares de leptospirosas vivas e virulentas para a reação com soro de pacientes. O MAT baseia-se na composição dos LPSs de membrana, e na reatividade dos anticorpos dos soros

dos pacientes com esses antígenos de superfície das leptospiros (BHARTI *et al.*, 2003). Na fase inicial da doença, o título de anticorpos séricos ainda é muito baixo (FAINE *et al.*, 1999) e a detecção de anticorpos na evolução da infecção humana é tardia, sendo as sorologias inteiramente confiáveis apenas a partir do 5º ao 7º dias de doença (LEVETT, 2003), quando já podem haver muitos danos causados pelas bactérias instaladas no paciente (BHARTI *et al.*, 2003). Além do diagnóstico tardio, o MAT pode apresentar inespecificidades geradas por reações cruzadas entre os sorovares.

Como alternativa ao MAT, outros métodos têm sido usados para a detecção de anticorpos para o diagnóstico de leptospirose. Testes de ELISA têm se mostrado sensíveis e reprodutíveis, mas ainda não há um antígeno precoce e específico o suficiente para detectar a doença em sua fase inicial (AHMAD *et al.*, 2005; FAINE *et al.*, 1999). No laboratório de pesquisa deste trabalho já foram identificadas proteínas promissoras para a composição de um método diagnóstico. As proteínas recombinantes Lp29 e Lp49 exibiram reatividade com soros de pacientes convalescentes tanto na fase aguda quanto inicial da doença, quando o MAT resulta em negativo (NEVES *et al.*, 2007). Estes dados, entretanto, necessitam de confirmação contra um número mais significativo de soros.

Entre os métodos moleculares, técnicas de PCR (reação da polimerase em cadeia – *polymerase chain reaction*) vêm sendo desenvolvidas para a detecção de leptospirose. Por PCR pode-se amplificar, seletivamente, seqüências alvos de DNA a partir de líquido e urina de pacientes com leptospirose (MÉRIEN *et al.*, 1992; LEVETT *et al.*, 2005; FONSECA *et al.*, 2006). Porém, o método de PCR é limitado, já que a sonda utilizada é um fragmento de um gene ribossomal, presente tanto em leptospiros patogênicas como não-patogênicas.

1.8 Vacinas profiláticas

Estão disponíveis atualmente no mercado vacinas para uso veterinário obtidas a partir de preparação de leptospiros atenuadas ou inativadas por formaldeído ou calor. Porém, a resposta imune desencadeada a partir dessas preparações é ativada, principalmente, pela porção polissacarídica dos LPSs das

bactérias. Esses antígenos estimulam uma resposta timo independente, não induzindo, portanto, proteção a longo prazo contra a infecção, o que torna necessária sua administração anual ou semestral (BOLIN *et al.*, 1989). Além disso, são sorovares específicas, ou seja, não promovem proteção cruzada contra leptospiroses de sorovares diferentes dos incluídos na preparação vacinal (FAINE *et al.*, 1999; LEVETT, 2001).

Até o momento, somente Cuba possui uma vacina licenciada para uso em humanos, composta de bactérias inativadas (MARTINEZ *et al.*, 1998; MARTINEZ *et al.*, 2000; MARTINEZ *et al.*, 2004). Essa vacina apresenta problemas semelhantes às de uso veterinário, sendo sorovar-específica e requerendo administração periódica. Portanto, não existe uma vacina eficiente para uso humano, nem veterinário.

Dada a grande dificuldade de preparar uma vacina de LPSs multivalente que compreenda todos os sorovares patogênicos mais importantes, torna-se crítica a identificação de antígenos protéicos conservados para a preparação de vacinas contra os sorovares patogênicos predominantes. Por isso, a busca de proteínas relacionadas à patogenicidade ou virulência, e que tenham um amplo espectro de conservação dentre os principais sorovares patogênicos ao homem vem sendo perseguida por vários grupos de pesquisa no mundo (HAAKE *et al.*, 1999; MERIEN *et al.*, 2000; PALANIAPPAN *et al.*, 2002; CULLEN *et al.*, 2003; GAMBERINI *et al.*, 2005; BARBOSA *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2006; VIEIRA, *et al.*, 2007; RISTOW *et al.*, 2007; FAISAL *et al.*, 2008; ATZINGEN *et al.*, 2008). A identificação dessas proteínas poderá servir de base para o desenvolvimento de uma vacina que seja eficiente contra a leptospirose, e confira proteção a longo prazo.

1.9 Sequenciamento genômico de *Leptospira* spp.

Estão disponíveis publicamente os sequenciamentos genômicos de cinco cepas de leptospiroses, compreendendo duas espécies patogênicas e uma espécie saprofítica. Os organismos patogênicos sequenciados foram: *L. interrogans* sorovar Lai cepa 56601 (REN *et al.*, 2003), *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz

L1-130 (NASCIMENTO *et al.*, 2004a), e *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo cepas L550 e JB197 (BULACH *et al.*, 2006). A leptospira não patogênica seqüenciada é da espécie *L. biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc1 (PICARDEAU *et al.*, 2008).

A Tabela 1 resume e compara as principais características dos referidos genomas. Brevemente, ambas as espécies patogênicas seqüenciadas possuem dois cromossomos circulares, sendo um maior e outro menor, com respectivamente cerca de 4,3 Mb e 350 Kb em *L. interrogans*, e 3,6 Mb e 300 Kb em *L. borgpetersenii*. A espécie saprofítica, *L. biflexa*, possui igualmente dois cromossomos, com cerca de 3,6 Mb e 270 Kb, e, adicionalmente, um terceiro replicon circular de aproximadamente 74 Kb, denominado de P74, ausente nos genomas das leptospiiras patogênicas. Ainda não é sabido se P74 pode ser considerado um cromossomo, isto é, se carrega genes essenciais, ou se é um elemento extracromossomal ou plasmídeo, embora haja indícios de que seja essencial por possuir genes de metabolismo basal presentes no cromossomo maior das espécies patogênicas (PICARDEAU *et al.*, 2008).

Comparações entre as seqüências obtidas revelam que 61% dos genes, 2052, estão presentes em todos os genomas seqüenciados, distribuídos nos dois cromossomos, indicando que possa representar o conjunto gênico do progenitor ancestral que existiu antes da divergência entre espécies patogênicas e saprofíticas. Ainda, como os mecanismos moleculares da patogênese das leptospiiras permanece não-elucidado, o conjunto de genes exclusivos das espécies patogênicas, sem ortólogos em *L. biflexa*, pode representar os genes com papel na patogênese. Significativamente, 893 dos 1431 genes que entram nessa classificação não têm função definida (PICARDEAU *et al.*, 2008).

Outro dado extraído desses estudos é a ocorrência de grande número de elementos genéticos móveis (IS – *insertion sequences*) identificados. Há mais de 120 IS no genoma de *L. borgpetersenii*, 26 em *L. interrogans* sorovar Copenhageni, 57 no sorovar Lai e 9 em *L. biflexa*. Isso é um indicador da plasticidade genômica em *Leptospira* spp., e sugere participação dos IS no processo de diferenciação das espécies do gênero (PICARDEAU *et al.*, 2008). A exemplo, acredita-se que os IS tenham papel central na redução genômica em *L. borgpetersenii*, que é 16% menor que da espécie patogênica *L. interrogans* (BULACH *et al.*, 2006).

Tabela 1. Comparação dos dados genômicos de *Leptospira* spp. seqüenciados. Os dados foram compilados de Ren *et al.* (2003), Nascimento *et al.* (2004a, b), Bulach *et al.* (2006) e Picardeau *et al.* (2008).

	<i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni		<i>L. interrogans</i> sorovar Lai		<i>L. borgpetersenii</i> sorovar Hardjo		<i>L. biflexa</i> sorovar Patoc		
Cromossomo	CI	CII	CI	CII	CI	CII	CI	CII	P74
Tamanho (pb)	4.277.185	350.181	4.332.241	358.943	3.576.473	299.762	3.314.446	317.336	74.116
Frequência de bases C + G (%)	35,1	35	36	36,1	40,23	40,43	40,23	40,16	37,5
Elementos genéticos móveis (IS)	26	0	48	9	121	5	8	1	1
ORFs com função definida	1.811	161	1.901	159	1.594	131	1.647	134	31
ORFs hipotéticas	1.643	113	2.459	208	946	99	960	101	25

1.10 Patogenicidade de *Leptospira* spp.

Até hoje, muito pouco é sabido a respeito dos mecanismos moleculares de patogenicidade e virulência das leptospiros. Entretanto, a conclusão dos seqüenciamentos genômicos de cinco cepas diferentes de *Leptospira* spp. abriram um novo campo a ser explorado objetivando a compreensão dos processos infecciosos, e elaboração de métodos profiláticos ou de diagnóstico da doença.

A “vacinologia reversa”, estratégia utilizada para identificar candidatos vacinais a partir de dados obtidos com o seqüenciamento de genomas (RAPPUOLI, 2001), foi empregada em bactérias como *Neisseria meningitidis* sorogrupo B (PIZZA *et al.*, 2003) e *Streptococcus pneumoniae* (WIZEMANN *et al.*, 2001), sendo muito bem sucedida. A partir da seqüência genômica, são utilizadas ferramentas de bioinformática para a identificação de antígenos protéicos candidatos na formulação de vacinas. Nesses moldes, os projetos de seqüenciamentos genômicos de *Leptospira* spp. (REN *et al.*, 2003; NASCIMENTO *et al.*, 2004a, b; BULACH *et al.*, 2006; PICARDEAU *et al.*, 2008) revelaram um grande número de novas proteínas que podem estar envolvidas na patogenicidade. Desde então, a busca de proteínas relacionadas à patogenicidade ou virulência vem sendo perseguida por vários grupos de pesquisa no mundo, sendo que o foco está nas proteínas de membrana e lipoproteínas (HAAKE *et al.*, 1999; MERIEN *et al.*, 2000; PALANIAPPAN *et al.*, 2002; CULLEN *et al.*, 2003; GAMBERINI *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2006; BARBOSA *et al.*, 2006; VIEIRA *et al.*, 2007; RISTOW *et al.*, 2007; FAISAL *et al.*, 2008; ATZINGEN *et al.*, 2008).

Como a superfície bacteriana é a interface entre o patógeno e o hospedeiro, diferenças nas proteínas de membrana externa podem refletir a variação de mecanismos de patogenicidade. Proteínas preditas lipoproteínas são abundantes tanto em *L. biflexa* (164 lipoproteínas preditas), quanto nas espécies patogênicas (184 e 130 em *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*, respectivamente). No entanto, mais de 90 lipoproteínas preditas nas espécies patogênicas não têm ortólogos no genoma da espécie saprofítica, incluindo a lipoproteína majoritária LipL32 (HAAKE *et al.*, 2000), e outras lipoproteínas caracterizadas, como LipL41, LipL36 e LipL45 (CULLEN *et al.*, 2004). Lipoproteínas relacionadas com a

virulência, como as proteínas Lig (papel na adesão aos tecidos do hospedeiro) (CHOY *et al.*, 2007), e LenA/LfhA/Lsa24 (ligação ao fator H e laminina da matriz extracelular) (VERMA *et al.*, 2006; BARBOSA *et al.*, 2006; STEVENSON *et al.*, 2008), também estão ausentes em *L. biflexa*. No entanto, a lipoproteína Loa22 (LIC10191), única até o momento identificada como essencial para a virulência, tem um homólogo gênico na espécie saprofítica, com 73% de similaridade (PICARDEAU *et al.*, 2008). Isso pode indicar que seu papel é relacionado com a sobrevivência, ao invés de ser um fator direto de virulência como proposto por Ristow e colaboradores (2007).

É conhecido que algumas bactérias patogênicas modulam seu perfil de expressão protéica de acordo com as condições ambientais a que estão submetidas (STOCK *et al.*, 1989). Ao longo do seu ciclo de transmissão, que compreende desde órgãos de animais selvagens ou humanos, até vida livre no solo ou na água, as leptospiros são sujeitas a condições ambientais amplamente distintas e variáveis (HAAKE, 2000). Para se adaptarem a condições nutricionais, sinalizadoras, quimiotáticas e de virulência tão divergentes, as leptospiros necessitam de uma regulação do conjunto de genes expressos em cada uma dessas condições. Embora se saiba que as leptospiros adaptam-se e sobrevivem em muitos ambientes diferentes, pouco é sabido a respeito da natureza molecular dessas adaptações.

Com o intuito de compreender a adaptação das leptospiros a condições diferentes, muitos estudos *in vitro* vêm sendo feitos. Trabalhos recentes demonstraram que uma mudança na temperatura da cultura de leptospiros *in vitro* de 30°C para 37°C, mimetizando o que ocorre durante a infecção, está associada com a síntese diferencial de várias proteínas de membrana externa, periplasmáticas e citoplasmáticas (NALLY *et al.*, 2001). Foi demonstrado que várias dessas proteínas termoreguladas são imunogênicas, e reagem com soros de animais infectados convalescentes, provavelmente tendo um papel importante na interação patógeno-hospedeiro, sendo possíveis fatores de virulência e patogenicidade (NALLY *et al.*, 2001). Outros estudos de análise transcricional do genoma, por técnica de microarranjos (QIN *et al.*, 2006), demonstraram que *L. interrogans* tem

diversas classes funcionais de proteínas expressas diferencialmente durante a mudança de temperatura. No trabalho publicado por Lo e colaboradores (2006), também foi demonstrado, por experimentos de microarranjos, que há diferença transcricional de genes de mobilidade e quimiotaxia, sistemas transdutores de sinais e proteínas alteradoras da membrana quando ocorre mudança de temperatura. Portanto, a temperatura deve ser um fator importante regulando a expressão de proteínas que facilitam a invasão e estabelecimento da doença.

Aliados a isso, a literatura relata já há algum tempo que as leptospiros perdem a sua virulência após algumas passagens em cultura (FAINE, 1994; FAINE *et al.*, 1999). Mais recentemente, esses dados foram ampliados com diversos estudos que reportam proteínas com expressão diferencial durante os processos infecciosos. Palaniappan e colaboradores (2002) identificaram, a partir de um *screening* da biblioteca genômica de *L. interrogans* sorovar Pomona com soro obtido de éguas infectadas com leptospirose, uma nova proteína altamente imunogênica, LigA, expressa apenas durante a infecção.

Matsunaga e colaboradores (2003) mostraram resultados compatíveis com as hipóteses de que as proteínas LigA e LigB são expressas apenas no hospedeiro infectado, e que os genes da família *lig* são restritos a espécies patogênicas de *Leptospira*, não sendo detectados em espécies saprofíticas não-patogênicas analisadas. Os autores demonstraram que as proteínas LigA e LigB têm a sua expressão correlacionada com a virulência, já que a atenuação da virulência de leptospiros em cultura acarretou a perda da capacidade de infecção, associada à supressão da expressão dessas proteínas. Posteriormente, Silva e colaboradores (2007) demonstraram que a porção carboxi-terminal da LigA confere imunoproteção parcial em hamsters inoculados com leptospiros, sugerindo o seu potencial vacinal.

No grupo de pesquisa deste trabalho, foi caracterizada a proteína Lsa21, que tem propriedades de adesão a componentes de matriz extracelular, é termoregulada em temperatura fisiológica e expressa principalmente em condições de virulência (ATZINGEN *et al.*, 2008).

Outro exemplo de expressão diferencial é o da proteína que se liga à fibronectina (*fibronectin-binding*) descrita por Mérien e colaboradores (2000),

expressa na membrana de *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae virulenta, porém, ausente em bactérias não-virulentas ou saprofíticas. Mérien e colaboradores já haviam demonstrado em trabalho anterior (1997) que a invasão de células Vero por leptospiros era relacionada com a virulência, já que bactérias saprofíticas ou que tiveram sua virulência atenuada em cultura mostraram-se incapazes de realizar a invasão. Esses dados sugerem a participação dessa proteína no processo inicial de adesão e invasão das leptospiros.

Os trabalhos acima citados apontam para algumas das mudanças na transcrição e expressão protéicas em condições de aumento de temperatura e de infecção, o que abre as portas para investigações mais minuciosas a respeito da patogênese das leptospiros, bem como para buscas de fatores de virulência e candidatos vacinais.

1.11 Proteômica

Apesar de completado o seqüenciamento, a elucidação da seqüência genômica de um organismo é apenas o primeiro passo para entender a sua biologia. A genômica apenas prediz os quadros de leitura (*Open Reading Frames* - ORFs) ou proteínas codificadas pelas seqüências gênicas, denotando o estado estático de informações herdadas. Dessa maneira, os dados genômicos não são suficientes para se saber quais proteínas estão sendo realmente expressas na célula em dado momento e condição.

Para compreender os processos dinâmicos que ocorrem dentro das células, o estudo das proteínas envolvidas é muito importante. Isso implica no estudo de extratos protéicos totais de células, tecidos e organelas, ou frações dos mesmos, de maneira a elucidar aspectos qualitativos e quantitativos da expressão de proteínas em cada situação. A proteômica é uma nova tecnologia e campo de estudo pós-genômico, que se propõe a analisar de forma global o conjunto de proteínas expressas numa célula ou tecido, isto é, o proteoma.

O termo “proteoma” foi primeiramente cunhado por Wilkins (1996) para descrever “todas as proteínas expressas por um genoma, célula ou tecido”. Porém, esse objetivo provavelmente nunca será alcançado por nenhum proteoma, pois o conjunto de proteínas expressas por um organismo, célula ou tecido abriga alta

complexidade conferida por modificações co e pós-traducionais e *splicing* gênico (em eucariotos), além de ser extremamente dinâmico – afetado por condições ambientais, temporais, nutricionais, entre outras (BRADSHAW e BURLINGAME, 2005).

A necessidade de migrar de métodos de estudo de proteínas isoladas para o estudo de proteínas como um grande grupo foi inerente aos trabalhos pioneiros de O'Farrell (1975) e Klose (1975), que introduziram a técnica de eletroforese bidimensional (2DE). Na 2DE, as proteínas são submetidas a duas etapas de separação consecutivas baseadas em diferentes propriedades das proteínas. A primeira etapa de separação, a primeira dimensão, consiste em uma focalização isoeletrica na qual as proteínas são separadas pela sua carga elétrica em uma fita de gel de poliacrilamida em gradiente de pH. As proteínas migram até atingirem o pH em que possuam carga líquida igual à zero – o seu ponto isoeletrico (pI). Posteriormente, na segunda dimensão, as proteínas são separadas de acordo com seus tamanhos moleculares em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A separação 2D atinge alto nível de resolução e permite a análise e visualização concomitante de centenas ou milhares de proteínas. Sob a premissa básica da proteômica, a 2DE tornou-se uma ferramenta poderosa no desenvolvimento desse campo de pesquisa, e ainda é a técnica mais difundida e utilizada.

Com a separação de amostras proteicas complexas, o desafio seguinte da proteômica consistia em identificar de forma rápida, eficiente e de baixo custo o grande número de proteínas isoladas. Assim, concomitante ao desenvolvimento da técnica eletroforética 2D, várias aplicações da espectrometria de massas (MS) desenvolveram-se extensivamente e emergiram como técnicas analíticas suficientemente sensíveis e compatíveis com as exigências da análise proteica em larga escala, sendo agora metodologias corriqueiras na proteômica. Pode-se dizer que foi a disponibilidade de técnicas acessíveis de MS que permitiu, de fato, a transição da química tradicional de proteínas, com ênfase em proteínas individuais, para a proteômica.

Existem diversos tipos de espectrômetros de massas, mas, por definição, um espectrômetro de massas consiste, basicamente, em uma fonte iônica, um

analisador que mede a relação massa/carga (m/z) dos analitos ionizados, e um detector que registra o número de íons que apresenta cada valor m/z (AEBERSOLD e MANN, 2003). A técnica MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time-of-flight*), especificamente, é um método que utiliza um laser como fonte de ionização. As amostras são co-cristalizadas com uma matriz de características ácida, baixo peso molecular e capacidade de absorção da luz ultravioleta do laser. À incidência do laser, a matriz absorve a energia e rapidamente sublima-se e ioniza-se. Ao se vaporizar, a matriz carrega moléculas intactas do analito para o estado gasoso. Durante a expansão do material vaporizado, prótons são transferidos da matriz ionizada para os analitos, resultando em moléculas carregadas. Os peptídeos ionizados são então acelerados sob campo elétrico e entram em voo em um tubo a vácuo, até atingirem o detector. Os íons menores atingem o detector antes dos maiores, possibilitando a determinação da sua relação m/z (WITTMANN-LIEBOLD *et al.*, 2006; CAÑAS *et al.*, 2006). O método MALDI-TOF é utilizado para detecção e caracterização de biomoléculas como proteínas, peptídeos, oligossacarídeos e oligonucleotídeos, com massa molecular entre 400 e 350.000 Da. É uma técnica bastante sensível, que permite a detecção de analitos na faixa de fentomoles.

Fechando o ciclo metodológico necessário para a análise proteômica, nos últimos anos a bioinformática vem se desenvolvendo amplamente para suprir as necessidades de identificação e processamento dos dados gerados por MS. Cada vez mais estão disponíveis ferramentas progressivamente mais eficientes, rápidas e confiáveis para a análise e manipulação de informações inter-relacionadas, como dados gênicos e os gerados por MS.

Durante a última década, a proteômica foi extensivamente aplicada à área da microbiologia. O rápido progresso nesse campo se deu primariamente pela disponibilidade de seqüências genômicas de diversos microorganismos, e pelos avanços nas ciências de separação de proteínas e MS. A proteômica aplicada à microbiologia médica propiciou a caracterização de proteomas microbianos, estudo de mecanismos patogênicos de doenças infecciosas, identificação de novos alvos terapêuticos, análises de resistência à drogas, busca de novos marcadores moleculares e desenvolvimento vacinal.

1.12 Estado da arte: Proteoma de *Leptospira* spp.

Embora já se tenha alguns trabalhos de caracterização da expressão diferencial de leptospiros *in vitro* por mudança de temperatura, pouco se sabe sobre o proteoma expresso *in vivo* ou durante as condições reais da infecção. Apenas em trabalhos mais recentes, durante os últimos cinco ou seis anos, essa abordagem vem sendo feita por meio de técnicas proteômicas.

Em 2005, o grupo de Cullen e colaboradores realizou estudos de identificação de proteínas de membrana expostas na superfície celular de *Leptospira* spp. (*Surfaceome*) utilizando técnicas de biotinilação seguida por eletroforese bidimensional e identificação através de MS. Abordaram principalmente a proteômica diferencial, para comparar os perfis de proteínas de membrana externa de *L. interrogans* sorovar Lai cultivadas em diferentes condições, incluindo bactérias crescidas a 20, 30 e 37°C, com ou sem adição de soro no meio de cultura ou depleção de ferro. Identificaram nos géis as proteínas LipL32, LipL36, LipL41 e LipL48. Ainda, isolaram 8 novas proteínas designadas pL18, pL21, pL22, pL24, pL45, pL47/49, pL50 e pL55, que não puderam ser identificadas por MS. Entre as proteínas identificadas, encontraram algumas com expressão diferencial em certas condições: LipL36 e pL50 estavam ausentes em temperaturas acima de 30°C ou em depleção de ferro. Ainda, LipL32 foi identificada em múltiplos spots ao longo dos géis em todas as condições analisadas, exceto em depleção de ferro, indicando que sofre clivagens por proteases ferro-dependentes durante o seu processamento.

Nally e colaboradores (2005) isolaram vesículas de membrana externa de um isolado clínico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Conseguiram identificar 33 proteínas diferentes, incluindo 15 proteínas desconhecidas ou anotadas como hipotéticas, e algumas proteínas já caracterizadas, como OmpL1, Qlp42, LipL32, LipL41, LipL36 e Loa22. Em trabalho subsequente, Nally e colaboradores (2007), visaram à caracterização do proteoma subcelular do compartimento da membrana externa de *L. interrogans* expresso durante a infecção aguda letal, em comparação com leptospiros em cultura. O grupo identificou 21 proteínas de membrana externa de leptospiros cultivadas *in vitro*, e 4 delas estavam ausentes nas leptospiros retiradas de fígado de animais infectados: OmpL1, LipL21, LipL32 e LipL41. Ao

mesmo tempo, observaram a superexpressão da proteína Loa22 em leptospiplas provenientes dos animais.

Além desses, foram realizados alguns ensaios de imunoproteômica objetivando identificar nos extratos de leptospira fracionados por 2DE, proteínas que reagissem com soro de pacientes infectados com leptospirose. Guerriero e colaboradores (2001), utilizaram técnica de *Western Blotting* para identificar proteínas de leptospira que reagissem com um pool de soro de pacientes convalescentes diagnosticados com leptospirose. Observaram 8 *spots* reativos, e identificaram 5 desses como sendo das proteínas DnaK, GroEL, OmpL1 e LipL32, baseando-se na localização (pI e tamanho molecular). Mais recentemente, Kositanont e colaboradores (2007) utilizaram a imunoproteômica para realizar um *screening* de imunógenos potenciais na leptospirose, objetivando principalmente um método diagnóstico mais eficiente para a doença. Provaram extratos totais de leptospira separados por 2DE contra soros individuais de 4 pacientes MAT positivos, e conseguiram identificar 24 *spots* de proteínas reativos. A partir de MS, identificaram essas proteínas, que foram classificadas em 5 grupos: (a) proteínas flagelares, (b) chaperonas e/ou *heat-shock proteins* (DnaK e GroEL), (c) proteínas de transporte, (d) enzimas metabólicas e (e) 2 proteínas hipotéticas. Esses dados indicaram que não somente as proteínas caracteristicamente localizadas na superfície celular podem conferir antigenicidade, como também as proteínas citoplasmáticas. Ainda, Sakolvaree e colaboradores (2007) realizaram o estudo imunoproteômico de duas cepas de leptospira, *L. interrogans* sorovar Copenhageni e *L. borgpetersenii* sorovar Tarassovi, ao testar os extratos protéicos totais contra soros imunes de camundongos imunizados com homogenatos de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Identificaram 38 proteínas reativas, sendo que algumas são comuns aos dois sorovares analisados. Concordando com os dados de Kositanont e colaboradores (2007), os resultados de Sakolvaree e colaboradores (2007) mostram que não somente proteínas de membrana são capazes de estimular a produção de anticorpos pelo hospedeiro.

Em resumo, comparado com outros campos, o volume de informações proteômicas recentes aplicadas ao estudo de leptospiplas e leptospirose ainda são consideravelmente escassas. Os mecanismos moleculares subjacentes à patogênese

da leptospirose permanecem pouco compreendidos, e fatores de virulência continuam desconhecidos (THONGBOONKERD, 2008).

Tendo em vista o panorama acima delineado, o presente trabalho visou identificar, através de um *screening* por técnicas proteômicas, proteínas expressas em bactérias virulentas e não-virulentas atenuadas em cultura. A identificação de proteínas expressas durante o processo infeccioso poderá ajudar no esclarecimento de aspectos da patogênese e virulência das leptospirosas, canalizando os esforços para um número menor de proteínas a serem estudadas na busca de candidatos vacinais contra a leptospirose, ou na composição de um método diagnóstico mais eficiente.

2 OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi a análise de expressão de extratos protéicos totais de *L. interrogans* sorovar Pomona cepa LPF virulentas retiradas de órgãos de animais infectados e de bactérias não-virulentas atenuadas em cultura.

2.1 Objetivos Específicos

2.1.1 Proteômica

- Infecção de hamsters com leptospiros virulentas do sorovar Pomona cepa LPF;
- Retirada do fígado e rins dos animais infectados;
- Preparo dos órgãos para o cultivo das leptospiros virulentas neles presentes;
- Cultivo de leptospiros não-virulentas por atenuação da cepa virulenta em cultura;
- Obtenção e lise de extratos protéicos totais de *L. interrogans* sorovar Pomona virulentas e não-virulentas;
- Focalização isoeletrica dos extratos protéicos totais (primeira dimensão);
- Separação por tamanho molecular (segunda dimensão) através de gel de SDS-PAGE das proteínas focalizadas isoeletricamente;
- Análise e comparação dos géis bidimensionais;
- Excisão dos *spots* de proteínas do gel;
- Proteólise dos *spots* de proteínas;
- Extração dos peptídeos tripsínicos e purificação para aplicação em espectrometria de massas;
- Determinação dos espectros de massa dos peptídeos tripsínicos por espectrometria de massas MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Ionization – Time-of-flight*);

- Identificação das proteínas em bancos de dados a partir do mapa de massas de peptídeos (*peptide mass fingerprint* –PMF);
- Análise bioinformática complementar das proteínas identificadas;
- Análise comparativa das proteínas identificadas nas duas condições analisadas.

2.1.2 Clonagem, expressão, purificação e ensaios de proteínas identificadas

- Seleção de proteínas identificadas;
- Amplificação por PCR a partir do DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni;
- Clonagens em vetores de amplificação e expressão;
- Expressão das proteínas recombinantes em *E. coli*;
- Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade a metal;
- Análise da reatividade das proteínas purificadas com soros de pacientes diagnosticados com leptospirose;
- Avaliação de propriedades de adesão das proteínas recombinantes à componentes de matriz extracelular imobilizados.

3 MATERIAIS E METODOLOGIA

3.1 Bactérias e vetores

3.1.1 Leptospiras

As leptospiras utilizadas foram cedidas pelo laboratório do Dr. Sílvio de Arruda Vasconcellos, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (FMV-USP), onde são mantidas através de cultivo de rotina bem estabelecido.

Para os experimentos de gel 2D e de extração de RNA, foram utilizadas bactérias *L. interrogans* sorovar Pomona cepa LPF, que são mantidas virulentas por inoculações periódicas em animais. Para extração de DNA, utilizou-se *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M-20 não-virulenta atenuada em cultura. As bactérias foram cultivadas em meio EMJH modificado (ALVES, 1995) enriquecido com 10% de soro de coelho, a temperatura de 28°C e sem agitação.

3.1.2 Vetor de clonagem

O vetor pGEM-T-Easy (Promega) (Figura 1) foi utilizado para a clonagem os produtos de PCR. É fornecido pelo fabricante na forma linear, preparado a partir da digestão do plasmídeo pGEM-5Zf(+) com a enzima de restrição *EcoRV*, e posterior adição de timinas nas extremidades 3'. As timinas livres possibilitam a ligação de produtos de PCR, já que esses possuem adenosinas livres nas extremidades 3', adicionadas pela atividade transferase da enzima *Taq* polimerase utilizada na reação.

Figura 1. Mapa do vetor pGEM-T-Easy (Promega) de clonagem. f1ori: origem; lacZ: gene para metabolismo de lactose (β -Galactosidase); AmpR: gene de resistência à ampicilina.

3.1.3 Vetor de expressão

O vetor de expressão em modelo procarioto empregado nas clonagens foi o pAE (RAMOS *et al.*, 2000), construído a partir dos plasmídeos pRSET-A (Invitrogen) e pET3-His. O vetor pAE (Figura 2) é constituído pelo promotor do fago T7 (*pT7*), sítio de ligação ao ribossomo (RBS), sítios de múltiplas clonagens (MCS), terminador de transcrição (T7 term.), e sequência codificadora para β -lactamase, conferindo resistência ao antimicrobiano ampicilina (Amp^r). Ainda, na extremidade amino-terminal do inserto a ser clonado, há uma região codificadora para sequência de 6 resíduos de histidina na proteína heteróloga, o que permite a purificação da mesma por cromatografia de afinidade a níquel (RAMOS *et al.*, 2004). A origem de replicação, pRSETA, é de alta cópia.

3.1.4 Bactérias de expressão

Para a expressão das proteínas recombinantes, foi utilizada a linhagem de *E. coli* BL21-SI (Life technologies), genótipo [*F⁺ ompT hsdSB (r_Bm_B) gal dcm endA1 proUp::T7RNAP::malQ-LacZ, tet^r*], que possui gene da T7 RNA polimerase integrado ao genoma sob o controle do promotor *proU*, induzível por NaCl (BHANDARI *et al.*, 1997).

Figura 2. Mapa do vetor de expressão pAE. P_{T7}: promotor; RBS: sítio de ligação ao ribossomo; ATG: código de início da transcrição; 6xHis: cauda de seis resíduos de histidina; T7term: região de terminação de transcrição; F1ori: origem; Amp^R: gene de resistência à ampicilina.

3.1.5 Bactérias de clonagem

A linhagem *E. coli* DH5 α (Life Technologies), genótipo [*F*⁺ Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* λ] foi utilizada para a seleção de clones positivos provenientes de clonagens de produtos de PCR no vetor pGEM-T-Easy e clonagens dos genes de interesse no vetor de expressão pAE.

3.1.6 Bactérias competentes

Para preparação de bactérias competentes, bactérias *E. coli* DH5 α e BL21-SI foram estriadas em placas de meio sólido 2YT (1,6% bacto-triptona, 0,5% NaCl, 1% extrato de levedo e 2% ágar, em água deionizada) e incubadas a 37°C por 16h. Uma colônia isolada de cada cepa foi cultivada em 100 mL de meio SOB (2% Bacto peptona, 2,5 mM KCl, 0,05% NaCl e 0,5% extrato de levedo, em água deionizada) e, ao atingirem a fase exponencial do crescimento (densidade ótica de aproximadamente 0,6 no comprimento de onda [λ] de 600 nm), foram submetidas a um tratamento em meio hipotônico contendo 2 soluções: RF I (30 mM acetato

de potássio, 10 mM CaCl₂, 50 mM MgCl₂, 100 mM KCl e 15% glicerol, em água deionizada) e RF II (75 mM CaCl₂, 20 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 15% glicerol e 10 mM MOPS, em água deionizada), ambos pH 5,8 e filtrados em membrana de 0,22 µm para esterilização. Esse tratamento torna as bactérias competentes por fragilização das paredes, facilitando a transformação com DNA plasmidial pelo método de choque térmico. A suspensão bacteriana foi dividida em pequenas alíquotas (50 µl) e estocada à -80°C.

3.1.7 Transformação de bactérias competentes

O DNA a ser transformado em bactérias competentes *E. coli* DH5α ou BL21-SI foi adicionado às bactérias previamente descongeladas por 10min em gelo, seguindo-se incubação por 30min, também em gelo. Após, foi realizado o choque térmico por 90s em banho seco a 42°C e, imediatamente após, incubação em gelo por 5min. Foram adicionados 300 µL de meio de cultura líquido LB (DH5α) ou 2YT-ON (BL21-SI) seguido de crescimento a 30°C (DH5α) ou 37°C (BL21-SI), por 1h. Os volumes totais das transformações foram plaqueados nos meios sólidos correspondentes com o antibiótico apropriado, quando necessário, e as placas foram incubadas em estufa por cerca de 16h.

3.2 Cultura de leptospiros virulentos e não-virulentos

Segundo o protocolo utilizado por Nally e colaboradores (2004), hamsters recém desmamados foram injetados via intraperitonal com 500 µL de cultura de *L. interrogans* sorovar Pomona cepa LPF virulentos na diluição de 10⁸ células/mL. Esses animais foram acompanhados diariamente até o aparecimento dos sintomas da doença, como perda de peso e mobilidade, que ocorrem em aproximadamente 5 dias após a infecção, e foram posteriormente sacrificados em câmara de CO₂. Os rins e fígados desses animais foram retirados, macerados e cultivados em meio EMJH modificado semi-sólido, enriquecido com 10% de soro de coelho, a uma temperatura de 28°C, e sub-cultivados em meio EMJH modificado líquido, enriquecido com 10% de soro de coelho, por no máximo duas passagens para a manutenção da virulência das leptospiros (10 a 15 dias).

As culturas de bactérias não-virulentas foram obtidas a partir da mesma cepa original LPF virulenta, através da atenuação da virulência por sucessivas passagens em meio de cultura, nas mesmas condições de cultivo acima descritas. Após inoculação em hamsters, foi possível verificar a falta de capacidade de infecção dessas bactérias.

Os procedimentos de infecção dos hamsters até a retirada dos órgãos contendo as leptospiros foram realizados no laboratório do Dr. Sílvio de Arruda Vasconcellos, na FMV-USP.

3.3 Obtenção dos extratos protéicos totais

Ao atingirem uma concentração celular de aproximadamente 10^8 células/mL contadas em câmara de Petroff-Hausser em microscópio de campo escuro, as culturas foram centrifugadas ($12800 \times g$, 4°C , 10min), e os sedimentos bacterianos lavados cinco vezes com solução PBS + 5 mM MgCl_2 . Posteriormente, cada sedimento bacteriano foi ressuscitado em tampão comercial *DeStreak Rehydration Solution* (GE Healthcare) ou solução de lise (7 M uréia, 2 M tiouréia, 0,5% ASB-14, 1% DTT, 4% CHAPS e traços de azul de bromofenol), na proporção de 5 μL por miligrama de bactérias. A lise celular foi feita por agitação vigorosa em vortex, seguido por sucessivas passagens em seringa de 1 mL. Em seguida, fez-se uma centrifugação a $20800 \times g$ por 10min para a retirada do sedimento celular, e o sobrenadante foi coletado.

3.4 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas dos extratos protéicos totais foi feita pelo método colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976; COMPTON, 1985). O reagente de Bradford foi adquirido da *Pierce Biotechnology*, e utilizado segundo as recomendações do fabricante. A calibração para a dosagem foi feita através de curvas de BSA (0 a 10 μg). A leitura da absorção foi feita em espectrofotômetro à $\lambda=595 \text{ nm}$, em cubetas de plástico de volume de 1 mL.

3.5 Eletroforese em gel Bidimensional

3.5.1 Primeira dimensão

A focalização isoeétrica consiste na separação das proteínas de acordo com o seu pI, quando a carga líquida total é igual a zero. O procedimento foi feito como descrito por Nouwens e colaboradores (2000), utilizando-se o sistema IPG (*Immobilized pH gradient gel strips* – GE Healthcare). Foram utilizadas fitas de 18 ou 24 cm de comprimento, de pH em gradiente linear imobilizado de 3 a 10. A reidratação das fitas foi feita por no mínimo 16h com as próprias amostras ressuspendidas e lisadas em volume total ajustado para 340 μ L (18 cm) ou 450 μ L (24 cm) de tampão *DeStreak Rehydration Solution*, adicionados de 0,8% da mistura de anfólitos carreadores *IPG Buffer* (GE Healthcare) específicos para o pH utilizado. As fitas reidratadas foram acomodadas no focalizador *Ettan IPGphor II* (GE Healthcare), e cobertas com óleo *DryStrip Cover Fluid* (GE Healthcare) para evitar evaporação e precipitação de uréia. A programação utilizada para a eletrofocalização foi a representada na Tabela 2.

Tabela 2. Protocolo de isoeletrofocalização utilizado. Fitas de pH em gradiente linear de 3 a 10, de 18 ou 24 cm.

Etapa	Voltagem	Volts/h	Ao final da focalização:	
S1 step	30	180	V/hrs	~ 70.330
S2 step	150	300	Duração	~ 25h
S3 step	350	350		
S4 step	500	500		
S5 step	1.000	1.000		
S6 step	3.000	3.000		
S7 step	5.000	65.000		
50 μA/fita				

3.5.2 Equilíbrio das fitas

O equilíbrio das fitas é a etapa que permite a transição das amostras da primeira para a segunda dimensão, pois confere às proteínas uma carga total negativa e mantém as pontes dissulfeto reduzidas, possibilitando a corrida de SDS-PAGE.

Após a focalização isoeletrica, cada fita foi reduzida, sendo incubada por 15min sob leve agitação em 10 mL de solução de equilíbrio contendo 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M uréia, 30% glicerol, 2% SDS e traços de azul de bromofenol, adicionada de 1% DTT (GE Healthcare). Posteriormente, seguiu-se a etapa de alquilação, com incubação por iguais 15min em mesma solução de equilíbrio adicionada de 2,5% iodoacetamida (GE Healthcare). O DTT produz a redução das pontes dissulfeto, dissociando-as; a iodoacetamida promove a carbamidometilação das cisteínas livres por ligação covalente (formando S-carboximetil cisteína), prevenindo que as pontes dissulfeto formem-se novamente.

3.5.3 Segunda dimensão

Com as fitas focalizadas, reduzidas e alquiladas, seguiu-se a separação por massa molecular, que foi feita em gel de SDS-PAGE 12% (NOWENS *et al.*, 2000), utilizando-se o sistema vertical de eletroforese *Ettan DALTsix* (GE Healthcare). A cuba de eletroforese foi acoplada ao banho circulante MultiTemp III (GE Healthcare), mantendo a temperatura do tampão de corrida durante a eletroforese a 10°C.

As fitas foram colocadas na parte superior dos géis de poliacrilamida e, ao lado, foram aplicados padrões de massa molecular. A corrida foi realizada em tampão 25 mM Tris-base, 192 mM glicina e 0,1% (w/v) SDS, inicialmente a 2 W/gel por 30min, e depois a 60 V/gel até o final do processo.

3.6 Coloração dos géis

3.6.1 Coloração por Coomassie Blue

Os géis foram corados utilizando-se o corante Coomassie Blue R350 - *PhastGel Blue R* (GE Healthcare) - segundo as recomendações de preparo do fabricante, por cerca de 16h, sob leve agitação. A descoloração das regiões inespecíficas dos géis foi feita com solução 40% etanol e 10% ácido acético, sob agitação suave durante o tempo adequado para a visualização dos *spots* de proteínas.

3.6.2 Coloração por prata

Para coloração por impregnação de prata, os géis foram previamente fixados em solução 50% metanol, 12% ácido acético e 0,05% formaldeído por 5min, e, posteriormente, lavados em 30% etanol por 5min. Após, foram incubados por 2min em solução 0,02% tiossulfato de sódio, seguido de 2 lavagens de 2min cada com água ultra-pura. Em seguida, foi feita incubação por 5min em solução 0,2% nitrato de prata, adicionada de 0,075% formaldeído. Todas as etapas contaram com aquecimento por 1min em potência máxima em forno de microondas previamente às incubações.

A revelação foi feita com solução contendo 6% carbonato de cálcio, 0,05% formaldeído, e 0,02% da solução de 0,02% tiossulfato de sódio, pelo tempo necessário para o aparecimento dos spots. A reação foi bloqueada com solução 50% metanol e 12% ácido acético.

3.7 Visualização e análise dos géis

Os géis foram digitalizados em modo de transparência (*ImageScanner* – GE Healthcare). Para a visualização dos géis, foi utilizado o programa *Image Master-2D Platinum* versão 6.0 (GE Healthcare). Este programa foi também utilizado para detecção, análise e tratamento de dados dos *spots* de proteínas, bem como para comparação entre os diferentes géis e anotação das proteínas posteriormente identificadas por espectrometria de massas.

3.8 Preparação das amostras para Espectrometria de Massas

3.8.1 Excisão dos *spots* e descoramento

Os *spots* identificados foram excisados do gel com auxílio de pinças e bisturis, e colocados separadamente em microtubos previamente lavados com metanol. Os *spots* maiores foram partidos em frações menores com o auxílio de ponteiros para facilitar o descoramento e posterior extração dos peptídeos.

O descoramento dos *spots* corados com Coomassie Blue foi feita por lavagens com 400 μ L de solução 25 mM bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) e

50% acetonitrila (ACN) (Sigma) sob agitação em temperatura ambiente, até total extração do corante.

Para *spots* corados com prata, o descoramento foi realizado em 200 µL de solução 1:1 de 30 mM ferricianato de potássio e 100 mM tiossulfato de sódio. Após, os *spots* foram lavados em 200 µL de água e, posteriormente, equilibrados por 2 vezes em 200 µL de solução 25 mM bicarbonato de amônio por 15min.

Os *spots* descorados foram desidratados em 200 µL de ACN 100% por cerca de 10min, até ficarem opacos. A ACN foi desprezada, e os *spots* submetidos à secagem em aparelho de secagem a vácuo por aproximadamente 15min. Os *spots* desidratados foram mantidos em freezer a -20°C até a etapa de digestão.

3.8.2 Hidrólise tripsínica das proteínas *in gel* e extração dos peptídeos

Para a digestão proteolítica *in gel* das proteínas em peptídeos, cada *spot* foi descongelado e reidratado em 10 µL de solução 50 mM NH_4HCO_3 contendo 20 ng/µL da enzima Tripsina modificada (Promega), por 10min em banho de gelo. Após esse período, foram adicionados 20 µL de 50 mM NH_4HCO_3 , e os *spots* foram incubados a 37°C por 16 a 24h. Posteriormente, essa solução foi removida para microtubos limpos devidamente identificados, e foram adicionados 30 µL de solução de extração contendo 50% ACN + 5% ácido trifluoroacético (TFA) (Sigma) aos pedaços de gel que foram mantidos nos tubos anteriores, sendo incubados por 30 a 60min sob agitação à temperatura ambiente. Em seguida, a solução de extração de cada amostra foi retirada e adicionada à solução retirada anteriormente. Esse mesmo procedimento de extração foi repetido mais uma vez, e os pedaços de gel foram descartados. O volume resultante do processo de extração foi concentrado em aparelho de secagem a vácuo à temperatura de 30°C, até atingir um volume de aproximadamente 20 µL.

3.8.3 Concentração e dessalinização da solução contendo os peptídeos tripsínicos

Para a purificação e concentração das amostras de mistura dos peptídeos resultantes de cada digestão proteolítica, foram utilizadas micro-colunas de

ponteira de pipeta ZipTipC18 (Millipore). Cada ponteira foi lavada através de várias pipetagens com 100% ACN, seguido de equilíbrio com 60% ACN, e, posteriormente, com solução 0,1% TFA. Com a resina equilibrada, foi realizada a ligação da amostra à micro-coluna por pipetagens sucessivas. Após, a micro-coluna foi lavada com solução 0,1% TFA, e a amostra eluída em um microtubo limpo utilizando-se solução 60% ACN + 0,1% TFA. Cada micro-coluna foi reutilizada por mais 4 vezes, tomando-se o cuidado de lavar previamente cerca de 15 vezes com 100% ACN para que não ocorresse contaminação pelos peptídeos das amostras anteriores.

3.9 Determinação da massa dos peptídeos por MALDI-TOF

A espectrometria de massas das amostras foi realizada parte no Laboratório de Espectrometria de Massas do Centro de Toxinologia Aplicada (CAT/CEPID) do Instituto Butantan, e parte pela central analítica do Departamento de Bioquímica da Universidade de São Paulo (IQ-USP).

Para a determinação da massa dos peptídeos obtidos pela proteólise tripsínica dos *spots*, foi utilizado o espectrômetro de massa modelo Ettan MALDI-TOF Pro (GE Healthcare), que emprega a tecnologia MALDI-TOF. Foi utilizado o modo de operação reflectivo.

O volume de 1 µl de cada extrato concentrado e purificado de peptídeos proteolisados, presente em solução 0,1% TFA e 60% ACN, foi misturado com igual volume de 10 µg/ml matriz ácido α -ciano-4 hidroxicinâmico (Sigma) preparada em solução 0,1% TFA e 50% ACN. As amostras preparadas foram aplicadas em placa de amostragem para MALDI-TOF, secas ao ambiente e submetidas à análise para obtenção dos espectros de massas dos peptídeos (*peptide mass fingerprint*, PMF). Cada amostra foi aplicada em duplicata, e os PMF utilizados para a identificação foram resultantes da comparação e combinação dos dois dados obtidos.

Para a calibragem dos valores de relações massa/carga (m/z) obtidas na espectrometria, foram utilizados como calibrantes internos os picos de autólise da tripsina, quando presentes. Quando ausentes, utilizou-se calibrantes externos de

massas moleculares conhecidas, que foram aplicados em todas as primeiras posições de cada placa de amostragem para MALDI-TOF.

3.10 Identificação das proteínas em bancos de dados a partir da massa dos peptídeos identificados por MALDI-TOF

As listas contendo as relações m/z dos peptídeos frutos da digestão tripsínica das proteínas contidas nos diferentes *spots* dos géis foram submetidas à análise estatística pelo servidor MASCOT no modo de identificação de proteínas por PMF http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF0. Os parâmetros utilizados para a análise dos dados derivados do processamento de todos os *spots* foram: (a) banco de dados MSDB com as entradas de todos os organismos e/ou banco de genes de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, (b) tolerância de 1 sítio de clivagem perdido pela tripsina por peptídeo gerado, (c) modificação constante por carbamidometilação nas cisteínas, (d) modificação aleatória por oxidação nas metioninas, (e) valores de distribuição monoisotópica de m/z dos íons detectados, e (f) tolerância de erro de $\pm 0,5$ Da nos valores de m/z .

Foram consideradas identificadas significativamente as proteínas que obtiveram o algoritmo baseado em probabilidades “*MOUSE scoring*” (adotado pelo servidor MASCOT) superior ao nível de significância ($p < 0,05$), que têm valores absolutos de respectivamente 74 e 48 para as buscas em banco de dados MSDB geral contendo todas as entradas, e banco de dados gênicos de leptospira.

3.11 Análise bioinformática complementar das proteínas identificadas

3.11.1 Localização celular

Foi realizada a predição *in silico* da localização subcelular das proteínas identificadas a partir do servidor *P-Classifer* (<http://protein.bii.aster.edu.sg/localization/gram-negative/index.html>) (WANG *et al.*, 2005), que prediz a localização de proteínas de bactérias gram-negativas, classificando-as em

citoplasmáticas, extracelulares, de membrana interna, de membrana externa, ou periplasmáticas.

Para a predição da localização celular, foi utilizado adicionalmente o servidor LipoP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>) (JUNKER *et al.*; 2003), que prediz se a sequência corresponde a uma lipoproteína, e se apresenta peptídeo sinal de translocação à membrana, peptídeo sinal de lipidação e hélices transmembrana n-terminais. O programa é específico para bactérias gram-negativas, baseando-se na sequência consenso de lipobox.

3.11.2 Função

Para a análise da categoria funcional das proteínas, foi utilizado o banco de dados do genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni disponível no servidor público <http://cmr.tigr.org/tigrscripts/CMR/GenomePage.cgi?rg=ntli03>. O servidor *Entrez Gene* do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?b=gene>) foi utilizado para complementar a análise da função e/ou nome das proteínas codificadas pelos genes preditos.

3.11.3 Domínios conservados e busca de homólogos

O programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL *et al.*, 1997; SCHAEFFER *et al.*, 2001), disponível na página http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome, juntamente com o servidor CD (*Conserved Domains*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Cdd&cmd=search&term>), foram utilizados para a realização de alinhamentos e busca de domínios conservados nas proteínas identificadas, bem como para a busca de homólogos em outras cepas de leptospiros e outros organismos.

3.11.4 Vias metabólicas

Foi realizada, adicionalmente, a análise da presença de componentes de vias metabólicas dentre as proteínas identificadas através do programa *Pathway Analyst* (<http://path-a.cs.ualberta.ca/>) (PIREDDU *et al.*, 2005). O programa

Pathway Analyst prediz as vias metabólicas e catalisadores a partir de dados proteômicos baseado em buscas por BLAST, considerando 10 vias metabólicas diferentes – cinco de metabolismo de aminoácidos, e cinco de metabolismo de carboidratos.

3.11.5 Peptídeo sinal

A predição dos peptídeos sinais das proteínas selecionadas para clonagem foi realizada pelo programa *SignalP* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

3.12 Extração de RNA das cepas virulenta e não-virulenta

Para a extração de RNA, foram utilizados 20 mL de cultura das cepas de *L. interrogans* sorovar Pomona virulenta e não-virulenta, nas mesmas condições de cultivo previamente descritas. As culturas foram centrifugadas (4600 x g, 4°C, 30min), e o sobrenadante descartado. Os sedimentos bacterianos foram ressuspensos em 2 mL de Trizol (Invitrogen), e centrifugados a 15300 x g por 10min, a 4°C. Os sobrenadantes da centrifugação foram transferidos a novos tubos, com a adição de 400 µL de clorofórmio (200 µL por mililitro de Trizol utilizado). Os tubos foram agitados manualmente por cerca de 15s, e incubados a temperatura ambiente por 2 a 3min. Após, os tubos foram centrifugados a 15300 x g por 15min, a 4°C. A fase aquosa superior de cada amostra foi coletada e transferida para novos tubos; foi adicionado 1 mL de isopropanol seguido por leve agitação (6 vezes), e incubação por 10min a temperatura ambiente. Após centrifugação (15300 x g, 10min, 4°C) e descarte dos sobrenadantes, foi adicionado 1 mL de 75% etanol. Os tubos foram invertidos suavemente por 2 vezes, e submetidos a uma nova centrifugação (15300 x g, 5min, 4°C). Os sobrenadantes foram descartados, os sedimentos secos sob temperatura ambiente, e posteriormente ressuspensos em 40 µL de água livre de RNase.

Para verificar a integridade dos RNAs extraídos, as amostras finais foram analisadas em gel 1% agarose contendo brometo de etídeo, e visualizadas sob incidência de luz UV.

As concentrações de RNA foram calculadas a partir de dosagem em espectrofotômetro em $\lambda=260$ e 280 nm.

3.13 Tratamento dos RNAs extraídos com DNase I

A cada 2 μg de RNA extraído, foram adicionados 2 μL (2 U) de DNase I e 1X tampão de reação DNase I (Invitrogen) em um volume final de 20 μL . Após incubação por 15min a temperatura ambiente, foram adicionados 2,5 mM EDTA em concentração final. As amostras foram aquecidas a 65°C por 10min.

3.14 Transcrição Reversa

Para cada 10 μL de RNA tratado com DNase I, foram adicionados 25 ng de hexâmeros randômicos (Invitrogen) e 1 mM dNTP. As amostras foram incubadas a 65°C por 5min, seguido de pelo menos 1min de incubação em banho de gelo. Para a reação de transcrição reversa, foram adicionados 1X tampão RT, 5 mM MgCl_2 , 10 mM DTT, 40 U enzima RNaseOUT, 200 U SuperScript III RT (reagentes obtidos da Invitrogen) em um volume final de 20 μL , seguido de incubações de 10min a 25°C, 50min a 50°C, 5min a 85°C, e banho de gelo. As amostras foram tratadas com 1 U de RNase H a 37°C por 20min.

Para verificar a existência de contaminação de DNA durante a extração dos RNAs, como controle, todas as amostras foram submetidas ao protocolo de transcrição reversa acima descrito, com exceção da adição da enzima SuperScript II RT.

As condições da reação de PCR tendo o cDNA obtido por transcrição reversa como fita-molde foram: 0,005 μg de cDNA, 0,5 μM de cada oligonucleotídeo, 2,0 mM MgCl_2 , 0,4 mM de dNTP, e 2,5 U *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) em volume final de 50 μL . A amplificação foi realizada em termociclador (Perkin-Elmer) completando 35 ciclos, sendo: desnaturação a 94°C por 50s, anelamento a 51°C por 50s, e extensão a 72°C por 3min.

3.15 Extração de DNA de leptospiras

Para a extração de DNA de bactérias cultivadas nas mesmas condições já descritas, foram utilizados 20 mL de cultura das cepas de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. As culturas foram centrifugadas (4600 x g, 4°C, 30min), e o sobrenadante descartado. A extração do DNA foi realizada com o kit DNAzol (Invitrogen), seguindo-se as especificações do fabricante.

Para verificar a integridade do DNA extraído, as amostras finais foram aplicadas em gel 1% agarose contendo brometo de etídeo, e visualizadas sob incidência de luz UV. As concentrações de DNA foram calculadas a partir de dosagem em espectrofotômetro em $\lambda=260$ e 280 nm.

3.16 Amplificação dos genes de interesse por PCR

As seqüências correspondentes aos genes LIC10314, LIC10672, LIC11003 e LIC11228 foram amplificadas por PCR a partir do DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, utilizando-se os oligonucleotídeos sintéticos representados na Tabela 3. As condições da reação foram: 0,005 µg de DNA genômico, 0,5 µM de cada oligonucleotídeo, 2,0 mM MgCl₂, 0,4 mM de dNTP, e 2,5 U *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) em volume final de 50 µL. A amplificação foi realizada em termociclador (Perkin-Elmer) completando 35 ciclos, sendo, desnaturação a 94°C por 50s, anelamento a 51°C por 50s, e extensão a 72°C por 3min.

As amplificações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%, e os fragmentos do tamanho esperado foram excisados e purificados a partir do gel utilizando-se o kit *Concert* (Gibco).

Tabela 3. Oligonucleotídeos sintéticos desenhados para a amplificação dos genes LIC10314 (**A**), LIC10672 (**B**), LIC11003 (**C**) e LIC11228 (**D**) por PCR, a partir do DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Os sítios de restrição inseridos nas seqüências estão evidenciados.

(A) LIC10314	
F:	3' <u>GGATCCTT</u> ATTTTCTCAGG 5' (<i>Bam</i> HI)
R:	3' GGT <u>ACCCTA</u> AGGTTTAATT 5' (<i>Kpn</i> I)
(B) LIC10672	
F:	3' <u>CCGGATCC</u> CAGAATAAAG 5' (<i>Bam</i> HI)
R:	3' GGGG <u>TACCTC</u> AGATGTCG 5' (<i>Kpn</i> I)
(C) LIC11003	
F:	3' <u>GGATCCTT</u> TCCTGTGGAGC 5' (<i>Bam</i> HI)
R:	3' <u>GGTACCTT</u> ATTGAAGATTTT 5' (<i>Kpn</i> I)
(D) LIC11228	
F:	3' <u>GGATCCGA</u> ACAAATCGTA 5' (<i>Bam</i> HI)
R:	3' GGGGGT <u>TACCTT</u> AGAATTCT 5' (<i>Kpn</i> I)

3.17 Clonagem em vetor de amplificação

Os fragmentos amplificados por PCR foram clonados no vetor pGEM-T-Easy (Promega) (Figura 1) segundo as recomendações do fabricante. As misturas das reações de ligação vetor-inserto foram utilizadas na transformação de bactérias competentes *E. coli* DH5 α . A seleção das colônias recombinantes foi feita pelo método LacZ em meio ágar-2YT contendo 100 μ g/ μ L de ampicilina, suplementado com 80 μ g/ml β -galactosidase (X-Gal) e 0,5 mM isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG). Foram feitas preparações plasmidiais de colônias positivamente selecionadas por ampicilina/X-Gal/IPTG, utilizando-se o kit *Concert* (Gibco), seguido de digestão enzimática e análise em gel de agarose 1% para verificação da presença dos insertos de interesse.

3.18 Clonagem em vetor de expressão

Os insertos de interesse foram submetidos a digestão enzimática com as enzimas adequadas para retirada do vetor de amplificação, seguido de purificação a partir de gel de agarose 1% utilizando-se o kit *Concert* (Gibco). Os fragmentos de DNA foram então subclonados em vetor de expressão pAE (RAMOS *et al.*, 2004)

(Figura 2) previamente linearizado por digestão com as enzimas apropriadas. As condições da reação de ligação foram as seguintes: 100 ng DNA, tampão T4 DNA ligase 1X, 1 µL da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen), em volume total de 10 µL. Primeiro, o DNA e a água foram incubados por 5min em banho seco a 42°C, seguido de 5min em gelo. Após, adicionou-se a enzima T4 DNA ligase e o tampão; a reação foi mantida a 16°C por cerca de 16h.

3.19 Seqüenciamento

As preparações plasmidiais das construções pAE-LIC10314, pAE-LIC10672, pAE-LIC11003 e pAE-LIC11228 foram submetidas a seqüenciamento a partir dos primers T7 (F) e pAE (R) (Tabela 4), utilizando-se o seqüenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem) para a conferência das clonagens e seqüências dos insertos. O método de seqüenciamento empregado foi o de terminação de cadeia (SANGER *et al.*, 1977), no qual são utilizados 2',3'-didesoxirribunucleotídeos (ddNTPs) que interrompem a amplificação por incorporação aleatória, e são marcados por fluoróforos para possibilitar a leitura automatizada através de feixe de laser do equipamento.

As reações de amplificação por PCR dos fragmentos a serem seqüenciados foram realizadas em aparelho termociclador, nas seguintes condições: 500 ng de DNA molde, 3,2 pmoles de cada oligonucleotídeo, 2 µL da mistura de reação *BigDye* (Applied Biosystems), contendo ddNTPs marcados, dNTPs, enzima *Taq* DNA Polimerase, MgCl₂ e tampão para PCR. O programa consistiu-se de 40 ciclos de 94°C por 10s, seguido de 20s a 52°C e 4min a 60°C.

Após o PCR, seguiu-se a precipitação do DNA por 75% isopropanol, e centrifugação a 4000 x g por 50min a temperatura ambiente. Os precipitados foram lavados com 70% etanol, secos em aparelho de secagem a vácuo, e ressuspendidos em 15 µL de formamida (Applied Biosystems) para aplicação.

Tabela 4. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento dos genes clonados no vetor pAE.

F: 3' TAATACGACTCACTATAGGG 5'

R: 3' CAGCAGCCAACTCAGTTCCT 5'

3.20 Expressão das proteínas recombinantes

Bactérias competentes da cepa *E. coli* BL21-SI foram transformadas com as construções pAE-LIC10314, pAE-LIC10672, pAE-LIC11003 e pAE-LIC11228, inoculadas em meio líquido 2YT-ON suplementado com 100 µg/µL de ampicilina, e crescidas a 30°C por pelo menos 16h. As culturas foram re-inoculadas em meio fresco na proporção de 1:20, e cultivadas nas mesmas condições até atingirem densidades óticas de aproximadamente 0,6 medidas a λ=600 nm em espectrofotômetro.

A indução da expressão das proteínas recombinantes foi feita pela adição de 300 mM NaCl às culturas, seguindo-se incubação a 30°C sob agitação por cerca de 16h.

3.21 Análise de solubilidade das proteínas recombinantes

As culturas induzidas foram centrifugadas (3200 x g, 20min, 4°C), e os sedimentos bacterianos foram ressuspensos em 30 mL de solução de lise: 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM PMSF, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100 e 100 µg/mL lisozima (Sigma).

A lise celular foi feita em sonicador Ultrasonic Processor (modelo 100 W) por 5min contínuos a 60 Hz em banho de gelo. Os lisados bacterianos totais foram centrifugados (12800 x g, 20min, 4°C) para separar as frações solúveis das insolúveis. Após, as frações insolúveis foram solubilizadas em solução desnaturante contendo 8 M uréia, 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 5 mM Imidazol e 1 mM β-mercaptoetanol.

3.22 Purificação das proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes induzidas em *E. coli* BL21-SI foram purificadas por cromatografia de afinidade a metal. Utilizou-se resina de sepharose (*Fast Flow chelating Sepharose* – Pharmacia), previamente equilibrada com NiSO₄. A solução contendo a proteína de interesse foi carregada na coluna, e, em seguida, foram feitas lavagens das proteínas contaminantes com 50 mL de soluções contendo baixa concentração de imidazol (5 mM, 20 mM, 40 mM e 60 mM). A eluição das proteínas recombinantes foi feita com solução contendo alta concentração de imidazol (1 M).

3.23 Reatividade das proteínas recombinantes purificadas com soros de pacientes diagnosticados com leptospirose

Foram realizados géis de poliacrilamida SDS-PAGE 12% contendo 1 µg de cada proteína recombinante purificada, rLIC10314 e rLIC11672, e, respectivamente, marcador de peso molecular e a proteína recombinante purificada LipL32, como controles negativo e positivo. As eletrotransferências das proteínas para membranas de nitrocelulose (Hybond ECL, GE Healthcare) foram realizadas por 80min a 0,8 mA por cm², em sistema TE 77 (GE Healthcare), em tampão de transferência (48 mM Tris-Base, 39 mM Glicina, 0,037% SDS; pH 8,3). As membranas foram coradas com Ponceau S (Merck) para verificação da eficiência das transferências e, posteriormente, descoradas com PBS-T (PBS acrescido de 0,05% Tween 20). O bloqueio foi realizado com 5% leite em pó desnatado + 2,5% BSA em PBS-T, por 16h a 4°C. Após, as membranas foram lavadas com PBS-T (3 vezes por 10min).

Os *pools* de soros de pacientes diagnosticados com leptospirose (MAT positivo ou MAT negativo – Tabela 5) e *pool* de soros de indivíduos normais, na diluição de 1:500, foram adsorvidos por 1h à temperatura ambiente em tampão 5% leite em pó desnatado + 2,5% BSA em PBS-T, acrescido de 25% de extrato de *E. coli* BL21-SI. Após adsorção dos soros, fez-se a incubação das membranas por 3h à temperatura ambiente, seguido de 3 lavagens de 10min com PBS-T. As membranas foram então incubadas por 1h à temperatura ambiente com soro

policlonal anti-IgG de humano conjugado com peroxidase (Sigma) na diluição de 1:5000 em tampão 5% leite em pó desnatado + 2,5% BSA em PBS-T. Após 3 lavagens de 10min com PBS-T, as membranas foram tratadas com o *kit* ECL (GE Healthcare) para a detecção de bandas reativas e expostas a filmes de raio-X T-MAT G/RA (Kodak) por 1 a 5min, seguido de revelação.

Os soros de pacientes utilizados foram cedidos pela Dr. Eliete Romero do Insituto Adolfo Lutz.

Tabela 5. Soros de pacientes diagnosticados com leptospirose utilizados na avaliação da reatividade das proteínas recombinantes purificadas. MAT: denota o resultado do teste de microaglutinação microscópica – negativo, quando não houve reação e a doença na fase inicial ainda não havia sido diagnosticada, ou o nome do sorovar e o respectivo título do soro quando o resultado do teste foi positivo no diagnóstico de leptospirose.

Paciente	Número do soro	MAT	Aparecimento dos sintomas	Data da coleta
1	86/4	negativo	17/01/07	23/01/07
	142/4	Autumnalis 1/25600		
2	1190/3	negativo	12/12/07	18/12/07
	84/4	Copenhageni 1/3200		
3	229/3	negativo	04/02/07	11/02/07
	316/3	Icterohaemorrhagiae 1/6400		
4	178/4	negativo	06/02/07	12/02/07
	344/4	Icterohaemorrhagiae 1/3200		
5	371/7	negativo	15/02/07	23/02/07
	452/7	Copenhageni 1/1600		
6	426/7	negativo	27/02/07	01/03/07
	480/7	Icterohaemorrhagiae 1/6400		
7	69/6	negativo	12/01/07	16/01/07
	204/6	Copenhageni 1/3200		
8	464/7	negativo	não consta	não consta
	742/7	Icterohaemorrhagiae 1/3200		

3.24 Avaliação da capacidade de adesão das proteínas recombinantes purificadas a componentes de matriz extracelular

As proteínas rLIC10314, rLIC10672 e Lsa24 (controle positivo para laminina) (BARBOSA *et al.*, 2006), foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose segundo o procedimento anteriormente descrito.

O bloqueio foi realizado com 5% BSA em PBS-T por 16h a 4°C, seguido de 3 lavagens de 10min com PBS-T. As membranas foram incubadas apenas com PBS-T (controle negativo da adesão), ou com laminina de membrana basal de sarcoma murino (Sigma) ou fibronectina plasmática humana (Sigma) na concentração de 20 µg/mL em PBS-T, por 1h à temperatura ambiente. Após lavagens, seguiu-se incubação por 1h à temperatura ambiente com anticorpos específicos para cada componente produzidos em coelho (Sigma), na diluição de 1:1000 em PBS-T. As membranas foram novamente lavadas, e incubadas com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase produzido em cabra (1:5000 em PBS-T) por 1h à temperatura ambiente.

A detecção e revelação de bandas reativas foram realizadas conforme descrito no item anterior.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cultura de leptospiiras

Devido à dificuldade de obtenção e cultura de leptospiiras do sorovar Copenhageni virulentas, foram utilizadas bactérias *L. interrogans* sorovar Pomona cepa LPF, que têm cultivo de rotina bem estabelecido na FMV-USP, com inoculações periódicas em animais para a manutenção da virulência. Embora o sorovar Pomona não seja o mais importante patogênico ao homem, análises de relações genéticas baseadas em hibridização DNA-DNA (RAMADASS *et al.*, 1997) já demonstraram que esse sorovar é bastante próximo ao Copenhageni, um dos mais patogênicos ao homem. Tendo em vista essa proximidade genética, a disponibilidade de culturas virulentas do sorovar Pomona cepa LPF, e o fato de o sorovar Copenhageni ser um dos mais patogênicos ao homem e o seu genoma estar disponível para a realização da identificação *in silico* das proteínas após espectrometria de massas, foi utilizado o sorovar Pomona cepa LPF na realização do presente trabalho.

4.2 Géis Bidimensionais

O preparo das amostras é a etapa crítica na qualidade do gel bidimensional. Foi realizada a padronização de protocolos que fossem compatíveis com o tipo de amostra utilizada e gerassem o melhor resultado possível, com o maior número de *spots* isolados e proteínas representadas em cada gel bidimensional.

Foram testadas duas soluções diferentes de solubilização para a lise das bactérias e obtenção do extrato protéico total: tampão comercial *DeStreak Rehydration Solution* (GE Healthcare), ou tampão de lise. Os melhores resultados foram obtidos com o tampão comercial *DeStreak Rehydration Solution* (GE Healthcare), que foi utilizado nos experimentos subsequentes.

A forma de lise bacteriana mais adequada ao pequeno volume de solução de solubilização em que as amostras devem ser ressuspensas para a hidratação das fitas do tamanho utilizado (18 ou 24 cm) foi obtida por passagens sucessivas por seringa.

Na etapa de focalização isoeletrica, foram testados protocolos com alterações nas seqüências crescentes de voltagem, e diferentes acúmulos totais de V/h por fita. Foi observado que as amostras utilizadas apresentavam excesso de sal, o que ocasionava uma baixa voltagem no início da focalização e um acúmulo de sal nos papéis-filtro posicionados nas extremidades das fitas na bandeja do focalizador *Ettan IPGphor II* (GE Healthcare). O excesso de sal resultava em uma sub-focalização nas regiões ácida e básica das fitas, bem como linhas de arraste horizontal nos géis de SDS-PAGE. Para reverter isso, foi utilizado um passo inicial na focalização, que consistiu em baixa voltagem por um tempo prolongado para que o sal excedente pudesse migrar para os papéis-filtro posicionados nas extremidades das fitas, que eram periodicamente substituídos. O total acumulado ao final de cada focalização foi de cerca de 70.330 V/h, levando aproximadamente 25h para a conclusão do processo de eletrofocalização.

Em uma primeira etapa, para cada tipo de amostra, sendo extrato protéico total de *L. interrogans* sorovar Pomona cepa LPF (a) virulenta proveniente de rim, (b) virulenta proveniente de fígado e (c) não-virulenta atenuada em cultura, foram realizados três géis bidimensionais a partir de culturas independentes (Tabela 6). Embora tenha sido observada uma não-reprodutibilidade entre os géis independentes obtidos apesar da padronização do procedimento utilizado, na Figura 3 pode-se observar os géis representativos obtidos para cada tipo de amostra. Devido à dificuldade de comparação direta entre os géis, cada gel foi trabalhado independentemente, tendo sido processados para espectrometria de massas todos os *spots* de proteínas visíveis e isolados.

Tabela 6. Balanço do número de *spots* excisados e identificados de cada gel 2D de culturas independentes de cada tipo amostral: **(a)** leptospiros virulentas obtidas de rim de animais infectados, **(b)** leptospiros virulentas provenientes de fígado de animais infectados, e **(c)** leptospiros não-virulentas atenuadas em cultura.

Tipo de Amostra	Experimento	<i>spots</i> excisados	<i>spots</i> identificados	<i>spots</i> identificados (%)
(a) Virulenta de Rim	1	191	58	30,37
Virulenta de Rim	2	80	18	22,50
Virulenta de Rim	3	240	67	27,92
(b) Virulenta de Fígado	1	98	58	59,18
Virulenta de Fígado	2	120	51	42,50
Virulenta de Fígado	3	166	34	20,48
(c) Não-virulenta	1	197	52	26,40
Não-virulenta	2	89	73	82,02
Não-virulenta	3	70	55	78,57
		Total = 1251	Total = 466	Total = 37,25%

Figura 3. Géis bidimensionais de amostras de extratos protéicos totais de *L. interrogans* sorovar Pomona cepa LPF utilizando fitas da faixa de pH de 3 a 10. **A-** extrato total de leptospiros virulentos originárias de rim de hamsters infectados; **B-** extrato total de leptospiros virulentos originárias de fígado de hamsters infectados; **C-** extrato total de leptospiros não-virulentas atenuadas em cultura.

Em uma segunda etapa, para se obter géis mais fidedignos das condições analisadas, minimizando as diferenças individuais durante a infecção, foram realizados experimentos adicionais utilizando-se uma cultura de leptospiros virulentas obtidas através de um *pool* de rins de 5 animais infectados. Foram realizados 3 géis bidimensionais em triplicata a partir dessa cultura de leptospiros virulentas e, paralelamente, 3 géis de cultura de leptospiros não-virulentas. As triplicatas de cada condição (virulenta de rim e não-virulenta) mostraram-se bastante reprodutíveis. No entanto, diferentemente do que se esperava, a comparação entre o perfil proteômico do extrato protéico total de bactérias virulentas e não-virulentas revelou-se bastante distinto (Figura 4). Foram excisados os *spots* isolados e mais intensos correspondentes das triplicatas de cada condição. Os *spots* correspondentes foram unidos e processados em conjunto em uma única amostra para aumentar a quantidade de proteínas e a possibilidade de identificação por espectrometria de massas MALDI-TOF (Tabela 7).

Tabela 7. Balanço do número de *spots* excisados e identificados das amostras obtidas das triplicatas de géis 2D das condições de virulência e não-virulência. Virulenta de rim: *pool* de leptospiros obtidas de 5 animais infectados.

Tipo de Amostra	Experimento	<i>spots</i> excisados	<i>spots</i> identificados	<i>spots</i> identificados (%)
Virulenta de Rim	4	100	15	15,00
Não-virulenta	4	100	50	50,00
		Total = 200	Total = 65	Total = 32,5%

Figura 4. Géis bidimensionais de amostras de extratos protéicos totais de *L. interrogans* sorovar Pomona cepa LPF utilizando fitas da faixa de pH de 3 a 10. **A-** extrato total de leptospiros virulentos originárias de *pool* de rins de 5 hamsters infectados; **B-** extrato total de leptospiros não-virulentos atenuadas em cultura.

A partir dos géis obtidos, foi verificado que nas fitas da faixa de pH utilizada (3 a 10), houve uma maior representação de *spots* focalizados na faixa de pH de aproximadamente 5 a 7, e poucos *spots* nos extremos ácido e básico das fitas (Figuras 3 e 4). A literatura relata alguns trabalhos proteômicos nos quais se verificou a distribuição de proteínas de leptospiros essencialmente no intervalo de pI de 4 a 7 (HAAKE e MATSUNAGA, 2002; CULLEN *et al.*, 2002). Já no trabalho realizado por Nally e colaboradores (2005), foi demonstrado que as proteínas de leptospira estão compreendidas em uma faixa pI mais ampla - de 4 a 9 - embora haja uma maior abundância evidente de *spots* de proteínas com pI menor do que 7. Os resultados obtidos neste trabalho são concordantes com os trabalhos citados, já que foi observada a prevalência de *spots* de proteínas entre o pH de 5 a 7 nas fitas utilizadas (Figuras 3 e 4).

4.3 Proteínas identificadas

Os *spots* de proteínas recortados dos géis e processados foram submetidos à técnica analítica de espectrometria de massas MALDI-TOF. No geral, a qualidade dos espectros obtidos foi satisfatória, sendo que apenas alguns *spots* não geraram nenhum sinal e o “ruído” observado foi bastante pequeno. Foi possível observar que as amostras que não geraram nenhum pico significativo em sua maioria consistiam em *spots* pouco intensos, com pouca quantidade de proteína no gel. Um espectro representativo, que gerou identificação positiva de uma proteína de leptospira está representado no Anexo A.

O número total de *spots* recortados de cada gel, bem como o número de *spots* que geraram identificação de proteínas com *scores* significativos na busca de banco de dados de leptospira pelo programa MASCOT estão representados nas Tabelas 6 e 7. Dentre os 1451 *spots* processados, 531 foram identificados significativamente como proteínas de leptospira. As proteínas identificadas com *score* significativo totalizaram 36,6% dos *spots* analisados.

Inicialmente, havia a preocupação com possíveis contaminações do extrato total das leptospiros com proteínas dos órgãos dos animais ou do soro de coelho adicionado ao meio de cultura utilizado para o cultivo das leptospiros, que

poderiam mascarar ou interferir nas análises das proteínas das leptospiros. No entanto, dos 1451 *spots* analisados, poucos foram identificados significativamente como sendo proteínas exógenas, ou seja, de outro organismo que não leptospira. A verificação de presença de proteínas contaminantes foi realizada por busca em banco de dados MSDB geral através do programa MASCOT. Foram identificados alguns *spots* como sendo proteínas de coelho: apolipoproteína A-I, precursor de albumina e hemoglobina. Esse fato pode ser justificado pela adição de soro de coelho no meio de cultura das bactérias, o que gerou alguma contaminação residual mesmo após as lavagens das culturas sedimentadas por centrifugação. Foi identificada também uma proteína de hamster (citocromo-b5) em uma amostra proveniente de fígado de hamster infectado, e um *spot* gerou identificação de queratina humana, fruto de contaminação durante a manipulação.

Os 531 *spots* identificados significativamente correspondem a 134 proteínas diferentes de leptospira, sendo que algumas delas apresentaram-se em múltiplos *spots* distribuídos ao longo dos géis, e não em *spots* únicos. Em certos casos de pluralidade de *spots*, as proteínas mudaram apenas de pI ou massa molecular, enquanto em outros encontraram-se em locais totalmente distintos do gel (Figura 5). A identificação de proteínas em múltiplos *spots* pode ser atribuída à ocorrência de diferentes isoformas devido a modificações pós-traducionais, ou à presença de fragmentos protéicos por degradação das amostras durante o procedimento (MARQUES *et al.*, 2004).

Na Tabela 8 estão listadas todas as 134 proteínas diferentes identificadas, bem como o número máximo de vezes que apareceram em pelo menos um dos géis de cada tipo amostral. As proteínas foram denominadas conforme a numeração de LIC (*Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni) conferida às ORFs no projeto genoma do sorovar Copenhageni (NASCIMENTO *et al.*, 2004a).

Figura 5. Exemplos de proteínas que foram identificadas em múltiplos *spots*. (A) *Spots* 1 a 3 – LIC11531 com variações de pI; *spots* 5 e 6 – LIC11890 com variações de pI. (B) *Spots* 48 a 49 – LIC11243 com variações de pI; *spots* 51 a 55 – LIC11275 com variações de pI; (C) *Spots* 81, 97, 98, 100 e 101 – LIC11335 com variações de pI e massa molecular.

Tabela 8. Listagem das 134 proteínas diferentes de leptospira identificadas significativamente no programa MASCOT a partir dos PMF obtidos por espectrometria de massas MALDI-TOF. Nas colunas observa-se a denominação da proteína por LIC, o nome e/ou função demonstrada ou predita da proteína, e número máximo de *spots* em que cada proteína foi identificada em pelo menos um dos géis de cada tipo de amostra (rim, fígado ou não-virulenta).

LIC	Proteína/Função	Rim	Fígado	NV
10002	DNA polimerase III subunidade beta	1	1	3
10011	LipL21	1	1	1
10074	DapF - diaminopimelato epimerase		1	
10158	hipotética		1	
10176	hipotética	1		
10191	Loa22; OmpA-like	6	3	3
10272	FusA - fator de elongação EF-2	1	1	1
10314	hipotética	1		
10361	EtfB2 – flavoproteína de transporte de elétrons, subunidade beta	2	2	2
10403	RisB - riboflavina sintase, cadeia beta	2	2	
10411	hipotética	2	1	2
10419	hipotética	1		
10483	hipotética		1	1
10524	DnaK - <i>Heat shock protein 70</i>	2	1	3
10591	Proteína periplasmática de tolerância a cátions divalentes	1		2
10600	Síntese de ácidos graxos, subunidade beta		1	
10601	hipotética		2	1
10602	PldB - lisofosfolipase			1
10606	dps – proteína ligadora de DNA sobre estresse			1
10615	Provável lipoproteína			1
10619	hipotética	1		
10629	glpK2 glicerol quinase	1		
10664	hipotética		1	
10672	hipotética	1		
10723	FliD – Proteína associada ao flagelo			1
10733	PepA – aminopeptidase citosólica	1		1
10752	RplL - proteína ribossomal 50s, L7/L12	2	2	1
10753	rpoB - RNA polimerase dependente de DNA, subunidade beta			1
10767	hipotética	1		
10771	hipotética		1	
10788	FlaA-1 – proteína flagelar (bainha)	1	1	1
10838	GloA - glioxalase	1		1
10851	tsf - fator de elongação Ts	1		1

Continua

Tabela 8. (Continuação)

LIC	Proteína/Função	Rim	Fígado	NV
10918	hipotética			1
10973	OmpL1	1	1	
11003	LipL71	1		2
11115	sseA thiosulfato sulfurtransferase			1
11128	Proteína da família GGDEF	1		
11194	Provável citrato liase	2	2	2
11196	hipotética	1	1	1
11205	hipotética	1		
11219	AhpC - peroxiredoxina	3	5	3
11220	Permease do sistema ABC <i>transporter</i>	1		
11228	hipotética		1	
11231	Regulador de transcrição(TetR family)	1		
11241	atpA - ATP sintase subunidade A	3	2	4
11243	atpD - ATP sintase subunidade B	3	3	4
11249	hipotética			1
11258	MreB – proteína determinadora da forma arredondada		2	2
11261	Proteína ligadora a penicilina	1		
11310	bfr - bacterioferritina	1		1
11335	GroEL - chaperonina	5	5	7
11336	GroES - Hsp10 (<i>heat shock protein</i>)	1	1	2
11352	LipL32	2	3	2
11377	flhF – proteína flagelar ligadora de GTP	2	3	2
11391	FliI – ATPase do sistema de secreção tipo III			1
11416	tig - FKBP-type peptidil-prolil cis-trans isomerase (fator gatilho)		1	
11417	ClpP – Clp protease dependente de ATP, subunidade proteolítica		1	
11456	LipL31		1	
11460	glutamyl-tRNA(Gln)amidotransferase, subunidade C	1		
11511	def - provável deformilase de polipeptídeos	1	1	1
11514	hipotética			1
11517	accA2 - acetil-CoA carboxilase, subunidade alfa			1
11531	flagelina	1	4	3
11532	flagelina	1	1	2
11550	hipotética	1		1
11569	hipotética	1		
11643	LipL45 - Qlp42	2	1	5
11652	tal - transaldolase	2	1	1
11657	FliS - proteína flagelar	1		
11695	hipotética	1		

Continua

Tabela 8. (Continuação)

LIC	Proteína/Função	Rim	Fígado	NV
11731	slyD - FKBP-type peptidil-prolil cis-trans isomerase		1	
11782	hipotética	3	3	2
11786	thrB - homoserina kinase			1
11821	leuD - 3-isopropilmalate desidratase, subunidade menor		1	
11848	hipotética	5	4	6
11885	LipL46 - provável lipoproteína	1	1	
11890	flagelina	6	2	3
11934	Adeniltransferase de polipeptídeos	1		
11951	Semelhante à CLP protease ATP-dependente, subunidade proteolítica	1	1	1
11985	Proteína ligadora de RNA	1		1
12002	SdhB - succinato desidrogenase	2		
12003	SdhA - succinato desidrogenase	1		
12015	hipotética	1	1	
12040	hipotética		1	1
12068	hipotética		1	
12082	CysK - cisteína sintase	4	2	3
12087	Proteína sensora histidina quinase			1
12114	Provável lipoproteína	1		
12195	transacetolase			1
12211	Hsp15 - <i>small heat shock protein</i>	1	1	1
12233	frutose-bisfosfato aldolase		1	1
12246	miaR - tRNA delta(2)-isopentenilpirofosfato transferase	1	1	
12326	hipotética		1	
12328	Provável lactolglutathione liase			1
12333	hipotética			1
12407	glnA - provável glutamina sintetase	1		1
12414	hipotética			1
12454	Regulador de resposta	2	1	2
12459	hipotética	1		
12513	Proteína de membrana citoplasmática	1		
12515	Precursor periplasmático ligador de cistina	1		
12558	hipotética			1
12571	Provável chaperona DnaJ			1
12573	sucC - succinil-CoA sintetase, subunidade beta	1	1	
12621	hipotética	2	4	3
12633	hipotética	1		
12634	hipotética	1		
12667	Provável lipoproteína	1		

Continua

Tabela 8. (Continuação)

LIC	Proteína/Função	Rim	Fígado	NV
12706	NusA - fator de alongação da transcrição	1		1
12739	Proteína da família MaoC			1
12765	tpx - thiol peroxidase	1	1	1
12795	acetyl-CoA acetiltransferase	3		
12852	adk - adenilato quinase			1
12875	Tuf – Fator de alongação Tu	10	5	8
12898	hipotética	1		
12946	glicosil transferase	1		
12966	LipL41		3	2
12971	FtsQ – proteína de divisão celular			1
12980	hipotética		1	
13050	hipotética	2	2	3
13123	hipotética		1	2
13157	hipotética			1
13166	hipotética	4	3	1
13308	hipotética			1
13316	Proteína ligadora a ATP do sistema de transporte ABC	1	1	1
13332	ferredoxina		1	
13451	flgK – proteína associada ao gancho flagelar	1		
20044	Hsp90- htpG <i>heat shock protein 90</i>			1
20114	Homólogo de LipL45		1	
20125	CobO - corinoid ATP adenosiltransferase	1		
20185	hipotética		1	2
20227	ard – enzima acireductona dioxigenase ARD e ARD´	1		1
20254	Regulador de resposta		1	

Conclusão

Dentre as proteínas que foram encontradas em múltiplos *spots*, pode-se citar como exemplo as chaperonas DnaK (LIC10524) e GroEL (LIC11335) que foram identificadas, respectivamente, 2 e 5 vezes em bactérias virulentas de rim, 1 e 5 vezes em virulentas de fígado, e 3 e 7 vezes em leptospiros não-virulentas. A proteína presente em maior número de *spots* foi o fator de alongação Tu (LIC12875), que foi identificado em até 10 *spots* nas amostras de leptospiros virulentas de rim, em 5 nas de fígado, e em 6 nas amostras não-virulentas. Adicionalmente, algumas proteínas hipotéticas (LIC11848, LIC12621, LIC13050, e LIC13166), lipoproteínas de membrana como OmpA-like (LIC10191), LipL32 (LIC11352), LipL45 (LIC11643) e LipL41 (LIC12966), flagelinas LIC11531 e LIC11890, e ATP sintases subunidades A e B (LIC11241 e LIC11243) também foram observadas em vários *spots* distribuídos nos géis (Tabela 8).

Os resultados apresentados neste trabalho corroboram dados da literatura apresentados por Cullen e colaboradores (2002) para LipL32 (LIC11352), que é uma proteína de membrana majoritária expressa durante a infecção de mamíferos (HAAKE, 2000; HAAKE *et al.*, 2000), onde demonstraram que a proteína sofre modificações e processamento, resultando em variações de pI e massa molecular. Porém, o significado funcional disso permanece desconhecido.

Analisando-se a distribuição dos genes codificantes para as proteínas identificadas no genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, observou-se que 6 têm seus genes localizados no cromossomo menor, enquanto as outras 128 no cromossomo maior. A partir de buscas por BLAST no genoma seqüenciado de *L. interrogans* sorovar Lai (REN *et al.*, 2003), com exceção da proteína LIC12571, todas as demais identificadas apresentam ortólogos gênicos nesse outro sorovar patogênico.

4.4 Categorias funcionais

Com base em buscas no banco de dados disponível do genoma de *L. interrogans*, foi possível notar que as 134 proteínas diferentes identificadas representam todas as grandes categorias funcionais de leptospiros (Tabela 9A).

A partir da comparação entre a distribuição das proteínas identificadas em cada categoria funcional das amostras virulenta de rim, virulenta de fígado e não-virulenta, foi possível verificar que não houve um viés aparente de expressão das categorias funcionais entre os tipos amostrais analisados (Figura 6). Isso sugere que em ambas as condições de virulência e não-virulência não houve maior expressão de um conjunto funcional de proteínas em detrimento de outro. Seria aceitável se esperar maior expressão de proteínas de membrana ou de patogenicidade, virulência e adaptação nas bactérias virulentas, já que se acredita que essas classes desempenhem um papel crucial na interação do patógeno com as células do hospedeiro durante o processo infeccioso, e na adaptação ao ambiente estressante nos tecidos do hospedeiro (HAAKE, 2000).

Tabela 9. Distribuição das proteínas identificadas nas categorias funcionais (A). Em B, dados das anotações das ORFs identificadas no seqüenciamento genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni (NASCIMENTO *et al.*, 2004a, b).

Categoria Funcional	(A)	(B)
Biossíntese de pequenas moléculas	10	273
Processos celulares	13	219
Metabolismo intermediário central	5	47
Degradação	3	91
Metabolismo de DNA / RNA	6	149
Metabolismo energético, carbono	9	76
Componentes de membrana	15	64
Outros componentes estruturais	3	110
Patogenicidade, virulência e adaptação	5	41
Metabolismo de proteínas	15	87
Funções regulatórias	5	172
Categoria não-definida	3	359
Hipotéticas	42	1239
	Total: 134	Total: 2927

Figura 6. Distribuição das proteínas identificadas em cada categoria funcional das amostras virulenta de rim, virulenta de fígado e não-virulenta.

4.5 Rotas metabólicas

Os processos metabólicos de uma célula consistem em um complexo mapa de reações químicas, cada uma catalisada por enzimas específicas. A complexidade do metabolismo reside também na sua plasticidade, podendo variar conforme as condições ambientais, nutrientes disponíveis e necessidades do organismo em dado momento. Cada via metabólica consiste em duas informações básicas: sua estrutura e seus componentes. A estrutura define as relações entre as reações da via, bem como entre os compostos - se são reagentes ou produtos. E os componentes são as enzimas específicas que catalisam cada uma das reações da via em determinado organismo. Embora o metabolismo das leptospiros ainda não esteja totalmente

elucidado, é possível prever o mapa de capacidades metabólicas das leptospiiras baseando-se nas informações obtidas com o seqüenciamento genômico (Anexo B).

O metabolismo energético das leptospiiras é o que permanece com maiores dúvidas. Em cultivo de laboratório, *L. interrogans* utiliza como principal fonte energética e de carbono ácidos graxos de cadeia longa, através da via de β -oxidação. Embora em condições laboratoriais as leptospiiras aparentemente não sejam capazes de utilizarem glicose como fonte de carbono, genomicamente possuem todas as enzimas da via glicolítica, com a única mudança da presença da enzima pirofosfofrutoquinase-frutose-6-fosfato 1-fosfotransferase ao invés da fosfofrutoquinase. Estão presentes também todas as proteínas necessárias ao ciclo do TCA (NASCIMENTO *et al.*, 2004a).

Neste trabalho, foi utilizado o programa *Pathway Analyst*, que prediz as vias metabólicas e catalisadores a partir de dados proteômicos baseado em buscas por BLAST (PIREDDU *et al.*, 2005), para verificar a possível variação das rotas metabólicas ativas em leptospiiras virulentas e avirulentas nas condições experimentais utilizadas. Para as buscas, foram utilizadas as seqüências das proteínas identificadas nas duas condições amostrais investigadas: leptospiiras virulentas e não-virulentas.

Das 10 vias analisadas, foram identificados integrantes de 4 rotas metabólicas nas bactérias não-virulentas, e de 6 rotas nas bactérias virulentas (Tabela 10). As que foram encontradas em comum nas duas condições são: (1) metabolismo de alanina e aspartato, (2) metabolismo de cisteína, (3) metabolismo de glutamato e (4) glicólise e gliconeogênese. Consistem em vias de metabolismo de aminoácidos e metabolismo de compostos de carbono. Enquanto isso, duas vias foram identificadas somente na condição de virulência: ciclo do TCA e metabolismo de propanoato, que fazem parte do metabolismo energético da célula.

Curiosamente, os catalisadores identificados das duas vias diferencialmente presentes na condição de virulência (LIC12002: succinato desidrogenase A; LIC12003: succinato desidrogenase B; e LIC12573: succinil-CoA sintase subunidade β) utilizam o succinato como reagente (Tabela 10). Talvez a ausência aparente nas

Tabela 10. Análise pelo programa *Pathway Analyst* das proteínas identificadas integrantes de 10 rotas metabólicas. **V:** *Leptospiras virulentas* provenientes de rim ou fígado de hamsters infectados; **NV:** *Leptospiras* não-virulentas atenuadas por sucessivas passagens em cultura; **LIC:** proteína identificada no proteoma que provavelmente catalisa a reação.

Rota Metabólica	Amostra	Enzima	LIC	Reação
Metabolismo de alanina e aspartato	V	IMP:L-aspartato ligase (formação de GDP)	12765	GTP + L-Aspartato + IMP $\rightleftharpoons$ Ortofosfato + GDP + N6-(1,2-Dicarboxietil)-AMP
	NV	IMP:L-aspartato ligase (formação de GDP)	12765	GTP + L-Aspartato + IMP $\rightleftharpoons$ Ortofosfato + GDP + N6-(1,2-Dicarboxietil)-AMP
Metabolismo de aminoaçúcares	V	ausente		
	NV	ausente		
Ciclo do TCA	V	Succinato: (aceptor) oxidoreductase	12002; 12003	Aceptor + Succinato $\rightleftharpoons$ aceptor reduzido + Fumarato
		Succinatp: CoA ligase (formação de ADP)	12573	ATP + CoA + Succinato $\rightleftharpoons$ ADP + Ortofosfato + Succinil-CoA
		Succinate: ubiquinona oxidoreductase	12002	Succinato + Ubiquinona $\rightleftharpoons$ Fumarato + Ubiquinol
	NV	ausente		
Metabolismo de cisteínas	V	O3-Acetil-L-serino acetato-liase	12082	Sulfeto de hidrogênio + O-Acetil-L-serina $\rightleftharpoons$ Acetato + L-Cisteína
		O3-Acetil-L-serino acetato-liase	12082	H ⁺ + Thiosulfato + Thioredoxina + O-Acetil-L-Ser. $\rightleftharpoons$ Acetato + Sulfito + L-Cys + thior reduzida
		O3-Acetil-L-serino acetato-liase	12082	Thiosulfato + O-Acetil-L-serina $\rightleftharpoons$ Acetato+ S-Sulfo-L-cisteína
	NV	O3-Acetil-L-serino acetato-liase	12082	Sulfeto de hidrogênio + O-Acetil-L-serina $\rightleftharpoons$ Acetato + L-Cisteína
		O3-Acetil-L-serino acetato-liase	12082	H ⁺ + Thiosulfato + Thioredoxina + O-Acetil-L-Ser. $\rightleftharpoons$ Acetato + Sulfito + L-Cys + thior reduzida
		O3-Acetil-L-serino acetato-liase	12082	Thiosulfato + O-Acetil-L-serina $\rightleftharpoons$ Acetato+ S-Sulfo-L-cisteína
Metabolismo de galactose	V	ausente		
	NV	ausente		
Metabolismo de glutamato	V	L-Glutamato: amonia ligase (formação de ADP)	12407	ATP + NH ₃ + L-Glutamato $\rightleftharpoons$ ADP + Ortofosfato + L-Glutamina
	NV	L-Glutamato: amonia ligase (formação de ADP)	12407	ATP + NH ₃ + L-Glutamato $\rightleftharpoons$ ADP + Ortofosfato + L-Glutamina
Glicólise / Gliconeogênese	V	β -D-Fructose 1,6-bisP D-gliceraldeido-3-P-liase	12233	β -D-Fructose 1,6-bisP $\rightleftharpoons$ Glicerona P + (2R)-2-Hidroxi-3-(fosfonooxi)-propanal
	NV	β -D-Fructose 1,6-bisP D-gliceraldeido-3-P-liase	12233	β -D-Fructose 1,6-bisP $\rightleftharpoons$ Glicerona P + (2R)-2-Hidroxi-3-(fosfonooxi)-propanal
Metabolismo de metioninas	V	ausente		
	NV	ausente		
Metabolismo do propanoato	V	Succinato:CoA ligase (formação de ADP)	12573	ATP + CoA + Succinato $\rightleftharpoons$ ADP + Ortofosfato + Succinil-CoA
	NV	ausente		
Ciclo da uréia e metabolismo de grupos amino	V	ausente		
	NV	ausente		

amostras não-virulentas seja apenas devido à falta de identificação ou sub-expressão na condição de não-virulência, ou talvez haja de fato uma expressão diferencial e mudança de estratégia metabólica energética durante a infecção. Os dados aqui apresentados demonstram que o ciclo do TCA está ativo em bactérias virulentas. São necessários experimentos específicos para verificar a ativação dessa via em condições de não-virulência e, a partir dos resultados obtidos, concluir com maior precisão se há variação no metabolismo energético conforme a condição ambiental ou de infecção.

4.6 Localização celular

Pela análise bioinformática da localização celular das proteínas identificadas, foi possível verificar que estão representadas proteínas de todos os compartimentos celulares (membrana, periplasma e citoplasma), indicando a presença de proteínas hidrofílicas e hidrofóbicas. Segundo o programa *P-Classifier* de predição de localização subcelular de proteínas de bactérias gram-negativas (WANG *et al.*, 2005), de todas as 134 proteínas identificadas, a maior probabilidade de acordo com os parâmetros do programa é de que 99 proteínas sejam citoplasmáticas, 10 periplasmáticas, 4 de membrana interna, 16 de membrana externa e 5 extracelulares (Anexo C).

A Figura 7 exibe a distribuição das proteínas nas categorias funcionais, evidenciando a localização subcelular. Foi considerada a maior probabilidade calculada pelo programa *P-Classifier*, porém algumas discordâncias na predição são facilmente detectadas. Por exemplo, a proteína LIC10002, que é uma predita subunidade β da enzima DNA polimerase III (categoria de metabolismo de DNA/RNA), foi predita como tendo maior probabilidade de estar no ambiente extracelular (40%), quando sua função requer localização citoplasmática (33%). Na categoria de componentes de membrana, 3 foram preditas como periplasmáticas, 1 de membrana interna, 4 de membrana externa, e 7 citoplasmáticas. A predição das LIC11456 (LipL31) e LIC12966 (LipL41) como citoplasmáticas é discordante com sua categoria funcional e a presença de sítio de clivagem e lipidação de lipoproteínas de membrana predito pelo programa LipoP (Anexo C). Outro

componente de membrana, LIC20114 (LipL45 *homologue*), não tem sítio de lipidação predito pelo programa LipiP, porém obteve um *score* de 53% para citoplasma em detrimento de 40% para membrana externa. Portanto, apesar de terem sido consideradas as maiores probabilidades com base no *score* calculado pelo programa, uma análise mais minuciosa avaliando a função e outras predições são necessárias.

Figura 7. Distribuição em categorias funcionais de todas as proteínas de leptospira identificadas, baseando-se no banco de dados do genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Dentro das categorias funcionais, estão representadas as predições de localização subcelular com base no programa *P-Classifier*. **C:** citoplasmática; **E:** extracelular; **ME:** membrana externa; **MI:** membrana interna; **P:** periplasmática.

Dentro da categoria de processos celulares, foram identificadas proteínas de todos os compartimentos celulares, incluindo 3 proteínas extracelulares e 2 de membrana interna envolvidas na mobilidade celular: flagelinas LIC10723 e LIC11532 (FliD), e flagelinas LIC11890 e LIC11531, respectivamente. Um dado interessante foi a identificação de 8 proteínas hipotéticas preditas de membrana externa e 1 extracelular, o que, baseando-se na sua localização, pode indicar um possível papel importante na infecção e toxicidade das leptospiros.

4.7 Proteínas de membrana e lipoproteínas

Proteínas de membrana podem ser categorizadas como porinas, canais específicos de influxo de nutrientes, canais de efluxo, lipoproteínas, adesinas, glicoproteínas e proteínas de manutenção da membrana. O genoma da leptospira contém proteínas secretórias envolvidas na exportação de proteínas com peptídeos sinais através da membrana, bem como enzimas sinal-peptidases I de proteínas transmembrânicas de membrana externa e enzimas sinal-peptidases II de pró-lipoproteínas (HAAKE, 2000).

A habilidade das bactérias espiroquetas de se ligarem às células eucarióticas e às proteínas de matriz extracelular é crucial no processo de patogênese (HAAKE, 2000). Por mediar a interação inicial patógeno-hospedeiro, as proteínas de membrana das leptospiros, principalmente as lipoproteínas, têm sido o foco dos estudos na busca de antígenos vacinais. Das 4038 ORFs preditas no genoma do sorovar Copenhageni, 1496 (37%) parecem ter pelo menos 1 segmento transmembrana e, dessas, 160 são preditas lipoproteínas (NASCIMENTO *et al.*, 2004a, b). Apesar da pesquisa intensa nesse grupo de proteínas, a função da maioria das lipoproteínas de espiroquetas permanece não elucidada, e apenas algumas são caracterizadas como tendo um papel direto na patogênese – LipL32, Lsa24, Loa22, e Lsa21 (HAAKE, 2000; BARBOSA *et al.*, 2006; RISTOW *et al.*, 2007; ATZINGEN *et al.*, 2008).

Através do programa LipOP, que faz a predição de lipoproteínas discriminando entre peptídeos sinais de lipidação (SpII), outros peptídeos sinais (SpI) e hélices transmembrana de bactérias gram-negativas (JUNKER *et al.*; 2003),

foram preditas 13 proteínas com sítio de clivagem SpI, 12 lipoproteínas de membrana com sítio de clivagem SpII e 5 proteínas com hélice transmembrana n-terminal (Anexo C e Figura 8). Dentre essas, baseando-se nos dados de identificação das proteínas dos géis, 14 foram identificadas como expressas apenas nos extratos de bactérias virulentas provenientes de fígado e/ou rim de animais infectados: LIC10314, LIC10672, LIC10973 (OmpL1), LIC11228, LIC11456 (LipL31), LIC11569, LIC11695, LIC11885 (LipL46), LIC12002 (succinato desidrogenase B), LIC12015, LIC12114, LIC12513, LIC12667 e LIC12898. Pela predição por análise bioinformática, são provavelmente proteínas localizadas na membrana externa das leptospiros, tendo contato direto com o ambiente externo à célula. Embora sejam necessários experimentos e análises adicionais para confirmar a expressão diferencial dessas proteínas apenas em condição de virulência, o fato de terem sido identificadas em leptospiros virulentos e serem proteínas de membrana externa abre as portas para a investigação de sua possível função na patogenicidade, com papel direto na interação patógeno-hospedeiro das leptospiros.

Resultados preliminares através de técnica de PCR não-quantitativo a partir de cDNA de leptospiros virulentos e não-virulentos mostram que os transcritos de LIC10973 e LIC11885, proteínas identificadas apenas nas condições de virulência neste trabalho, estão presentes tanto em bactérias virulentas quanto em bactérias não-virulentas (Figura 9). Isso pode indicar que, pelo menos o RNAm dessas proteínas está presente nas duas condições, mas não descarta a possibilidade de não haver expressão ao nível de proteína. Pode-se considerar também a sub-expressão das proteínas em níveis não detectáveis pela metodologia utilizada.

Pelo mesmo método, a proteína LIC11003, identificada nos extratos protéicos totais de *L. interrogans* virulentos e não-virulentos, também exibiu transcritos de RNAm nas duas condições.

Figura 8. Distribuição em categorias funcionais de todas as proteínas de leptospira identificadas, baseando-se no banco de dados do genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Dentro das categorias funcionais, estão representadas as predições com base no programa LipoP. **SpI**: peptídeo sinal *signal peptidase I*; **SpII**: peptídeo sinal *signal peptidase II* de lipoproteína; **TMH**: hélices transmembrana n-terminais; **CYT**: citoplásmica (i.e. sem peptídeo sinal ou hélice transmembrana).

Figura 9. Amplificação por PCR a partir do cDNA de *L. interrogans* sorovar Pomona cepa LPF virulenta (**V**) e não-virulenta (**NV**) dos genes LIC11885 (1176 pb), LIC11003 (1619 pb) e LIC10973 (936 pb).

4.8 Proteínas hipotéticas

Uma vantagem da definição do proteoma de uma espécie é que permite a confirmação da existência de produtos gênicos preditos a partir da sequência de DNA, sendo de grande contribuição e complementação à ciência genômica (MARQUES *et al.*, 2004). A identificação neste trabalho de 42 proteínas hipotéticas de leptospira (Tabelas 8 e 9) é um dado importante, pois confirma a expressão dessas proteínas *in vivo*. Tendo em vista que a maioria das ORFs de leptospiros não tem função definida, e que pouco se sabe a respeito da biologia e processo infeccioso e de patogenicidade e virulência dessas bactérias, fica evidente que essas proteínas hipotéticas consistem em um “reservatório” de novas proteínas envolvidas na patogênese, podendo ser importantes fatores de virulência a serem pesquisados.

Nally e colaboradores (2005) já haviam identificado 6 das proteínas hipotéticas identificadas neste trabalho em leptospiros virulentos de isolados clínicos (LIC10672, LIC11848, LIC10411, LIC13123, LIC13166 e LIC13050). Adicionalmente, Sakolvaree e colaboradores (2007) identificaram por técnica imunoproteômica a proteína LIC10483, além das proteínas hipotéticas LIC13123 e LIC13166, já identificadas por Nally e colaboradores (2007) anteriormente. Assim, 35 das 42 proteínas hipotéticas identificadas no presente trabalho são novas e nunca antes reportadas como expressas *in vivo* em leptospiros.

Pela predição por análise bioinformática no servidor *P-Classifer* de localização celular, dentre as proteínas hipotéticas identificadas, 30 seriam citoplasmáticas, 1 extracelular, 3 periplasmáticas e 8 de membrana externa (Figura 7). Sabendo-se que as proteínas de membrana são a interface de interação da bactéria com o meio ambiente e o primeiro contato da bactéria com o hospedeiro (HAAKE, 2000), a identificação e confirmação da expressão de 8 proteínas hipotéticas de membrana externa abre as portas para pesquisas funcionais a fim de avaliar sua participação durante o processo infeccioso. Essas proteínas hipotéticas podem ser alvos importantes para pesquisas a respeito da patogenicidade dessas bactérias e, sendo proteínas expostas na membrana, tornam-se candidatos para a elaboração de uma vacina contra a leptospirose.

Das 42 proteínas hipotéticas, 24 foram identificadas apenas nas amostras virulentas obtidas de rim ou fígado de animais infectados (Tabela 8): LIC10419, LIC10158, LIC10176, LIC10314, LIC10483, LIC10619, LIC10664, LIC10672, LIC10767, LIC10771, LIC11205, LIC11228, LIC11569, LIC11695, LIC12015, LIC12068, LIC12114, LIC12326, LIC12459, LIC12633, LIC12634, LIC12667, LIC12898 e LIC12980. Dessas, 8 são de particular interesse tendo em vista a predição de sua localização celular pelo programa *P-Classifier*. São 6 preditas de membrana externa (LIC10314, LIC10767, LIC11228, LIC11569, LIC12015 e LIC12898) e 2 preditas periplasmáticas (LIC10483 e LIC12558) (Anexo C). Tentando-se sugerir funções para essas proteínas, foi realizado um alinhamento por BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997; SCHAEFFER *et al.*, 2001) para verificar possíveis domínios ou homologias e similaridades com outras proteínas já conhecidas.

A proteína LIC10314 apresenta domínio conservado de uma família de proteínas antigênicas (p83/p100 ou p93) da bactéria espiroqueta *Borrelia* spp. (FRASER *et al.*, 1997; MARCHLER-BAUER *et al.*, 2004). Essa família de proteínas provavelmente tem função na evasão imune, mimetizando características celulares de eucariotos (ROSSLER *et al.*, 1995). Assim, a identificação da expressão de LIC10314 em leptospiros virulentas sugere que essa proteína talvez esteja envolvida no processo de infecção. A proteína de membrana externa hipotética LIC12015 possui pequena similaridade com a isocitrato desidrogenase de bactérias como *Burkholderia* spp. e *Rhodospirillum rubrum* (ALTSCHUL *et al.*, 1997) e com uma putativa ferredoxina de *Wolinella succinogenes* (BAAR *et al.*, 2003), o que sugere sua participação metabólica ou de desintoxicação de ferro. LIC10767 apresenta similaridade com uma proteína de membrana externa autotransportadora de *Burkholderia* spp. (ALTSCHUL *et al.*, 1997), podendo ter função no transporte. LIC11569 é uma provável proteína C da via de secreção tipo II, tendo homologia com proteínas de diversos tipos bacterianos. Isso pode indicar uma função de secreção de fatores de virulência durante a infecção. LIC12898 tem um domínio conservado da família de proteínas TonB (MARCHLER-BAUER *et al.*, 2004), sendo uma provável porina dependente de

ligante. A proteína LIC10483 possui um domínio de *flotilin-like proteins*, que parece ser bastante conservado em bactérias (MARCHLER-BAUER *et al.*, 2004). As flotilinas estão envolvidas em transdução de sinais, tráfego vesicular e interação com diversas proteínas. Há similaridade também com proteínas putativas de core viral de algumas bactérias como *Geobacter* spp. e *Burkholderia* spp., embora esse domínio não tenha função conhecida. LIC11228 possui pequena similaridade com a proteína glutaminil-tRNA sintetase de *Plasmodium* spp. (CARLTON *et al.*, 2002). Por fim, LIC12558 apresenta homologia apenas com proteínas de membrana ou lipoproteínas hipotéticas de outros microorganismos como *Flavobacterium* spp.

4.9 Metabolismo de proteínas

Dentre as classes funcionais identificadas, pôde-se observar uma grande representação das proteínas de metabolismo protéico (chaperonas, tradução, modificação e degradação protéica). Foram identificadas 15 proteínas dessa classe funcional. As chaperonas são proteínas de papel fundamental na manutenção da homeostase da célula, sendo essenciais no enovelamento protéico e na resposta à mudança de temperatura, osmolaridade e outros estresses ambientais (STAMM *et al.*, 1991). Algumas chaperonas são ditas como responsáveis pela proteção do patógeno em meio ao ambiente hostil do hospedeiro como, por exemplo, as chaperonas Hsps, GroEL e DnaK, que são de importância na imunologia e patogênese de diversas infecções de bactérias espiroquetas (STAMM *et al.*, 1991).

Foram identificadas, por exemplo, as conhecidas chaperonas DnaK (LIC10524), GroEL (LIC11335), Hsp10/GroES (LIC11336), Hsp15 (LIC12211) e Hsp90 (LIC20044) (NASCIMENTO *et al.*, 2004a, b) (Tabela 8). Essas proteínas foram encontradas sendo expressas tanto em bactérias virulentas quanto em não-virulentas. Já LIC11416, LIC11417 e LIC11731 foram identificadas somente nos géis de bactérias originárias de culturas virulentas (Tabela 8). As chaperonas LIC11416 e LIC11731 são da classe das *FK506-binding proteins* (FKBPs) com atividade peptidil-prolil cis-trans isomerase – da classe das imunofilinas – que têm um papel vital no enovelamento de proteínas (BELL *et al.*, 2006). As imunofilinas estão presentes em muitas bactérias e parasitas patogênicos, e há evidências de que

algumas estejam envolvidas na patogênese de infecções causadas por microorganismos (HACKER e FISHER, 1993; BELL *et al.*, 2006). Esse é um dado interessante, pois pode sugerir a participação dessas proteínas na patogênese das leptospiros.

Já a proteína LIC11417 (ClpP) é uma subunidade proteolítica da protease caseinolítica (Clp). Esse complexo proteolítico é altamente conservado em bactérias e cliva peptídeos em um processo dependente de hidrólise de ATP. É importante na degradação de proteínas instáveis, desnecessárias ou com erros de enovelamento, e é essencial em reações proteolíticas principalmente sob condições de estresse (YU e HOURLY, 2007). Recentemente, tornou-se aparente que muitos patógenos requerem proteases ATP-dependentes para causarem doenças, ajudando as bactérias a sobreviverem no hospedeiro. Em alguns casos, as proteases têm como função remover proteínas desnaturadas ou danificadas no hospedeiro para prevenir sua toxicidade às bactérias, e em outros é sabido que as proteases degradam fatores de transcrição que regulam a expressão de genes relacionados à virulência (BUTLER *et al.*, 2006). Assim, a identificação da proteína LIC11417 em leptospiros virulentos pode sugerir seu envolvimento nos processos de regulação de virulência e manutenção da homeostase bacteriana no ambiente hostil do hospedeiro.

4.10 Comparação com dados da literatura

Cullen e colaboradores (2005) realizaram a identificação de proteínas de membrana expostas na superfície celular de *Leptospira* spp. (*Surfaceome*) utilizando técnicas de biotinylation seguida por eletroforese bidimensional e identificação através de espectrometria de massas. O grupo foi capaz de identificar através dessa técnica 7 proteínas expostas na superfície das leptospiros: GroEL (LIC11335), Q8F8Q0 (LIC13050), LipL41 (LIC12966), FlaB1 (LIC11890), LipL32 (LIC11352), LipL45 (LIC11643) e LipL21 (LIC10011). As proteínas identificadas por Cullen e colaboradores (2005) são no geral proteínas conhecidamente abundantes em leptospiros. Das proteínas detectadas no *Surfaceome*, todas foram identificadas no projeto aqui apresentado e,

interessantemente, com exceção da LipL21 (LIC10011), apresentaram-se em múltiplos *spots* (Tabela 8). Todas as proteínas foram identificadas tanto nas amostras virulentas quanto nas não-virulentas, não sendo verificada uma expressão diferencial.

No entanto, adicionalmente, foram identificadas no presente trabalho, por exemplo, as proteínas preditas de superfície LIC10314, OmpL1 (LIC10973), LipL71 (LIC11003), LIC11228, LIC11569, LipL46 (LIC11885), LIC12015 e LIC12898, que não foram identificadas por Cullen e colaboradores (2005). Dessas, apenas a LipL71 foi identificada tanto na condição de virulência quanto na de não-virulência, enquanto que as demais foram identificadas apenas em bactérias virulentas, sugerindo a expressão diferencial nessa condição. Como as leptospiros utilizadas por Cullen e colaboradores (2005) não eram uma cepa virulenta, e as proteínas de superfície que foram identificadas na abordagem aqui apresentada e não pelo referido grupo foram identificadas somente em condições de virulência, há a sugestão de que a expressão dessas proteínas possivelmente seja regulada em função da virulência. No entanto, há a possibilidade de que sejam proteínas muito pouco abundantes ou que não tenham resíduos de lisina expostos para a biotinylation, o que teria comprometido a identificação no trabalho de Cullen e colaboradores (2005). Portanto, apesar dos dados apontarem para uma expressão diferencial dessas proteínas, outros estudos são necessários para confirmar essa possibilidade.

Nally e colaboradores (2005) isolaram vesículas de membrana externa de um isolado clínico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Conseguiram identificar 33 proteínas diferentes, incluindo 14 proteínas desconhecidas ou anotadas como hipotéticas. Identificaram também algumas proteínas já caracterizadas e 4 proteínas de flagelo.

No presente trabalho foram identificadas 19 das 32 proteínas apresentadas por Nally e colaboradores (2005). Das previamente já caracterizadas (OmpL1, Qlp42, LipL32, LipL41, LipL36 e Loa22), apenas não foi identificada a LipL36 (LIC13060). Como previamente citado, foram identificadas 34 proteínas

hipotéticas, 6 das quais já haviam sido identificadas por Nally e colaboradores (2005) – LIC10672, LIC11848, LIC10411, LIC13123, LIC13166 e LIC13050. Como Nally e colaboradores (2005) utilizaram bactérias virulentas obtidas de isolado clínico, os dados aqui apresentados são concordantes, já que as proteínas identificadas em comum com este trabalho foram observadas expressas somente na condição de virulência ou nas duas condições analisadas (virulência e não-virulência).

Dados mais recentes de Nally e colaboradores (2007) mostram a caracterização do proteoma da membrana externa de *L. interrogans* durante a infecção. O grupo identificou 21 proteínas de membrana externa de leptospiros cultivadas *in vitro*. Entre essas, apenas 4 foram identificadas como não sendo expressas em leptospiros retiradas de fígado de porquinhos-da-índia infectados: LipL45 (LIC11643), LIC10009, LipL46 (LIC11885) e LIC20035.

Das 21 proteínas identificadas por Nally e colaboradores (2007), neste trabalho foram identificadas 9 proteínas, sendo: LipL21 (LIC10011), OmpL1 (LIC10973), LipL71 (LIC11003), LipL32 (LIC11352), LipL31 (LIC11456), FlaB1 (LIC11531), LipL45 (LIC11643), LipL46 (LIC11885), LipL41 (LIC12966). No entanto, as proteínas OmpL1 (LIC10973), LipL31 (LIC11456) e LipL46 (LIC11885), que no trabalho do referido grupo foram identificadas em bactérias cultivadas *in vitro*, não foram identificadas em bactérias não-virulentas atenuadas em cultura nos dados aqui apresentados; as proteínas LipL45 e LipL46 foram identificadas em bactérias virulentas, enquanto que Nally e colaboradores (2007) apenas as identificaram em bactérias não-virulentas.

Para verificar os dados de expressão aqui obtidos com as proteínas LipL46 (LIC11885) e OmpL1 (LIC11973), foram realizados ensaios de amplificação por PCR dos cDNAs das cepas virulenta e não-virulenta de *L. interrogans* sorovar Pomona, o que comprovou a presença de RNAm dessas proteínas nas duas condições amostrais (Figura 9), dando suporte de que haja expressão ao nível protéico. No entanto, a OmpL1 apresentou um nível de amplificação menor na condição virulenta, o que pode explicar a causa de não ter sido detectada nas

amostras virulentas utilizadas por Nally e colaboradores (2007) Adicionalmente, pelo mesmo ensaio de amplificação por PCR, a proteína LIC11003, que foi identificada por técnicas proteômicas em ambos os trabalhos nas duas condições, teve sua transcrição confirmada nas cepas virulenta e não-virulenta (Figura 9).

Talvez essa discordância nos dados de expressão seja devido a deficiências nas metodologias de detecção e identificação, diferenças de expressão entre os sorovares utilizados, diferentes condições de virulência e/ou cultivo, ou expressão transiente dessas proteínas.

Sakolvaree e colaboradores (2007) realizaram um estudo imunoproteômico de duas cepas de leptospira, *L. interrogans* sorovar Copenhageni e *L. borgpetersenii* sorovar Tarassovi, ao testar a reatividade dos extratos protéicos totais contra soros imunes de camundongos imunizados com homogenatos de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Através dessa abordagem identificaram 38 proteínas reativas, sendo que algumas são comuns aos dois sorovares analisados.

Das 38 proteínas identificadas como imunorreativas por Sakolvaree e colaboradores (2007), neste trabalho foram identificadas 21. Entre elas, destacam-se as lipoproteínas LipL32 (LIC11352), LipL41 (LIC12966), LipL45 (LIC11643) e OmpL1 (LIC10973), e a chaperona GroEL (LIC11335) que, com exceção de OmpL1 (LIC10973), identificada apenas em amostras virulentas, foram identificadas tanto nas amostras virulentas quanto nas não-virulentas. Além dessas, foram identificadas 3 das proteínas hipotéticas reportadas pelo referido grupo: LIC10483, LIC13123 e LIC13166, sendo identificadas presentes em ambas as condições analisadas.

Considerando que proteínas expostas na superfície entram em contato direto com o hospedeiro e, portanto, são capazes de induzir reações imunológicas, Yang e colaboradores (2006) realizaram a busca de genes candidatos vacinais através de ferramentas bioinformáticas e hibridização genômica comparativa. Identificaram 226 genes que são conservados nos genomas de *L. interrogans* sorovares Lai e Copenhageni seqüenciados (REN *et al.*, 2003; NASCIMENTO *et al.*, 2004a), e que codificam proteínas potencialmente expostas na superfície. Os

genes apresentaram altos níveis transcripcionais *in vitro*, e são conservados em 10 sorovares epidêmicos na China.

Dos 226 genes ressaltados por Yang e colaboradores (2006), foram identificados 11 neste trabalho: LipL21(LIC10011), Loa22 (LIC10191), LIC10314, LIC11261, LipL32 (LIC11352), LipL45 (LIC11643), LipL46 (LIC11885), LIC12333, LIC12515, LipL41 (LIC12966) e LIC13050. Dessas, as proteínas LIC10314, LIC12333 e LIC13050 estão anotadas como hipotéticas. Em sua maioria, foram identificadas tanto nas amostras virulentas quanto nas não-virulentas, com exceção das LIC10314, LIC11261, LipL46 e LIC12515 que foram identificadas apenas nas condições de virulência.

4.11 Proteínas selecionadas para clonagem e expressão

Dado o interesse do grupo de pesquisa em que este trabalho se insere, na linha de pesquisa de proteínas de membrana e lipoproteínas para o desenvolvimento de métodos diagnósticos ou elaboração de vacina contra a leptospirose mais eficientes, foram selecionadas algumas das proteínas identificadas para a clonagem e subsequente expressão e purificação. As proteínas foram selecionadas com base na identificação de expressão em bactérias virulentas, predição bioinformática de sua localização celular em membrana e presença de sítio de lipidação. São elas: LIC10314, LIC10672, LIC11003 e LIC11228.

As quatro proteínas selecionadas estão presentes no sorovar Copenhageni (NASCIMENTO *et al.*, 2004a), cujo banco de dados genômico serviu para a identificação das proteínas após espectrometria de massas. As proteínas selecionadas possuem homólogos gênicos nos outros dois genomas seqüenciados de leptospiros patogênicas, *L. interrogans* sorovar Lai (REN *et al.*, 2003) e *L. borgpeterseni* sorovar Hardjo-Bovis (BULACH *et al.*, 2006). Ainda, LIC10314, LIC11003 e LIC11228 têm homólogos gênicos identificados na espécie saprofítica seqüenciada *L. biflexa* sorovar Patoc (PICARDEAU *et al.*, 2008) (Tabela 11). No entanto, apesar das seqüências gênicas presentes, a similaridade com as seqüências

de *L. biflexa* é baixa, sendo em torno de 40%, podendo indicar função diferente. A proteína LIC10672 não possui homólogo na espécie saprofítica (Tabela 11), o que pode sugerir função na patogenicidade.

Tabela 11: Genes codificantes das proteínas selecionadas para clonagem (sorovar Copenhageni), e homólogos gênicos nas outras cepas de *Leptospira* seqüenciadas. Entre parêntesis, estão as porcentagens de identidade obtidas por BLAST entre as proteínas de *L. interrogans* sorovar Copenhageni e os homólogos gênicos nas demais cepas.

Nome do gene (sorovar Copenhageni)	Nº de pares de bases (pb)	Homólogo gênico sorovar Lai	Homólogo gênico <i>L. borgpetersenii</i>	Homólogo gênico <i>L. biflexa</i>
LIC10314	1674	LA0365 (98%)	LBL_0319 e LBJ_2752 (87%)	LBF_I2365 (39%)
LIC10672	690	LA3522 (100%)	LBL_2387 e LBJ_0692 (95%)	-
LIC11003	1668	LA3097 (99%)	LBL_2242 e LBJ_0840 (84%)	LBF_2260 (38%)
LIC11228	1470	LA2796 (99%)	LBL_1054 e LBJ_1996 (79%)	LBF_3184 (40%)

A proteína LIC10314 está anotada como hipotética, por análise bioinformática está provavelmente inserida na superfície da membrana externa das leptospiros, e apresenta homólogos gênicos em bactérias espiroquetas do gênero *Treponema* (proteína TDE2699 em *T. denticola*, e TP0486 em *T. pallidum*). Por análises de BLAST, possui domínio conservado de uma família de proteínas antigênicas (p83/p100 ou p93) identificado em diversas espécies das espiroquetas *Borrelia* spp. (FRASER *et al.*, 1997; MARCHLER-BAUER *et al.*, 2004), e também presente em *Treponema* spp. Essa família de proteínas provavelmente tem papel na virulência de *Borrelia* spp., tendo função na evasão imune e mimetizando características celulares de eucariotos (ROSSLER *et al.*, 1995).

LIC10672 é uma proteína hipotética, provavelmente localizada na membrana celular, com função desconhecida e sem domínios conservados ou semelhança significativa com proteínas já caracterizadas.

LIC11003 recebe o nome de LipL71, uma predita lipoproteína de membrana externa de leptospiros. Contém o domínio conservado em bactérias,

LysM, de função desconhecida. Apresenta similaridade de cerca de 40% com proteínas de membrana externa de *Treponema* spp., sem função determinada.

Por fim, a proteína LIC11228 está anotada como hipotética, e tem predição bioinformática de localização na membrana externa. Não possui função conhecida ou semelhança significativa com nenhuma proteína caracterizada.

4.12 Amplificação das proteínas selecionadas para clonagem

Os oligonucleotídeos sintéticos para a amplificação dos genes foram desenhados de maneira a excluir os peptídeos sinais de exportação à membrana e lipidação das seqüências das pró-proteínas nativas (Anexo D). Os peptídeos sinais sofrem clivagem durante o processo de secreção à membrana através do complexo transmembrânico Sec, e adição da porção de ácidos graxos após a cisteína N-terminal da pró-proteína clivada pela enzima sinal peptidase II, no caso de lipoproteínas (HAAKE, 2002). Além de serem clivadas nas proteínas nativas, essas regiões são bastante hidrofóbicas, o que pode dificultar a expressão em sistemas procariotos baseados em *E. coli*.

Os tamanhos esperados dos genes amplificados por PCR a partir de DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Copenhageni utilizando-se os oligonucleotídeos desenhados são: 1665 pb para LIC10314, 609 pb para LIC10672, 1619 pb para LIC11003 e 1404 pb para LIC11228. Conforme mostrado na Figura 10, a amplificação resultou em bandas de DNA únicas e com o tamanho esperado para os quatro genes após eletroforese em gel de agarose 1%.

Figura 10. Amplificação por PCR dos genes selecionados para clonagem. **A:** LIC10314 (1665 pb) e LIC10672 (609 pb). **B:** LIC11228 (1404 pb) e LIC11003 (1619 pb). Gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo. M – padrão de peso molecular.

4.13 Clonagem dos genes amplificados no vetor pGEM-T-Easy

Os genes amplificados por PCR e purificados a partir de gel de agarose foram clonados no vetor pGEM-T-Easy. Esse vetor apresenta timinas livres nas terminações 3' que, durante a reação de ligação, se combinam com as adeninas livres nas extremidades dos produtos resultantes da amplificação por PCR utilizando-se a enzima *Taq* Polimerase.

As construções recombinantes foram transformadas em bactérias competentes *E. coli* da linhagem DH5 α e, após, foi feita a extração plasmidial de algumas colônias positivas selecionadas pelo método da atividade de β -galactosidade. Os plasmídeos foram submetidos à digestão enzimática com as enzimas apropriadas (*Bam*HI e *Kpn*I) para a liberação e conferência da presença dos insertos. Os insertos correspondentes aos genes codificantes das proteínas de interesse apresentaram os tamanhos esperados após a eletroforese em gel de agarose 1% (dado não mostrado).

4.14 Clonagem em vetor de expressão pAE

O vetor de expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* utilizado, pAE (RAMOS *et al.*, 2004), possui uma região que codifica uma sequência de seis resíduos de histidina posicionados na região amino-terminal do inserto da proteína a ser expressa. Essa sequência possibilita a rápida purificação em pequena e média escala das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade a metal, na qual as proteínas ligam-se fortemente ao níquel associado à resina de purificação pelos anéis imidazólicos formados pela sequência de histidinas. Após, as proteínas podem ser eluídas com alta concentração de imidazol, que, por possuir anéis imidazólicos, compete com o sítio de ligação dos anéis formados pelas histidinas das proteínas recombinantes com o níquel.

Para a clonagem, o vetor pAE foi digerido com as mesmas enzimas de restrição que os fragmentos gênicos de interesse, e, após, foi realizada a reação de ligação seguida de transformação em bactérias competentes *E. coli* DH5 α , para a obtenção em maior escala do plasmídeo contendo os insertos. Por seleção através do antimicrobiano ampicilina, selecionou-se clones positivos que foram submetidos à extração plasmidial e digestão enzimática para confirmação da presença dos insertos no tamanho esperado. Através da análise de restrição em gel de agarose, foi possível observar os insertos e o vetor pAE vazio linearizado com os tamanhos esperados (Figura 11).

4.15 Seqüenciamento

As construções pAE-LIC10314, pAE-LIC10672, pAE-LIC11003 e pAE-LIC11228, após análise de restrição da presença dos insertos, foram submetidas a seqüenciamento para verificar a construção correta dos clones. Observou-se que ambos os genes estavam em fase correta de leitura, com os códons de iniciação e terminação intactos e sem nenhuma mutação comprometendo as características primárias das proteínas nativas. Ainda, foi possível verificar as seqüências codificadoras dos resíduos de histidina na região 5' dos insertos clonados no vetor pAE (Anexo E).

Figura 11. Digestão enzimática das construções dos genes de interesse clonados no vetor de expressão pAE. Enzimas *Bam*HI e *Kpn*I. Insertos liberados: LIC10314 – 1665 pb, LIC10672 – 609 pb, LIC11228 – 1404 pb e LIC11003 – 1619 pb. Gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo. M – padrão de peso molecular; pAE – vetor de expressão (3442 pb).

4.16 Expressão e análise de solubilidade das proteínas recombinantes

As construções das seqüências das proteínas clonadas no vetor de expressão pAE foram transformadas em bactérias competentes *E. coli* cepa BL21-SI. Essa cepa possui o promotor *proU* induzível por sal, que possibilita a indução da expressão das proteínas recombinantes por adição de NaCl às culturas transformadas.

As culturas em meio líquido foram feitas em meio 2YT-ON, utilizando-se ampicilina como antibiótico. Quando as culturas atingiram a fase exponencial de crescimento, foram adicionados 300 mM NaCl como indutor da expressão das proteínas recombinantes. Para cada cultura foi separada uma alíquota controle antes da indução.

Após indução da expressão, as bactérias foram lisadas por sonicação e as frações solúveis e insolúveis separadas por centrifugação. Foram realizadas análises em gel de SDS-PAGE para avaliar a expressão das proteínas

recombinantes comparando-se frações induzidas e não-induzidas, bem como a solubilidade das proteínas recombinantes expressas.

As proteínas rLIC10314 e rLIC10672 foram expressas nos tamanhos esperados de, respectivamente, 63 e 23 KDa. rLIC10314 foi expressa em forma solúvel (Figura 12A), enquanto rLIC10672 foi expressa minoritariamente na forma solúvel, mas principalmente na forma insolúvel de corpúsculo de inclusão (Figura 12B). O acúmulo de proteínas em forma de corpúsculo de inclusão é uma característica importante do sistema de expressão em *E. coli*, embora os fatores que contribuem para sua formação não estejam completamente entendidos. Evidências indiretas sugerem que altas concentrações de proteínas produzidas por promotores fortes levariam ao acúmulo de cadeias polipeptídicas nascentes com conformação não nativa, favorecendo a sua agregação e, portanto, a formação de corpúsculos (MARSTON, 1986). Em forma de corpúsculos de inclusão, as proteínas recombinantes ficam protegidas de proteases; mas, apesar disso, a solubilização desses corpúsculos é realizada na presença de agentes desnaturantes e, muitas vezes, nesse processo há grande perda da proteína de interesse.

As proteínas rLIC11003 e rLIC11228, de tamanho esperado de, respectivamente, 59 e 52 KDa, não foram expressas com sucesso no modelo utilizado (*E. coli* BL21-SI), sendo que não se observou por SDS-PAGE bandas diferenciadas próximas aos tamanhos esperados em nenhuma das frações, solúvel ou insolúvel (Figura 13). Em uma segunda tentativa de se obter a expressão das proteínas rLIC11003 e rLIC11228, as construções no vetor pAE foram transformadas em bactérias competentes da cepa *E. coli* BL21(C43)-DE3 (MIROUX e WALKER, 1996; ARECHAGA *et al.*, 2003). Essa cepa caracteriza-se por conter uma mutação que, mesmo que ainda desconhecida, deve afetar a atividade da enzima RNA Polimerase, reduzindo a quantidade de RNA na célula. Também exibe uma proporção maior de membrana celular em relação ao conteúdo citoplasmático, proporcionando a expressão das proteínas recombinantes na membrana, sem que haja um colapso da membrana celular ou interferência letal no metabolismo geral da bactéria. No entanto, não foi possível a indução da expressão dessas proteínas (dado não mostrado).

Figura 12. Análise de expressão e solubilidade das proteínas rLIC10314 (A) e rLIC10672 (B) por SDS-PAGE 12%. **NI**- BL21-SI transformada não-induzida; **LT**- lisado bacteriano total após indução; **S**- fração solúvel do lisado bacteriano total induzido; **In**- fração insolúvel do lisado bacteriano induzido solubilizado em 8M uréia; **M**- marcador de peso molecular.

Figura 13. Análise de expressão e solubilidade das proteínas rLIC11003 e rLIC11228 por SDS-PAGE 12%. **M**- marcador de peso molecular; **NI**- BL21-SI não-transformada e não-induzida; **S**- fração solúvel do lisado bacteriano total induzido; **In**- fração insolúvel do lisado bacteriano total induzido solubilizada em 8M uréia.

4.17 Purificação das proteínas rLIC10314 e rLIC10672

Visto que a proteína rLIC10314 foi expressa na forma solúvel (Figura 12A), foi utilizada essa fração para a purificação por cromatografia de afinidade a níquel. Já rLIC10672, apesar de ter sido expressa majoritariamente na forma insolúvel (Figura 12B), também foi purificada a partir da fração solúvel, pois não requer uso de agente desnaturante para a solubilização, a proteína encontra-se na sua conformação nativa e o processo de purificação é mais simples.

A coluna cromatográfica previamente equilibrada com níquel foi carregada com as soluções contendo as proteínas recombinantes expressas. Foram realizadas lavagens com baixa concentração de imidazol (5 a 40 mM) para a retirada de proteínas contaminantes de *E. coli*. Durante as lavagens da purificação da rLIC10314, ocorreu perda parcial da proteína recombinante na fração de 5 mM imidazol, possivelmente correspondendo a proteínas que não se ligaram fortemente ao níquel através dos anéis imidazólicos (Figura 14A). No processo de purificação da proteína rLIC10672, houve perdas em todas as lavagens com baixa concentração de imidazol (5 mM, 20 mM e 40 mM), indicando uma baixa afinidade da proteína heteróloga com a resina carregada com níquel (Figura 14B).

As eluições das proteínas de interesse das colunas de Sepharose carregadas com níquel foram feitas com alta concentração (1 M) do agente competidor imidazol e, por análise em gel de SDS-PAGE, pôde-se observar que as proteínas recombinantes eluídas representaram bandas majoritárias, apesar da presença de proteínas contaminantes (Figura 15).

Figura 14. Análise do processo de purificação das proteínas recombinantes rLIC10314 e rLIC10672 em SDS-PAGE 12%. **(A)** rLIC10314. **M**- marcador de massa molecular; **S**- sobrenadante da cultura induzida; **EC**- solução de carregamento da coluna cromatográfica; **SC**- *flow through* da coluna cromatográfica; **5**- lavagem com 5 mM imidazol; **20**- lavagem com 20 mM imidazol; **40**- lavagem com 40 mM imidazol; **e1 a e9**- frações de eluição com 1 M imidazol. **(B)** rLIC10672. **M**- marcador de massa molecular; **EC**- solução de carregamento da coluna cromatográfica; **SC**- *flow through* da coluna cromatográfica; **5**- lavagem com 5 mM imidazol; **20**- lavagem com 20 mM imidazol; **40**- lavagem com 40 mM imidazol; **e1 a e11**- frações de eluição com 1 M imidazol.

Figura 15. Análise, por gel de SDS-PAGE 12%, das proteínas rLIC10314 e rLIC10672 purificadas por cromatografia de afinidade a níquel. **M**- marcador de massa molecular.

4.18 Análise da reatividade de rLIC10314 e rLIC10672 com soros de pacientes diagnosticados com leptospirose

Foram realizados testes de reatividade das proteínas recombinantes purificadas com soros de indivíduos diagnosticados com leptospirose para avaliar o potencial imunorreativo das mesmas. Foram utilizados *pools* de soros de 8 pacientes na fase inicial da doença, quando o teste MAT resultou em negativo, e na fase convalescente do mesmo paciente, quando o teste MAT diagnosticou positivamente a doença (Tabela 5). Como controle negativo do experimento foi utilizado um *pool* de soros de 6 indivíduos normais, que relataram nunca terem sido diagnosticados com a doença. Como controle positivo, foi utilizada a proteína recombinante purificada LipL32, que é uma abundante lipoproteína de *L. interrogans*, muito imunogênica e altamente conservada entre os sorovares patogênicos (DEY *et al.*, 2004; HAAKE *et al.*, 2004). Além disso, segundo dados da literatura, LipL32 reage preferencialmente com soros de pacientes na fase convalescente da leptospirose (FLANNERY *et al.*, 2001), geralmente não apresentando reatividade com soros MAT negativos.

Pelos ensaios de *Western Blotting*, como esperado, a proteína LipL32 reagiu com o *pool* de soros obtidos dos pacientes na fase convalescente da doença, MAT positivo, enquanto não exibiu reatividade com os soros MAT negativos, da fase inicial da doença (Figura 16). Verificou-se que as proteínas recombinantes em estudo, rLIC10314 e rLIC10672, não apresentaram reatividade com os soros de pacientes diagnosticados com leptospirose utilizados – tanto na fase inicial, quanto na fase convalescente (Figura 16).

Figura 16. Análise por *Western Blotting* da reatividade das proteínas recombinantes rLIC10314 e rLIC10672 com soros de pacientes diagnosticados com leptospirose. **(A)** Membranas de nitrocelulose coradas com Ponceau S após eletrotransferência de gel de SDS-PAGE 12%. **(B)** Filmes de raio-X revelados após exposição às reações quimioluminescentes por ECL. **Normal:** *pool* de soros de 6 indivíduos saudáveis; **MAT-:** *pool* de soros de 8 pacientes na fase inicial da leptospirose; **MAT+:** *pool* de soros de 8 pacientes na fase convalescente da leptospirose; **LipL32:** controle positivo para a reação com soro MAT+; **M:** marcador de massa molecular.

Já que LIC10314 e LIC10672 são preditas proteínas de membrana (Anexo C), estando assim em contato direto com as células do hospedeiro, e serem expressas em bactérias virulentas, o fato de não terem apresentado reatividade com o *pool* de soros de pacientes com leptospirose sugere que essas proteínas talvez possuam algum mecanismo de “burlar” o sistema imune, que acaba não produzindo anticorpos contra esses antígenos. Como previamente citado, a proteína LIC10314, por análises de domínios conservados e homologia com

outras proteínas caracterizadas, possui um domínio conservado de uma família de proteínas antigênicas de *Borrelia* spp. (p83/p100). A literatura relata que essa família de proteínas provavelmente tem função na evasão imune, mimetizando características celulares de eucariotos (ROSSLER *et al.*, 1995), o que suporta os dados negativos obtidos para a reatividade com soros de pacientes.

Outra possibilidade seria que apesar de terem sido identificadas em extrato de cultura de leptospiros virulentos *in vitro*, a expressão dessas proteínas pode ser bastante transiente durante a infecção *in vivo*, não havendo tempo para a produção de anticorpos.

4.19 Avaliação da capacidade de adesão de rLIC10314 e rLIC10672 a componentes de matriz extracelular

Nos últimos anos vem sendo bastante documentado que a interação de patógenos com componentes de matriz extracelular pode desempenhar um papel inicial importante na colonização dos tecidos do hospedeiro. A aderência aos tecidos é mediada por proteínas expostas na superfície expressas pelos microorganismos durante a infecção.

Entre o grupo das espiroquetas, várias proteínas com características de adesinas já foram reportadas. Por exemplo, em *Borrelia* spp. foram caracterizadas as proteínas BBK32, que se liga à fibronectina (PROBERT *et al.*, 1998; PROBERT *et al.*, 2001) e duas lipoproteínas (DbpA e DpbB) que se associam a fibras de colágeno (BROWN *et al.*, 1999; GUO *et al.*, 1998). Em *Treponema pallidum*, as proteínas Tp0155 e Tp0483 mostram ligação à fibronectina (CAMERON *et al.*, 2004), e Tp0751 liga-se a várias isoformas de laminina (CAMERON, 2003; CAMERON *et al.*, 2005).

Em leptospiros, no laboratório de pesquisa em que foi realizado este trabalho, foram descritas duas lipoproteínas que têm função de adesão: Lsa24, primeira proteína de leptospiros reportada que se liga a laminina (BARBOSA *et al.*, 2006) e Lsa21, que interage com laminina, fibronectina plasmática e colágeno IV, e é expressa principalmente em condições de virulência (ATZINGEN *et al.*, 2008). Além dessas, também já foram demonstradas capacidade de adesão a matriz

extracelular das proteínas LigA e LigB (CHOY *et al.*, 2007), e da lipoproteína LipL32 (HAUK *et al.*, 2008).

Como LIC10314 e LIC10672, identificadas neste trabalho proteômico sendo expressas nas condições de virulência, são proteínas preditas expostas na superfície de leptospiros (Anexo C), seguiu-se para a investigação de possíveis capacidades de adesão das proteínas recombinantes purificadas a laminina e fibronectina da matriz extracelular, por ensaio de *Western Blotting*. Como controle positivo do experimento de ligação a laminina foi utilizada a proteína Lsa24 (BARBOSA *et al.*, 2006). Conforme mostrado na Figura 17A, a proteína purificada rLIC10314 mostrou ligação à laminina em intensidade semelhante ao controle positivo, Lsa24, mas não à fibronectina (Figura 17B). A proteína rLIC10672 não exibiu interação a nenhum dos dois componentes investigados (Figura 17).

Os dados obtidos sugerem que a proteína codificada pelo gene LIC10314 pode ter função na adesão celular das leptospiros a laminina, podendo participar na interação inicial do patógeno com as células eucarióticas durante a instalação da infecção e disseminação nos tecidos do hospedeiro. Porém, faz-se necessária a caracterização desta ligação.

Figura 17. Análise por *Western Blotting* da ligação das proteínas recombinantes rLIC10314 e rLIC10672 componentes de matriz extracelular. **A-** laminina; **B-** fibronectina plasmática. Quadro superior: membranas de nitrocelulose coradas com Ponceau S após eletrotransferência de gel de SDS-PAGE 12%. Quadro inferior: filmes de raio-X revelados após exposição às reações quimioluminescentes por ECL. **Lsa24** – controle positivo de interação com laminina; **M** – marcador de massa molecular. As setas indicam as bandas positivas de rLIC10314 e Lsa24 na ligação a laminina.

5 CONCLUSÃO

Tendo como objetivo central a realização de um amplo *screening* proteômico de extratos protéicos totais de *L. interrogans* virulentas e não-virulentas, neste trabalho foram identificadas 134 proteínas diferentes de leptospira, compreendendo todas as grandes classes funcionais e compartimentos celulares dessas bactérias. Algumas proteínas foram identificadas somente nas condições de virulência; mas, apesar da sugestão de expressão diferencial, devido à limitação da técnica de gel 2D, fazem-se necessários experimentos adicionais mais direcionados para investigar cada uma dessas proteínas. Além disso, em leptospirose foi demonstrado recentemente que a proteína Loa22 (LIC10191), que foi identificada expressa tanto na condição de virulência quanto avirulenta neste projeto, é essencial para a infecção (RISTOW *et al.*, 2007). Dessa forma, não somente as proteínas diferencialmente expressas, como também as proteínas identificadas nas duas condições analisadas podem ter papéis fundamentais no estabelecimento da leptospirose.

São de particular interesse as proteínas que foram identificadas expressas nas amostras virulentas pertencentes às classes de proteínas de membrana, lipoproteínas e metabolismo protéico. Essas proteínas podem ter funções de adesão, regulação e manutenção da homeostase celular durante a entrada nos hospedeiros. Ainda, a identificação de proteínas em bactérias virulentas que tenham ligação com a virulência em outros microorganismos pode ajudar no esclarecimento da patogenicidade das leptospirose.

Outro dado bastante importante é a identificação de 42 proteínas hipotéticas, pois, além de confirmar a expressão dessas proteínas *in vivo*, essa classe pode constituir um reservatório de proteínas desconhecidas que podem ter função na virulência das leptospirose.

A partir de análises bioinformáticas, foram selecionadas quatro proteínas para a amplificação e clonagem, das quais se atingiu com sucesso a expressão de rLIC10314 e rLIC10672. As duas proteínas recombinantes purificadas, apesar de serem expressas *in vitro* em bactérias virulentas, não foram reconhecidas por soros

de pacientes diagnosticados com leptospirose, sugerindo que talvez tenham algum mecanismo capaz de “burlar” o sistema imunológico dos hospedeiros, podendo ser importantes fatores de virulência. Adicionalmente, os dados de capacidade de adesão aos componentes de matriz extracelular indicam que a proteína rLIC10314 é uma provável adesina.

Baseando-se nos dados gerados por este trabalho, é possível afirmar que os resultados apresentados são de grande contribuição para a compreensão da biologia e patogenicidade das leptospirosas. Com a identificação de proteínas expressas em condições de virulência e infecção de animais modelo, abre-se caminho para a investigação de características e funções individuais de várias proteínas que podem ter papel na virulência e processo infeccioso dessa importante zoonose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, p. 198-207, 2003.

AHMAD, S.N.; SHAH, S.; H. AHMAF, F.M. Laboratory diagnosis of leptospirosis. **J. Postgrad. Med.**, v. 51, p. 195-200, 2005.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAEFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapper BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ALVES, C.J. **Influência de fatores ambientais sobre a proporção de caprinos soro-reatores para leptospirose em cinco centros de criação do Estado da Paraíba, Brasil.** Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 1995.

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

BAAR, C.; EPPINGER, M.; RADDATZ, G.; SIMON, J.; LANZ, C.; KLIMMEK, O.; NANDAKUMAR, R.; GROSS, R.; ROSINUS, A.; KELLER, H.; JAGTAP, P.; LINKE, B.; MEYER, F.; LEDERER, H.; SCHUSTER, S.C. Complete genome sequence and analysis of *Wolinella succinogenes*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, n. 20, p. 11690-11695, 2003.

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

BELL, A.; MONAGHAN, P.; PAGE, A.P. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases (immunophilins) and their roles in parasite biochemistry, host-parasite interaction and antiparasitic drug action. **Int. J. Parasitol.**, v. 36, p. 261-276, 2006.

BHANDARI, P.; GOWRISHANKAR, J. An *Escherichia coli* host strain useful for efficient overproduction of cloned gene products with NaCl as the inducer. **J. Bacteriol.**, v. 179, n.13, p. 4403-4406, 1997.

* De acordo com:

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

BHARADWAJ, R.; BAL, A.M.; JOSHI, S.A.; KAGAL, A.; POL, S.S.; GARAD, G.; ARJUNWADKAR, V.; KATTI, R. An urban outbreak of leptospirosis in Mumbai, India. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 55, n. 6, p. 194-196, 2002.

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

BOLIN, C.A.; ZUERNER, R.L.; TRUEBA, G. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine containing *L. interrogans* serovar Hardjo type hardjo-bovis infection on cattle. **Am. J. Vet. Res.**, v. 50, p. 2000-2008, 1989.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRADSHAW, R.A.; BURLINGAME, A.L. From proteins to proteomics. **IUBMB Life**, v. 57, n. 4/5, p. 267-272, 2005.

BROWN, E.L.; GUO, B.P.; O'NEAL, P.; HOOK, M. Adherence of *Borrelia burgdorferi*. Identification of critical lysine residues in DbpA required for decorin binding. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 26272-26278, 1999.

BULACH, D.M.; ZUERNER, R.L.; WILSON, P.; SEEMAN, T.; MCGRATH, A.; CULLEN, P.A.; DAVIS, J.; JOHNSON, M.; KUCZEK, E.; ALT, D.P.; PETERSON-BURCH, B.; COPPEL, R.L.; ROOD, J.I.; DAVIES, J.K.; ADLER, B. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, n. 39, p. 14560-14565, 2006.

BUTLER, S.M.; FESTA, R.A.; PEARCE, M.J.; DARWIN, K.H. Self-compartmentalized bacterial proteases and pathogenesis. **Mol. Microbiol.**, v. 60, n. 3, p. 553-562, 2006.

CAMERON, C.E. Identification of a *Treponema pallidum* laminin-binding protein. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 2525-2533, 2003.

CAMERON, C.E.; BROUWER, N.L.; TISCH, L.M.; KUROIWA, J.M.. Defining the interaction of the *Treponema pallidum* adhesin Tp0751 with laminin. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 7485-7494, 2005.

CAMERON, C.E.; BROWN, E.L.; KUROIWA, J.M.; SCHNAPP, L.M.; BROUWER, N.L. *Treponema pallidum* fibronectin-binding proteins. **J. Bacteriol.**, v. 186, p. 7019-7022, 2004.

CAÑAS, B.; LÓPEZ-FERRER, D.; RAMOS-FERNÁNDEZ, A.; CAMAFEITA, E.; CALVO, E. Mass spectrometry technologies for proteomics. **Brief. Funct. Genomic Proteomic.**, v. 4, p. 295-320, 2006.

CARLTON, J.M.; ANGIUOLI, S.V.; SUH, B.B.; KOOIJ, T.W.; PERTEA, M.; SILVA, J.C.; ERMOLAEVA, M.D.; ALLEN, J.E.; SELENGUT, J.D.; KOO, H.L.; PETERSON, J.D.; POP, M.; KOSACK, D.S.; SHUMWAY, M.F.; BIDWELL, S.L.; SHALLOM, S.J.; VAN AKEN, S.E.; RIEDMULLER, S.B.; FELDBLYUM, T.V.; CHO, J.K.; QUACKENBUSH, J.; SEDEGAH, M.; SHOAI, A.; CUMMINGS, L.M.; FLORENS, L.; YATES, F.R. III; RAINE, J.D.; SINDEN, R.E.; HARRIS, M.A.; CUNNINGHAM, D.A.; PREISER, P.R.; BERGMAN, L.W.; VAIDYA, A.B.; VAN LIN, L.H.; JANSE, C.J.; WATERS, A.P.; SMITH, H.O.; WHITE, O.R.; SALZBERG, S.L.; VENTER, J.C.; FRASER, C.M.; HOFFMAN, S.L.; GARDNER, M.J.; CARUCCI, D.J. Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii* yoelii. **Nature**, v. 419, p. 512-519, 2002.

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

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

COMPTON, S.J.; JONES, C.G. Mechanism of dye response in interference in the Bradford protein assay. **Anal. Biochem.**, v. 151, n. 2, p. 369-374, 1985.

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

CULLEN, P.A.; HAAKE, D.A.; ADLER, B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 28, p. 291-318, 2004.

CULLEN, P.A.; HAAKE, D.A.; BULACH, D.M.; ZUERNER, R.L.; ADLER, B. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 2414-2421, 2003.

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

DEY, S.; MOHAN, C.M.; KUMAR, T.M.; RAMADASS, P.; NAINAR, A.M.; NACHIMUTHU, K. Recombinant LipL32 antigen-based single serum dilution ELISA for detection of canine leptospirosis. **Vet. Microbiol.**, v. 103, p. 99-106, 2004.

DIKKEN, H.; KMETY, E. Serological typing methods of leptospires. In: **Methods in Microbiology**. London: London Press, 1978. p. 259-307.

- FAINE, S. **Leptospira and leptospirosis**. Boca Raton, Fla: CRC Press, 1994.
- FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis**, 2nd Edition. Melbourne, Australia: MediSci, 1999.
- FAISAL, S.M.; YAN, W.; CHEN, C.S.; PALANIAPPAN, R.U.; MCDONOUGH, S.P.; CHANG, Y.F. Evaluation of protective immunity of *Leptospira* immunoglobulin like protein A (LigA) DNA vaccine against challenge in hamsters. **Vaccine**, v. 26, n. 2, p. 277-287, 2008.
- FARR, R.W. Leptospirosis. **Clin. Infect. Dis.**, 21:1-8, 1995.
- FLANNERY, B.; COSTA, D.; CARVALHO, F.P.; GUERREIRO, H.; MATSUNAGA, J.; DA SILVA, E.D.; FERREIRA, A.G.; RILEY, L.W.; REIS, M.G.; HAAKE, D.A.; KO, A.I. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 9, p. 3303-3310, 2001.
- FONSECA, C.A.; TEIXEIRA, M.M.; ROMERO, E.C.; TENGAN, F.M.; SILVA, M.V.; SHIKANAI-YASUDA, M.A. *Leptospira* DNA detection for the diagnosis of human leptospirosis. **J. Infect.**, v. 52, n. 1, p. 15-22, 2006.
- FRASER, C.M.; CASJENS, S.; HUANG, W.M.; SUTTON, G.G.; CLAYTON, R.A.; LATHIGRA, R.; WHITE, O.; KETCHUM, K.A.; DODSON, R.; HICKEY, E.K.; GWINN, M.; DOUGHERTY, B.; TOMB, J.F.; FLEISCHMANN, R.D.; RICHARDSON, D.; PETERSON, J.; KERLAVAGE, A.R.; QUACKENBUSH, J.; SALZBERG, S.; HANSON, M.; VAN-VUGT, R.; PALMER, N.; ADAMS, M.D.; GOCAYNE, J.D.; WEIDMAN, J.; UTTERBACK, T.; WATTHEY, L.; MCDONALD, L.; ARTIACH, P.; BOWMAN, C.; GARLAND, S.; FUJII, C.; COTTON, M.D.; HORST, K.; ROBERTS, K.; HATCH, B.; SMITH, H.O.; VENTER, J.C. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. **Nature**, v. 390, p. 580-586, 1997.
- GAMBERINI, M.; GOMEZ, R.M.; ATZINGEN, M.V.; MARTINS, E.A.L.; VASCONCELLOS, S.A.; ROMERO, E.C.; LEITE, L.C.C.; HO, P.L.; NASCIMENTO, A.L.T.O. Whole-Genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 244, n. 2, p. 305-13, 2005.
- GUO, B.P.; BROWN, E.L.; DORWARD, D.W.; ROSENBERG, L.C.; HOOK, M. Decorin-binding adhesins from *Borrelia burgdorferi*. **Mol. Microbiol.**, v. 30, p. 711-723, 1998.
- HAAKE, D.A. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. **Microbiology**, v. 146, p. 1491-1504, 2000.
- HAAKE, D.A. Leptospirosis, water sports, and chemoprophylaxis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 34, p. 40-43, 2002.

HAAKE, D.A.; MATSUNAGA, J. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 4936-4945, 2002.

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

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

HAAKE, D.A.; SUCHARD, M.A.; KELLEY, M.M.; DUNDOO, M.; ALT, D.P.; ZUERNER, R.L. Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. **J. Bacteriol.**, v. 186, p. 2818-2828, 2004.

HACKER, J.; FISHER, G. Immunophilins: structure-function relationship and possible role in microbial pathogenicity. (Abstract) **Mol. Microbiol.**, v. 10, n. 3, p. 445-456, 1993.

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

JUNKER, A.S.; WILLENBROCK, H.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H.; BRUNAK, S.; KROGH, A. Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. **Protein Sci.**, v. 12, n. 8, p. 1652-62, 2003.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. **Humangenetik**, v. 26, p. 231-243, 1975.

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

KOSITANONT, U.; SAETUN, P.; KRITTANAI, C.; DONGCHAWEE, G.; TRIBUDDHARAT, C.; THONGBOONKERD, V. Application of immunoproteomics to leptospirosis: towards clinical diagnostics and vaccine discovery. **Proteomics Clin. Appl.**, v. 1, p. 400-409, 2007.

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

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

LEVETT, P.N.; MOREY, R.E.; GALLOWAY, R.L.; TURNER, D.E.; STEIGERWALT, A.G.; MAYER, L.W. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. **J. Med. Microbiol.**, v. 54, p. 45-49, 2005.

LO, M.; BULACH, D.M.; POWELL, D.R.; HAAKE, D.A.; MATSUNAGA, J.; PAUSTIAN, M.L.; ZUERNER, R.L.; ADLER, B. Effects of temperature on gene expression patterns in *Leptospira interrogans* serovar Lai assessed by whole-genome analysis. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 5848-5859, 2006.

LOMAR, A.V.; DIAMENT, D.; TORRES, J.R. Leptospirosis in Latin América. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 14, n. 1, p. 23-39, 2000.

MARCHLER-BAUER, A.; ANDERSON, J.B.; DERBYSHIRE, M.K.; DEWEESE-SCOTT, C.; GONZALES, N.R.; GWADZ, M.; HAO, L.; HE, S.; HURWITZ, D.I.; JACKSON, J.D.; KE, Z.; KRYLOV, D.; LANCZYCHI, C.J.; LIEBERT, C.A.; LIU, C.; LU, F.; LU, S.; MARCHLER, G.H.; MULLOKANDOV, M.; SONG, J.S.; THANKI, N.; YAMASHITA, R.A.; YIN, J.J.; ZHANG, D.; BRYANT, S.H. CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. **Nucleic Acids Res.**, v. 35, p. 237-240, 2007.

MARQUES, M.A.M.; ESPINOSA, B.J.; SILVEIRA, E.K.X.; PESSOLANI, M.C.V.; CHAPEAUROUGE, A.; PERALES, J.; DOBOS, K.M.; BELISLE, J.T.; SPENCER, J.S.; BRENNAN, P.J. Continued proteomic analysis of *Mycobacterium leprae* subcellular fractions. **Proteomics**, v. 4, p. 2942-2953, 2004.

MARTINEZ, R.; OBREGON, A.M.; PEREZ, A.; BALLY, A.; DIAZ, M.; BARO, M.; MENENDEZ, R.; RUIZ, A.; SIERRA, G.; LOPEZ, A.U. The reactogenicity and immunogenicity of the first Cuban vaccine against human leptospirosis. (Abstract) **Rev. Cubana Med. Trop.**, v. 50, n. 2, p. 159-66, 1998.

MARTINEZ, R.; PEREZ, A.; BARO, M.; ALVAREZ, A.M.; MENENDEZ, J.; DIAZ, M.; CRUZ, R.; DE LOS REYES, G.; MONTOYA, B.; SIERRA, G.; ARMESTO DEL RIO, M.; SALTAREN, A.; SABOURNIN, O. Evaluation of the effectiveness of a new vaccine against human leptospirosis in groups at risk. (Abstract) **Rev. Panam. Salud Publica**, v. 8, n. 6, p. 385-392, 2000.

MARTINEZ, R.; PEREZ, A.; QUINONES, C.; CRUZ, R.; ALVAREZ, A.; ARMESTO, M.; FERNANDEZ, C.; MENENDEZ, J.; RODRIGUES, I.; BARO, M.; DIAZ, M.; RODRIGUES, J.; SIERRA, G.; OBREGON, A.M.; TOLEDO, M.E.; FERNANDEZ, N. Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba. (Abstract) **Rev. Panam. Salud Publica**, v. 15, n. 4, p. 249-255, 2004.

MATSUNAGA, J.; BAROCCHI, M.A.; CRODA, J.; YOUNG, T.A.; SANCHES, Y.; SIQUEIRA, I.; BOLIN, C.A.; REIS, M.G.; RILEY, L.W.; HAAKE, D.A.; KO, A.I. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Mol. Microbiol.**, v. 49, n. 4, p. 925-945, 2005.

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

MÉRIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; SAINT-GIRONS, I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, n. 9, p. 2219-2224, 1992.

MÉRIEN, F.; BARANTON, G.; PEROLAT, P. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 729-738, 1997.

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

MOREIRA, E.C. **Avaliação de métodos para erradicação de leptospiroses em bovinos leiteiros.** Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, 1994.

NALLY, J.E.; TIMONEY, J.F.; STEVENSON, B. Temperature-regulated protein synthesis by *Leptospira interrogans*. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 400-404, 2001.

NALLY, J.E.; ARTIUSHIN, S.; TIMONEY, J.F. Molecular characterization of thermoinduced immunogenic proteins Q1p42 and Hsp15 of *Leptospira interrogans*. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 7616-7624, 2001b.

NALLY, J.E.; CHANTRANUWAT, C.; WU, X.Y.; FISHBEIN, M.C.; PEREIRA, M.M.; DA SILVA, J.J.; LOVETT, M.A. Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. **Am. J. Pathol.**, v. 164, n. 3, p. 1115-27, 2004.

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

NALLY, J.E.; WHITELEGGE, J.P.; BASSILIAN, S.; BLANCO, D.R.; LOVETT, M.A. Characterization of the outer membrane proteome of *Leptospira interrogans* expressed during acute lethal infection. **Infect. Immun.**, v. 75, p. 766-773, 2007.

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

NASCIMENTO, A.L.T.O.; KO, A.I.; MARTINS, E.A.L.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; HO, P.L.; HAAKE, D.A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; HARTSKEERL, R.A.; MARQUES, V.M.; OLIVEIRA, M.C.; MENCK, C.F.M.; LEITE, L.C.C.; CARRER, H.; COUTINHO, L.L.; DEGRAVE, W.M.; DELLAGOSTIN, O.A.; EL-DORRY, H.; FERRO, E.S.; FERRO, M.I.T.; FURLAN, R.L.; GAMBERINI, M.; GIGLIOTI, E.A.; GÓES-NETO, A.; GOLDMAN, G.H.; GOLDMAN, M.H.S.; HARAKAVA, R.; JERÔNIMO, S.M.B.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.M.; KIMURA, E.T.; KURAMAE, E.E.; LEMOS, E.G.M.; LEMOS, M.V.F.; MARINO, C.L.; NUNES, L.R.; DE OLIVEIRA, R.C.; PEREIRA, G.G.; REIS, M.S.; SCHRIEFER, A.; SIQUEIRA, W.J.; SOMMER, P.; TSAI, S.M.; SIMPSON, A.J.G.; FERRO, J.A.; CAMARGO, L.E.A.; KITAJIMA, J.P.; SETUBAL, J.C.; VAN SLUYS, M.A. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 7, p. 2164-2172, 2004b.

NEVES, F.O.; ABREU, P.A.E.; VASCONCELLOS, S.A.; DE MORAIS, Z.M.; ROMERO, E.C.; NASCIMENTO, A.L.T.O. Identification of a novel potential antigen for early-phase serodiagnosis of leptospirosis. **Arch. Microbiol.**, v. 188, n. 5, p. 523-532, 2007.

NOUWENS, A.S.; CORDWELL, S.J.; LARSEN, M.L.; MOLLOY, M.P.; GILLINGS, M.; WILLCOX, M.D.; WALSH, B.J. Complementing genomics with proteomics: the membrane subproteome of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Electrophoresis**, v. 21, n. 17, p. 3797-809, 2000.

O'FARRELL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 250, p. 4007-4021, 1975.

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

PICARDEAU, M.; BULACH, D.M.; BOUCHIER, C.; ZUERNER, R.L.; ZIDANE, N.; WILSON, P.J.; CRENO, S.; KUCZEC, E.S.; BOMMEZZADRI, S.; DAVIS, J.C.; MCGRATH, A.; JOHNSON, M.J.; BOURSAUX-EUDE, C.; SEEMANN, T.; ROUV, Z.; COPPEL, R.L.; ROOD, J.I.; LAJUS, A.; DAVIES, J.K.; MÉDIGUE, C.; ADLER, B. Genome sequence of saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. **PLoS ONE**, v. 3, n. 2, p. e1607, 2008.

PIREDDU, L.; POULIN, B.; SZAFRON, D.; Lu, P.; WISHART, D. Pathway Analyst – Automated metabolic pathway prediction. Proc. of the IEEE 2005 Symposium on Computational Intelligence in Bioinformatics and Computational Biology, 2005.

PIZZA, M.; SCARLATO, V.; MASIGNANI, V.; GIULIANI, M.M.; ARICO, B.; COMANDUCCI, M.; JENNINGS, G.T.; BALDI, L.; BARTOLINI, E.; CAPECCHI, B.; GALEOTTI, C.L.; LUZZI, E.; MANETTI, R.; MARCHETTI, E.; MORA, M.; NUTI, S.; RATTI, G.; SANTINI, L.; SAVINO, S.; SCARSELLI, M.; STORNI, E.; ZUO, P.; BROEKER, M.; HUNDT, E.; KNAPP, B.; BLAIR, E.; MASON, T.; TETTELIN, H.; HOOD, D.W.; JEFFRIES, A.C.; SAUNDERS, N.J.; GRANOFF, D.M.; VENTER, J.C.; MOXON, E.R.; GRANDI, G.; RAPPUOLI, R. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. **Science**, v. 287, p. 1816-20, 2003.

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

PROBERT, W.S.; JONHSON, B.J. Identification of a 47 kDa fibronectin-binding protein expressed by *Borrelia burgdorferi* isolate B31. **Mol. Microbiol.**, v. 30, p. 1003-1015, 1998.

PROBERT, W.S.; KIM, J.H.; HOOK, M.; JOHNSON, B.J. Mapping the ligand-binding region of *Borrelia burgdorferi* fibronectin-binding protein BBK32. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 4129-4133, 2001.

QIN, JIN-HONG; SHENG, YUE-YING; ZHANG, ZHI-MING; SHI, YAO-ZHOU; HE, PING; HU, BAO-YU; YANG, YANG; LIU, SHI-GUI; ZHAO, GUO-PING; GUO, XIAO-KUI. Genome-wide transcriptional analysis of temperature shift in *L. interrogans* serovar Lai strain 56601. **BMC Microbiol.**, v. 6, p. 51, 2006.

RAMADASS, P.; MEERARANI, S.; VENKATESHA, M.D.; SENTHILKUMAR, A.; NACHIMUTHU, K. Characterization of leptospiral serovars by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 47, p. 575-576, 1997.

RAMOS, C.R.; ABREU, P.A.E.; NASCIMENTO, A.L.T.O.; HO, P.L. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant

proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, n. 8, p. 1103-1109, 2004.

RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. **Vaccine**, v. 19, p. 2688-2691, 2001.

REIS, R.B.; RIBEIRO, G.S.; FELZEMBURG, R.D.; SANTANA, F.S.; MOHR, S.; MELENDEZ, A.X.; QUEIROZ, A.; SANTOS, A.C.; RAVINES, R.R.; TASSINARI, W.S.; CARVALHO, M.S.; REIS, M.G.; KO, A.I. Impact of environment and social gradient on leptospira infection in urban areas. **PloS Negl. Trop. Dis.**, v. 22, n. 4, p. e228, 2008.

REN, S.X.; FU, G.; JAING, X.G.; ZENG, R.; MIAO, Y.G.; XU, H.; ZHANG, Y.X.; XIONG, H.; LU, G.; LU, L.F.; JIANG, H.Q.; JIA, J.; TU, Y.F.; JIANG, J.X.; GU, W.Y.; ZHANG, Y.Q.; CAI, Z.; SHENG, H.H.; YIN, H.F.; ZHANG, Y.; ZHU, G.F.; WAN, M.; HAUNG, H.L.; QIAN, Z.; WANG, S.Y.; MA, W.; YAO, Z.J.; SHEN, Y.; QIANG, B.Q.; XIA, Q.C.; GUO, X.K.; DANCHIN, A.; SAINT-GIRONS, I.; SOMERVILLE, R.L.; WEN, Y.M.; SHI, M.H.; CHEN, Z.; XU, J.G.; ZHAO, G.P. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. **Nature**, v. 422, n. 6934, p. 888-93, 2003.

RISTOW, P.; BOURHY, P.; MCBRIDE, F.W.; FIQUEIRA, C.P.; HUERRE, M.; AVE, P. GIRONS, I.S.; KO, A.I.; PICARDEAU, M The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. **PloS Pathog.**, v. 3, n. 7, p. 97, 2007.

ROSSLER, D.; EIFFERT, H.; JAURIS-HEIPKE, S.; LEHNERT, G.; PREAC-MURSIC, V.; TEEPE, J.; SCHLOTT, T.; SOUTSCHEK, E.; WILSKÉ, B. Molecular and immunological characterization of the p83/100 protein of various *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 184, n. 1, p. 23-32, 1995.

SAKOLVAREE, Y.; MANEEWATCH, S.; JIEMSUP, S.; KLAVSING, B.; TONGTAWÉ, P.; SRIMANOTE, P.; SAENGJARUK, P.; BANYEN, S.; TAPCHASRI, P.; CHONSA-NGAUN, M.; CHAICUMPA, W. Proteome and immunome of pathogenic *Leptospira* spp. revealed by 2DE and 2DE-immunoblotting with immune serum. **Asian Pac. J. Allergy Immunol.**, v. 25, n. 1, p. 53-73, 2007.

SCHAEFFER, A.A.; ARAVIND, L.; MADDEN, T.L.; SHAVIRIN, S.; SPOUGE, J.L.; WOLF, Y.I.; KOONIN, E.V.; ALTSCHUL, S.F. Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. **Nucleic Acids Res.**, v. 29, p. 2994-3005, 2001.

SHELDON, I.M.; DOBSON, H. Reproductive challenges facing the cattle industry at the beginning of the 21st century. **Reprod. Suppl.**, v. 61, p. 1-13, 2003.

SILVA, E.F.; MEDEIROS, M.A.; MCBRIDE, A.J.A.; MATSUNAGA, J.; ESTEVES, G.S.; RAMOS, J.G.R.; SANTOS, C.S.; CRODA, J.; HOMMA, A.; DELLAGOSTIN, O.A.; HAAKE, D.A.; MITERMAYER, G.R.; KO, A.I. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, v. 25, n. 33, p. 6277-6286, 2007.

STAMM, L.V.; GHERARDINI, F.C.; PARRISH, E.A.; MOOMAW, C.R. Heat shock response of Spirochaetes. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 1572-1575, 1991.

STEVENSON, B.; CHOY, H.A.; PINNE, M.; ROTONDI, M.L.; MILLER, M.C.; DEMOLL, E.; KRACZY, P.; COOLEY, A.E.; CREAMER, T.P.; SUCHARD, M.A.; BRISSETTE, C.A.; VERMA, A.; HAAKE, D.A. *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminina and regulators of complement. **PLoS ONE**, v. 2, n. 11, p. e1188, 2008.

STOCK, J.B.; NINFA, A.J.; STOCK, A.M. Protein phosphorylation and regulation of adaptative responses in bacteria. **Microbiol. Rev.**, v. 53, n. 4, p. 450-490, 1989.

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

VIEIRA, M.L.; D'ATRI, L.P.; SCHATTNER, M.; HABARTA, A.M.; BARBOSA, A.S.; DE MORAIS, Z.M.; VASCONCELLOS, S.A.; ABREU, P.A.; GÓMEZ, R.M.; NASCIMENTO, A.L.T.O. A novel leptospiral protein increases ICAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 276, n. 2, p. 172-180, 2007.

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

WANG, J.; SUNG, W.K.; KRISHNAN, A.; LI, K.B. Protein subcellular localization prediction for Gram-negative bacteria using amino acid subalphabets and combination of multiple support vector machines. **BMC Bioinformatics**, v. 6, p. 174, 2005.

WERTS, C. TAPPING, R.I.; MATHISON, J.C.; CHUANG, T.H.; KRAVCHENKO, V.; SAINT-GIRONS, I.; HAAKE, D.A.; GODOWSKI, P.J.; HAYASHI, F.; OZINSKY, A.; UNDERHILL, D.M.; KIRSCHNING, C.J.; WAGNER, H.; ADEREM, A.; TOBIAS, P.S.; ULEVITCH, R.J. Leptospire lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. **Nat. Immunol.**, v. 2, p. 346-352, 2001.

WILKINS, M.R.; PASQUALI, C.; APPEL, R.D.; OU, K.; GOLAZ, O.; SANCHEZ, J.C.; YAN, J.X.; GOOLEY, A.A.; HUGHES, G.; HUMPHERY-SMITH, I.; WILLIAMS, K.L.; HOCHSTRASSER, D.F. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Biotechnology**, v. 14, p. 61-65, 1996.

WITTMANN-LIEBOLD, B.; GRAACK, H.; POHL, T. Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. **Proteomics**, v. 6, p. 4688-4703, 2006.

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

YANG, H.L.; ZHU, Y.Z.; QIN, J.H.; JAING, X.C.; ZHAO, G.P.; GUO, X.K. In silico and microarray-based genomic approaches to identifying potential vaccine candidates against *Leptospira interrogans*. **BMC Genomics**, v. 7, p. 293-305, 2006.

YU, A.Y.H.; HOURY, W.A. ClpP: A distinctive family of cylindrical energy-dependent serine proteases. (Review) **FEBS Lett.**, v. 581, p. 3749-3757, 2007.

ANEXO A

Espectro obtido através da técnica de espectrometria de massas MALDI-TOF para um *spot* de amostra virulenta de rim. Entre os 10 picos obtidos, 7 geraram a identificação da proteína LIC12621 por busca no programa MASCOT em modo PMF. A cobertura compreendeu 49% da proteína, e o *score* atribuído pelo algoritmo do programa foi de 124.

ANEXO B

Predição do mapa metabólico de *L. interrogans* baseado nas informações genômicas (REN *et al.*, 2003).

ANEXO C

Predição da localização celular de todas as proteínas de leptospira identificadas significativamente. **P-Classifíer**: predição de localização celular segundo o programa P-Classifíer, indicando a respectiva probabilidade. **Localização LipoP**: predição de localização celular segundo o programa LipoP. **SpI**: sítio *signal peptidase I*; **SpII**: sítio *signal peptidase II* de lipoproteína; **TMH**: hélices transmembrana n-terminais; **CYT**: citoplásmica (i.e. sem peptídeo sinal ou hélice transmembrana).

LIC	P-Classifíer	LipoP
10002	extracelular 4.0	CYT -0.20
10011	periplasmática 8.0	SpII 21.70
10074	citoplasmática 7.3	CYT -0.20
10158	citoplasmática 9.3	CYT -0.20
10176	citoplasmática 9.3	CYT -0.20
10191	periplasmática 4.7	SpII 18.7
10272	citoplasmática 8.6	CYT -0.20
10314	membrana externa 6.7	SpI 1.14
10361	citoplasmática 8.7	CYT -0.20
10403	citoplasmática 8.0	CYT -0.20
10411	citoplasmática 6.0	SpI 8.86
10419	citoplasmática 8.6	CYT -0.20
10483	periplasmática 4.6	CYT -0.20
10524	citoplasmática 4.7	CYT -0.20
10591	citoplasmática 9.3	CYT -0.20
10600	citoplasmática 6.0	CYT -0.20
10601	citoplasmática 8.0	CYT -0.20
10602	citoplasmática 9.3	CYT -0.20
10606	citoplasmática 10.0	CYT -0.20
10615	citoplasmática 9.3	CYT -0.20
10619	citoplasmática 10.0	CYT -0.20
10629	membrana Interna 4.0	CYT -0.20
10664	citoplasmática 8.7	CYT -0.20
10672	citoplasmática 9.3	SpI 6.70
10723	extracelular 6.0	CYT -0.20
10733	citoplasmática 8.0	CYT -0.20
10752	citoplasmática 8.7	CYT -0.20
10753	citoplasmática 9.3	CYT -0.20
10767	membrana externa 4.7	CYT -0.20
10771	citoplasmática 9.3	CYT -0.20
10788	periplasmática 6.0	SpI 4.83
10838	periplasmática 4.0	CYT -0.20
10851	citoplasmática 9.3	CYT -0.20

Continua

ANEXO C (Continuação)

LIC	P-Classifier	LipoP
10918	citoplasmática 8.7	CYT -0.20
10973	membrana externa 6.7	Spl 17.6
11003	membrana externa 5.3	Spl 11.0
11115	citoplasmática 4.7	CYT -0.20
11128	citoplasmática 8.0	CYT -0.20
11194	citoplasmática 7.3	CYT -0.20
11196	citoplasmática 8.7	CYT -0.20
11205	citoplasmática 10.0	CYT -0.20
11219	citoplasmática 7.3	CYT -0.20
11220	membrana externa 4.0	CYT -0.20
11228	membrana externa 10.0	Spl 2.8
11231	citoplasmática 9.3	CYT -0.20
11241	citoplasmática 6.0	CYT -0.20
11243	citoplasmática 9.3	CYT -0.20
11249	citoplasmática 4.7	TMH 2.26
11258	citoplasmática 9.3	CYT -0.20
11261	membrana externa 8.7	CYT -0.20
11310	citoplasmática 10.0	CYT -0.20
11335	citoplasmática 8.0	CYT -0.20
11336	citoplasmática 8.7	CYT -0.20
11352	periplasmática 8.7	Spl 15.73
11377	citoplasmática 10.0	CYT -0.20
11391	citoplasmática 9.3	CYT -0.20
11416	citoplasmática 8.0	CYT -0.20
11417	citoplasmática 6.0	CYT -0.20
11456	citoplasmática 9.3	Spl 11.3
11460	citoplasmática 10.0	CYT -0.20
11511	citoplasmática 9.3	CYT -0.20
11514	citoplasmática 10.0	CYT -0.20
11517	membrana externa 3.4	CYT -0.20
11531	membrana interna 4.0	CYT -0.20
11532	extracelular 4.7	CYT -0.20
11550	citoplasmática 10.0	CYT -0.20
11569	membrana externa 6.0	TMH 0.89
11643	membrana externa 4.0	Spl 11.50
11652	citoplasmática 9.3	CYT -0.20
11657	citoplasmática 8.0	CYT -0.20
11695	citoplasmática 7.3	Spl 1.84
11731	citoplasmática 7.3	CYT -0.20
11782	citoplasmática 6.7	CYT -0.20

Continua

ANEXO C (Continuação)

LIC	P-Classfier	LipoP
11786	citoplasmática 6.7	CYT -0.21
11821	citoplasmática 9.3	CYT -0.20
11848	periplasmática 5.3	Spl 8.7
11885	membrana externa 6.0	Spl 15.3
11890	membrana interna 3.3	CYT -0.20
11934	citoplasmática 9.3	CYT -0.20
11951	citoplasmática 8.7	CYT -0.20
11985	citoplasmática 7.3	CYT -0.20
12002	periplasmática 6.0	Spl 2.3
12003	citoplasmática 6.7	CYT -0.20
12015	membrana externa 7.3	Spl 3.71
12040	citoplasmática 5.3	CYT -0.20
12068	citoplasmática 9.3	CYT -0.20
12082	citoplasmática 4.7	CYT -0.20
12087	citoplasmática 8.0	CYT -0.20
12114	citoplasmática 7.3	Spl 5.3
12195	citoplasmática 9.3	CYT -0.20
12211	citoplasmática 6.7	CYT -0.21
12233	citoplasmática 5.3	CYT -0.20
12246	citoplasmática 9.3	CYT -0.20
12326	citoplasmática 8.7	CYT -0.20
12328	citoplasmática 10.0	CYT -0.20
12333	membrana externa 5.3	CYT -0.20
12407	citoplasmática 7.3	CYT -0.20
12414	citoplasmática 4.7	CYT -0.20
12454	citoplasmática 8.67	CYT -0.20
12459	citoplasmática 9.3	CYT -0.21
12513	membrana interna 10.0	TMH 0.22
12515	membrana externa 5.3	CYT -0.20
12558	periplasmática 5.3	Spl 3.8
12571	citoplasmática 7.3	CYT -0.20
12573	citoplasmática 8.7	CYT -0.20
12621	citoplasmática 8.0	CYT -0.20
12633	citoplasmática 10.0	CYT -0.21
12634	citoplasmática 10.0	CYT -0.20
12667	citoplasmática 10.0	Spl 0.3
12706	citoplasmática 9.3	CYT -0.20
12739	citoplasmática 9.3	CYT -0.20
12765	periplasmática 5.3	CYT -0.20
12795	citoplasmática 8.7	CYT -0.20

Continua

ANEXO C (Continuação)

LIC	P-Classifier	LipoP
12852	citoplasmática 9.3	CYT -0.20
12875	citoplasmática 10.0	CYT -0.20
12898	membrana externa 10.0	TMH 8.09
12946	citoplasmática 8.7	CYT -0.20
12966	citoplasmática 7.3	SpII 10.63
12971	citoplasmática 10.0	TMH 2.05
12980	citoplasmática 9.3	CYT -0.20
13050	membrana externa 4.7	SpI 14.61
13123	citoplasmática 8.7	CYT -0.20
13157	citoplasmática 10.0	CYT -0.20
13166	citoplasmática 8.7	SpI 10.13
13308	citoplasmática 8.7	CYT -0.20
13316	citoplasmática 8.7	SpI 10.12
13332	periplasmática 6.0	CYT -0.20
13451	extracelular 8.7	CYT -0.21
20044	citoplasmática 8.7	CYT -0.22
20114	citoplasmática 5.3	CYT -0.20
20125	citoplasmática 7.3	CYT -0.20
20185	extracelular 3.3	SpII 5.9
20227	citoplasmática 9.3	CYT -0.20
20254	citoplasmática 10.0	CYT -0.20

Conclusão

ANEXO D

Seqüências de aminoácidos das proteínas nativas de *L. interrogans* sorovar Copenhageni LIC10314 (A), LIC10672 (B), LIC11003 (C) e LIC11228 (D). Em destaque estão as seqüências correspondentes aos peptídeos sinais preditos pelo programa *SignalP*.

(A) LIC10314

MFRIWIVFLCFGFSLSLFSQESSKLGEKEIRSSQVRVFINRSSARAGEEVRGTNEKVGSGLAESLK
KEPDKTHQTGGISVTRIAPEEKKFGADVSVLEDSDFGHINSIQRLTGfVKNLNGYDDKNSDIL
ATYILYYNAIHRKDKSYISKYSNSVIKfVTPQSIGISKRYSEWPGKTQILIPLEDVLGKDVHTD
ELEDEVNKELDKKKDGQSEKDKFGDLQNEKNKKELEELKRRKEENQNKQKEISDKETKTD
KELQELNKDPVKNKVQIVEKKKEKEQIQKEKEAVKKEEQKLKEKEKEVVKKDEERKNNNS
SSSSSSSSSSKSDSKSDSSSSKSGSDKSASDDKKSEAELKKELADTKKELETKEEEEKKKEEFDK
NVVGKILFLKTLKYLDKGHYNNELQVLDPTKDDTIIRGDFNKICGRTFEIVDVGKALVIGFED
GHSSNHKLILIDQETLKPVLFAEDNIFWRSPMIKGDIEYAFEEVEEKYYLSRFGKDLKKQAKSS
EISPNSNVTFYGEKIYVTGKEESSGNIQITVFNKADLKLKKIKP

(B) LIC13672

MKKVCFQFSSFILNVEEFMKKITWLTILFILLNVPFAFAQNKEKGQADLSRSDVFSEQSSYT
KSLQKIVRDLEATINERLTDLEKKHSLLVILRPELEKVQTTVTEDIPFTFDEGYESNLLKYVRFRF
EAGKIKEVELASEKKRIQYEFAFENKRLIFTPPDVLASQVKLERFDKIENTKVADISLENQIKAL
RLLESSLRSSYRIDIMIALYKDKKDRKNLYQIDI

(C) LIC11003

MKSTORKILSSFIILLAGFFISCGAELPIEELSDAKNSITRAKSAGAEKYAPSELEEARKNLLTAH
QKASEENLTETKKSALYARAKALDASEKSFSSVDDARKESSSSIESAEAYASQLASEPYNTSVQ
LRKEGDSLRETADRTLESYPKESGDDAKLRMLAAFDQYASRQKYADSKKAADSKVLALSQ
KQQLIDSFADIDKNLNDADKYAEGKDPEVSETRNRLDSSKSKIEEGKIKEGYSEIDDIRKKS
LVAKNIKIYAEKQKELAKQSVASATTRLASFDRNKINSSRDFQVSYQRAEENLKAAEESRVAE
DLYSEKYEDSISRSEEAIRLSRILVDQATELAERIERKATTDKIAGRDTKTEGNKNTKNQSTTE
GKNSSSKIGEDGLPEGWKRYVVRKKVPADCLWRIAKDKRHYGTSKLWRRRIEANRNKIKNPNL
IYPKQVLLIPPRKGPTRLKVESAPSRKKKPATEEVEAIEENRKP'TTHSSEDSEAGESNNKKKAE
ATPPSTDTSEEEGGGESSENEESSPEEEENGEEENPENLQ

(D) LIC11228

MFEGNMRIFOIYIILLLSLFLARTAYSEQIVSSKKDEPDAYYGLDVKAVISPSYGARIRDGASGIS
NSAPNDKTGFSTPWITLMISKTFEETGIQAEWGLIRNNQLTSDTRTDSGTQKNPYILNVRAS
IKKNWETSSYGNYSIGFGIQELPHITYTQWSNYWRWRYIDKGPLES LGFAPQPADIGLNATGKW
SIFSAQIMISNGEGYRETQNTNSSGMDVSSRSIEPMLGEKTKTGLHLFYRKENAFGFGGNECFE
GKTNCLPNDLNPATSLYRQISLQSDTFGSESNLIWNGFLTWNLGLGGILKKQNSGEIRDRLQP
FAPPFAFGKDGFGKALYIWL SIGIEKFHLLGRIEQGTGNNGIMGVTDTVQKEFLPGLGIPNVDA
TLQIRNLPETRAGGYSSKSSFRRISVFFEWIVNPRFRMAIGYIENKNYDLNGISQRAYIDPLGNER
TEKEYLSQWKESGNLGIVSYSVLDDKQILLRTTIEF

ANEXO E

Sequenciamentos das regiões 5' das construções pAE-LIC10314, pAE-LIC10672, pAE-LIC11003 e pAE-LIC11228. Estão evidenciados nos cromatogramas os códons de iniciação ATG (verde), as regiões codificadoras para 6 resíduos de histidina nas porções amino-terminais das proteínas recombinantes a serem expressas (amarelo), sítios de restrição da enzima *XhoI* – CTCGAG – provenientes da região de múltiplas clonagens do vetor pAE (vermelho), sítios de restrição da enzima *BamHI* – GGATCC – utilizados para as clonagens dos insertos (vermelho) e os inícios das regiões codificadoras (flexas). **A-** pAE-LIC10314; **B-** pAE-LIC10672; **C-** pAE-LIC11003; **D-** pAE-LIC11228.

(C)

(D)