ANA TUNG CHING CHING

**IDENTIFICAÇÃO DE ADESINAS BACTERIANAS
POR *PHAGE DISPLAY***

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

São Paulo
2012

ANA TUNG CHING CHING

**IDENTIFICAÇÃO DE ADESINAS BACTERIANAS
POR *PHAGE DISPLAY***

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Paulo Lee Ho

Versão corrigida

São Paulo
2012

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

© reprodução total

Ching, Ana Tung Ching.

Identificação de adesinas bacterianas por *phage display* / Ana Tung Ching Ching. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Lee Ho.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Genômica funcional de *Leptospiras*.

Versão do título para o inglês: Identification of bacterial adhesins through *phage display*.

1. *Phage-display* 2. *Leptospirose* 3. *L. interrogans sorovar copenhageni*
4. Adesinas 5. Heparan sulfato proteoglicana I. Ho, Prof. Dr. Paulo Lee
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0179/2012

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

Candidato(a): Ana Tung Ching Ching.

Título da Tese: Identificação de adesinas bacterianas por *phage display*.

Orientador(a): Prof. Dr. Paulo Lee Ho.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Identificação de adesinas bacterianas por *phage display*", protocolo nº 564/08, sob a responsabilidade de Paulo Lee Ho, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 10/12/2008.

Vigência do Projeto: 01/2009 – 12/2011	Nº de animais/espécie
	180 / hamster – <i>Mesocricetus auratus</i> – recém desmamado

São Paulo, 11 de Dezembro de 2008.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 256/06, sobre o projeto intitulado "Desenvolvimento de vacinas contra a leptospirose", sob a responsabilidade de Paulo Lee Ho está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 14/03/2006.

São Paulo, 17 de março de 2006.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

À Laurinha, por ser resultado
do meu “experimento” mais bem sucedido,
à pequena Esther, por ser a contraprova mais almejada
e por me mostrarem o sentido da vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Paulo Lee Ho, por acreditar e proporcionar esse trabalho desafiador. Por mostrar e compartilhar seus conhecimentos científicos, por oferecer um convívio profissional sob uma visão humanizada. E por fim, pela sua eterna confiança, paciência e amizade.

À todos os colegas e pesquisadores do Laboratório Biotecnologia Molecular I e à todos do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, pela convivência e experiências compartilhadas. Especialmente ao Dr. Eneas de Carvalho por sua amizade e pelas incessantes discussões, sejam elas profissionais ou filosóficas e à Dra. Jô Silva, pelo carinho e por ensinar e dividir a sua experiência na manipulação das leptospiros.

Aos funcionários do Laboratório de Biotecnologia Molecular I, às queridas Nidia, Izilda e Aline pelo carinho e por manterem o nosso ambiente de trabalho constantemente agradável e organizado. Ao Leonardo, por cuidar de uma das ferramentas importantes para o desenvolvimento desse projeto.

À Dra. Patrícia Abreu do Laboratório de Microbiologia do Instituto Butantan, por todo seu auxílio e colaboração no desenvolvimento desse projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

À Fundação Butantan, pela infra-estrutura permitindo o desenvolvimento deste projeto.

Às Pikiticas Ágatha e Juliana, por todo apoio e carinho de sempre, pelas risadas e lágrimas, pelos HHs feitos em casa por causa da Laurinha... pela eterna amizade.

Às queridas Karina e Ivana, pela amizade e carinho, pelas agradáveis presenças de vocês nessa fase importante da minha vida.

Ao Henrique pela amizade e pelas inúmeras tentativas de mostrar que Steve Jobs é mais eficiente que Bill Gates.

À Dona Elen e Sr. Hsian Tien, que apesar da distância, acreditam e torcem por mim.

Aos queridos Cris e Edson, pelo amor incondicional.

Em especial, ao meu amor, amigo e marido Inácio, por ser um dos maiores responsáveis pela minha paixão à ciência, por me mostrar que é possível ir além dos oceanos para concretizar um sonho. Por sempre estar ao meu lado, me trazendo palavras e gestos de incentivo. Por ser o co-autor dos meus maiores “experimentos”: Laura e Esther. Obrigada por fazer parte da minha vida!

Às pessoas que, com palavras, gestos, atitudes ou olhares contribuíram e me ensinaram durante essa etapa da minha vida.

*Está instaurada a dúvida.
A metódica dúvida epistemológica.
Neste mundo a terra não está no centro
nenhum saber é saber completo.
Seja bem-vinda era da razão.
Não há que se temer a revisão.
Nada que se diga ou que foi dito
merece estatuto de dogma irrestrito.
Cuidado com a verdade
que se pretende
maior que a realidade,
pois, os fatos são os fatos
e fluem diante de nós
que estupefatos
assistimos ao espetáculo.*

Galileu Galilei

RESUMO

CHING, A. T. C. **Identificação de adesinas bacterianas por phage display.** 2012. 116 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A leptospirose é uma zoonose de importância mundial causada pela bactéria espiroqueta do gênero *Leptospira* que atinge principalmente países em desenvolvimento. No Brasil, 80% dos casos diagnosticados são devidos a *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni. Além das adoções de medidas preventivas sócio-econômicas e educativas, são importantes os investimentos em testes diagnósticos eficientes e no desenvolvimento de uma vacina contra a bactéria, já que ainda não existe uma vacina licenciada para o uso em humanos. Mesmo com as informações dos genomas de algumas linhagens de leptospira disponíveis, muitas perguntas ainda não foram respondidas sobre os mecanismos de interação da bactéria com o seu hospedeiro. A estratégia de *phage display* é uma metodologia que vem sendo muito explorada e abriu caminhos para a construção de bibliotecas que apresentam ligantes de interesse na busca por alvos específicos. O presente projeto tem como objetivo principal a identificação de adesinas de leptospira por meio da técnica de *phage display*. Inicialmente, bibliotecas que carregavam diferentes fragmentos genômicos foram utilizadas para selecionar, *in vivo*, ligantes de leptospira com afinidade por tecidos de hamster, procedimento conhecido por *panning*. Dessa forma, fagos expressando possíveis proteínas de adesão puderam ser identificados para posterior validação, entre elas, uma proteína hipotética anotada como provável lipoproteína no genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Uma varredura dessas bibliotecas, *in vitro*, contra proteínas de matriz extracelular também foi realizada com o mesmo objetivo. A seleção contra Heparan Sulfato Proteoglicano (HSPG) resultou na identificação de genes de proteínas já descritas como adesinas dessa bactéria, tais como LigA e LigB. Para a validação desses resultados, proteínas recombinantes correspondentes a estes genes foram produzidas e utilizadas em experimentos de ligação às células de mamíferos e aos componentes de matriz extracelular. O carboxi-terminal da proteína LigB recombinante foi capaz de confirmar a ligação ao HSPG e também à heparina. Essa mesma proteína também se mostrou capaz de aderir às células de mamíferos cultivadas *in vitro*. Também foi avaliada a capacidade dos componentes de matriz extracelular interferirem na adesão da proteína recombinante LigB com as células de mamíferos, mostrando que HSPG e heparina são capazes de reduzir significativamente essa interação. Além disso, foram realizados experimentos de seleções de fagos contra soros de pacientes diagnosticados com leptospirose. Porém os produtos identificados ainda não foram validados. Estes resultados constituem um conjunto de evidências do papel das proteínas de leptospira na sua associação com o hospedeiro e ilustram a possibilidade do uso da técnica de *phage display* para identificar possíveis adesinas e permitir um melhor entendimento da biologia do patógeno.

Palavras-chave: *Phage display*. Leptospirose. *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Adesinas. Heparan sulfato proteoglicano. Componentes de matriz extracelular.

ABSTRACT

CHING, A. T. C. **Identification of bacterial adhesins through phage display.** 2012. 116 p. Thesis (PhD in Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Leptospirosis is a worldwide zoonosis caused by spirochetal bacteria of genus *Leptospira* that affects mainly developing countries. In Brazil, 80% of diagnosed cases are due to *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. In addition to the adoption of preventive measures socio-economic and educational, investments in efficient diagnostic tests and the development of a vaccine against the bacteria are important, since there is still no vaccine licensed for use in humans in Brazil. Even with the information of the genomes of some strains of leptospira available, many questions remain unanswered about the mechanisms of interaction of bacteria with their host. A phage display strategy is a methodology that has been widely explored and opened paths for the construction of libraries that have ligands of interest in the search for specific targets. The main objective of this project is the identification of leptospira adhesins by phage display technique. Initially, libraries carrying different genomic fragments were used to select in vivo, leptospira's ligands with affinity for hamster's tissues, a procedure known as panning. Thus, phage expressing possible adhesion proteins could be identified for later validation including a hypothetical protein noted as lipoprotein in the genome of *L. interrogans* serovar Copenhageni. Screening these libraries in vitro against extracellular matrix proteins was also performed with the same goal. Selection against heparan sulfate proteoglycan resulted in the identification of genes for proteins already described as bacterial adhesins, such as LigA and LigB. To validate these results, recombinant proteins corresponding to these genes were generated and used in experiments binding to mammalian cells and extracellular matrix components. The carboxy-terminus of the recombinant protein LigB was able to confirm binding to heparan sulfate proteoglycan and also to heparin. This same protein was also able to bind to mammalian cells culture in vitro. We also evaluated the ability of extracellular matrix components interfere with the adhesion of the recombinant protein LigB with mammalian cells, showing that heparan and heparin sulfate proteoglycan are able to reduce this interaction significantly. Furthermore, experiments were performed panning the library against sera from patients diagnosed with leptospirosis. But the products identified have not yet been validated. These results constitute a body of evidence of the role of genes of leptospira in their host association and illustrate the possibility of the use of phage display technique to identify possible adhesins and enable a better understanding of the pathogen biology.

Keywords: Phage display. Leptospirosis. *L. interrogans* serovar Copenhageni. Adhesins. Heparan sulfate proteoglycan. Extracellular matrix components.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Micrografia eletrônica de varredura de alta resolução de *L. interrogans* serovar Copenhageni, 19
- Figura 2** - Estrutura esquemática da parede celular de leptospiros e suas principais proteínas e lipoproteínas de membrana, 20
- Figura 3** - Ciclo de vida do fago filamentosos, 25
- Figura 4** - Desenho esquemático dos vetores tipo fagomídeo utilizados para construção das bibliotecas, 32
- Figura 5** - Esquema do princípio da seleção *in vivo* da biblioteca de fagos, 36
- Figura 6** - Figura esquemática ilustrando o vetor de expressão pAE, 42
- Figura 7** - Gel de agarose 1 % para a visualização da preparação dos vetores, 50
- Figura 8** - Gel de agarose 1% para visualização da fragmentação do DNA genômico, 52
- Figura 9** - Gel de agarose 1,2% para a visualização dos fragmentos selecionados, 52
- Figura 10** - Análise preliminar dos experimentos de seleção da biblioteca construída com o vetor pG3DSS contendo fragmentos de tamanho maior de *L. interrogans* em rim e fígado, 57
- Figura 11** - Análise preliminar dos experimentos de seleção da biblioteca construída com o vetor pG3DSS contendo fragmentos de tamanho menor em rim, fígado e pulmão, 60
- Figura 12** - Ligação do bacteriófago recombinante a heparina, 63
- Figura 13** - Enriquecimento do ligante mais afim com matrigel após três ciclos de panning da biblioteca de *S. pneumoniae*, 66
- Figura 14** - Representação esquemática das proteínas LigA e LigB, 68
- Figura 15** - Visualização dos géis de SDS-PAGE 12% das purificações das proteínas recombinantes, 69
- Figura 16** - Cromatografia de afinidade a heparina, mostrando a fração eluída da proteína rLB-Ct, 70
- Figura 17** - Leitura das amostras submetidas à cromatografia de afinidade à heparina com seus índices de refração, em valores absolutos e a concentração de NaCl em mol.L⁻¹, 70
- Figura 18** - Adesão das proteínas recombinantes TlyC, rLA-Ct, rLB-Nt e rLB-Ct aos componentes de matriz extracelular (MECs) e a heparina sódica, 72
- Figura 19** - Adesão das proteínas recombinantes rLA-Ct, rLB-Ct, rLB-Nt, TlyC e LipL32 às diferentes linhagens celulares A31, LLC-PK1 e VERO, 73
- Figura 20** - Adesão das proteínas recombinantes rLB-Ct, rLB-Nt, rLA-Ct e TlyC à diferentes linhagens celulares A31, LLC-PK1 e VERO, na presença ou na ausência de HP e MECs, 74
- Figura 21** - Avaliação do desafio animal quanto ao número de animais sobreviventes, 75

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Quantificação da preparação dos vetores do tipo fagomídeo por espectrofotometria, 50
- Tabela 2** - Quantificação do DNA fragmentado em ng/μl e suas respectivas relações de pureza, 53
- Tabela 3** - Quantidade de enzimas utilizadas para os tratamentos dos insertos, 54
- Tabela 4** - Títulos primários obtidos das bibliotecas de *L. interrogans* e o cálculo do número de vezes que a biblioteca está cobrindo o genoma da bactéria a partir do título primário considerando o tamanho médio das seqüências, 55
- Tabela 5** - Total de clones analisados por seqüenciamento a cada ciclo e nos respectivos tecidos, 56
- Tabela 6** - Quantidade de partículas virais recuperados (pfu/mL) após o tempo de interação com cada tecido de hamster a cada ciclo de seleção, 58
- Tabela 7** - Clones identificados após seleção da biblioteca pG3DSS contendo fragmentos de tamanho maior de *L. interrogans* em rim de hamster, 59
- Tabela 8** - Total de clones analisados por seqüenciamento no IV *round* e nos respectivos tecidos, 60
- Tabela 9** - Quantidade de partículas virais recuperados (pfu/mL) após o tempo de interação com cada tecido a cada ciclo, 60
- Tabela 10** - Representação do número de seqüências analisadas, em cada ciclo, no *panning* da biblioteca “pG3DSS + fragmentos de tamanho maior” em heparan sulfato, 62
- Tabela 11** - Análise dos clones selecionados em heparan sulfato proteoglicana e seus respectivos produtos codificados pelas suas seqüências fusionadas ao fago, 62
- Tabela 12** - Quantidade de partículas virais recuperados (pfu/mL) após o tempo de interação com heparan sulfato a cada ciclo, 62
- Tabela 13** - Quantidade de clones analisados por seqüenciamento em cada ciclo de seleção e quantidade de partículas virais recuperadas após cada ciclo, 64
- Tabela 14** - Oligonucleotídeos para seqüenciamento dos clones selecionados no *panning*, 66
- Tabela 15** - Oligonucleotídeos utilizados para as clonagens das proteínas recombinantes, 67

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Leptospirose	16
1.2 Adesinas Bacterianas.....	22
1.3 <i>Phage Display</i>: Bibliotecas apresentadas em fagos	24
2 OBJETIVOS	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Obtenção e cultivo de leptospiros.....	30
3.2 Isolamento do DNA	30
3.3 Construção da biblioteca	30
3.4 Preparo da biblioteca para injeção em hamster	33
3.5 Linhagem do modelo animal utilizado no <i>panning in vivo</i>	34
3.6 <i>Panning</i> contra tecidos de hamster	34
3.7 <i>Panning</i> contra soro de pacientes infectados por leptospiros imobilizado em microplacas	37
3.8 <i>Panning</i> contra proteínas de matriz extracelular imobilizadas em microplacas	38
3.9 <i>Panning</i> contra anticorpo monoclonal anti-<i>Etag</i> imobilizado em microplacas	38
3.10 Oligonucleotídeos para seqüenciamento	39
3.11 Análise de fagos (clones) selecionados	39
3.11.1 Preparação de DNA plasmidial dos clones selecionados	39
3.11.2 Seqüenciamento do DNA	40
3.12 Preparo de células eletrocompetentes	40
3.13 Clonagem, expressão e purificação de proteínas recombinantes	41
3.14 Obtenção de proteínas recombinantes	42
3.15 Purificação e diálise das proteínas recombinantes	43
3.16 Obtenção e titulação dos antisoros policlonais	44
3.17 Cromatografia de afinidade à heparina	45
3.18 Adesão das proteínas recombinantes aos componentes de matriz extracelular (MECs).....	45
3.19 Adesão das proteínas recombinantes às diferentes linhagens celulares	46
3.20 Propagação dos clones de bacteriófagos recombinantes.....	46
3.21 Experimento de ligação do clone de bacteriófago recombinante à heparina	47

3.22 Ensaio de imunização com fagos e avaliação do seu potencial protetor	47
3.23 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	48
4 RESULTADOS	50
4.1 Isolamento e quantificação dos vetores	50
4.2 Isolamento e quantificação de DNA genômico das bactérias	51
4.3 Fragmentação do DNA genômico	51
4.4 Quantificação do DNA fragmentado	53
4.5 Tratamento dos insertos de DNA e dos vetores	53
4.6 Ligação dos insetos nos vetores e validação das bibliotecas	54
4.7 Título primário das bibliotecas	55
4.8 Seleção da biblioteca de <i>L. interrogans</i> contra os tecidos de hamster: biblioteca pG3DSS contendo fragmentos de tamanho maior	56
4.9 Seleção da biblioteca de <i>L. interrogans</i> contra os tecidos de hamster: biblioteca pG3DSS contendo fragmentos de tamanho menor	59
4.10 Seleção da biblioteca de <i>L. interrogans</i> contra proteínas de matriz extracelular imobilizadas em microplacas	61
4.10.1 O clone selecionado em HSPG que apresenta a LigB é capaz de se ligar à heparina.....	63
4.11 Seleção da biblioteca de <i>L. interrogans</i> contra soro de pacientes infectados com leptospira	64
4.12 Seleção da biblioteca de <i>L. interrogans</i> contra anticorpo monoclonal anti-Etag	65
4.13 Biblioteca de <i>S. pneumoniae</i> : panning contra proteínas de matriz extracelular imobilizadas em microplacas	65
4.14 Oligonucleotídeos utilizados	66
4.15 Expressão e purificação das proteínas recombinantes	67
4.16 Cromatografia de afinidade a heparina	69
4.17 Adesão das proteínas recombinantes aos componentes de matriz extracelular (MEC) e diferentes linhagens celulares	71
4.17.1 A proteína rLB-Ct é capaz de se ligar ao HSPG e à heparina	71
4.17.2 A proteína recombinante rLB-Ct se liga às células de mamíferos e à heparina e é capaz de reduzir essa interação	72
4.18 Ensaio de imunização com fagos e avaliação do seu potencial protetor	74
5 DISCUSSÃO	76

6 CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS	89
APÊNDICE	100
APÊNDICE A - Sequências das proteínas selecionadas nos experimentos de <i>panning</i> com a região clonada no fago em destaque	
APÊNDICE B - Tabela resumindo as análises pelos programas disponíveis em rede das proteínas selecionadas nos experimentos	
APÊNDICE C - Curva do Índice de Refração dos tampões e das amostras coletadas	
APÊNDICE D - Sequência da proteína LigB de <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni e seus domínios Big (<i>Bacterial immunoglobulin-like</i> - Big 1 ao Big 12)	
APÊNDICE E - Trabalhos publicados em revistas científicas no período do doutoramento	

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leptospirose

Leptospirose é uma zoonose de importância mundial que atinge principalmente países em desenvolvimento. É causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*, podendo acometer quase todos os mamíferos. É considerada uma doença ocupacional por afetar seres humanos que freqüentemente estão em contato com água, solo ou alimentos contaminados pela urina de roedores ou animais domésticos infectados (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

Segundo Levett (2001), os principais reservatórios de leptospiros na natureza são os hospedeiros definitivos, que geralmente são infectados por via direta, através do contato com fluidos provenientes de animais contaminados. Estes contatos podem ocorrer em uma gama variada de situações: durante o desenvolvimento uterino, no ninho, no contato sexual, durante a alimentação em grupo, etc. Por outro lado, a contaminação de hospedeiros acidentais é rara, e tais hospedeiros não parecem possuir papel significativo na manutenção das leptospiros na natureza.

Ao contrário do que acontece nos hospedeiros definitivos, a contaminação acidental geralmente é indireta, através do contato com solo ou água contaminados por fluidos de animais reservatórios infectados. As portas de entrada mais comuns pelas quais as leptospiros penetram em seus hospedeiros são a pele, e as mucosas em geral. Para a penetração através da pele, é necessário que esta possua abrasões, cortes ou arranhões, embora a penetração em pele íntegra imersa por muito tempo na água também tenha sido observada (FAINE et al. 1999). Uma vez que os animais reservatórios continuam excretando leptospiros por toda a vida na sua urina, a contaminação de hospedeiros acidentais é recorrente.

Apesar de aparentemente não se comportar como hospedeiro definitivo, o homem é constantemente acometido por leptospirose, podendo ser contaminado por diversos sorovares (FAINE et al., 1999). As leptospiros patogênicas possuem capacidade de atravessar a membrana celular em uma taxa muito mais alta do que a as leptospiros não-patogênicas, fazendo com que a bactéria atinja rapidamente o sistema circulatório e se dissemine pelo organismo (BAROCCHI et al., 2002).

A ocorrência de leptospirose é favorecida principalmente pelas condições climáticas de regiões tropicais e subtropicais, onde temperaturas elevadas e períodos com altos índices pluviométricos favorecem o aparecimento de surtos epidêmicos de caráter sazonal (FUNASA,

2002). Além da sua importância para a saúde pública, a leptospirose possui grande impacto na economia da indústria pecuária por alterar as condições reprodutivas dos animais, diminuindo a produtividade (LEVETT, 2001).

Descrita pela primeira vez em 1886 pelo patologista alemão Adolf Weil, essa doença infecciosa ainda tem sido subestimada devido à dificuldade de se identificar os sintomas apresentados pelos pacientes. Estes podem apresentar desde quadros assintomáticos aos mais severos, caracterizados principalmente pela falência renal e hepática, conhecidos por síndrome de Weil (FAINE et al., 1999). Além disso, diante das inespecificidades dos sintomas da doença, a leptospirose pode ser comumente confundida com outras doenças, como gripe e dengue (BHARTI et al., 2003).

Na primeira semana ocorre uma fase septicêmica, onde as bactérias são encontradas no sangue e, a partir da segunda semana, uma fase imune, caracterizada pela produção de anticorpos pelo indivíduo infectado e excreção das espiroquetas na urina. As leptospirosas podem ser observadas por microscopia de campo escuro, porém esta forma diagnóstica não é sensível, pois depende principalmente da densidade de microorganismos presentes no sangue (LEVETT, 2001). O teste de referência para o diagnóstico sorológico de leptospirose é o teste de aglutinação microscópica (MAT). Entretanto, este ensaio é complexo, de difícil controle, padronização, leitura e interpretação e, a sua utilização na identificação de sorovares é ainda controversa (LEVETT, 2003). Outras formas de diagnóstico têm sido relatadas ou estão em desenvolvimento, como testes baseados em detecção de IgMs através de ELISA (MCBRIDE et al., 2007), *imunoblots* (DOUNGCHAWEE et al., 2008) ou *dipsticks* (GUSSENHOVEN et al., 1997) e testes baseados em PCR (DE FARIA et al., 2008; FONSECA CDE et al., 2006; JOUGLARD et al., 2006; PALANIAPPAN et al., 2005). Até o momento, com exceção do MAT, nenhuma dessas tecnologias permite a identificação do sorovar infectante, aspecto fundamental para os estudos epidemiológicos e para a saúde pública.

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

A imunidade à infecção inicial por leptospirosas é dependente basicamente de resposta humoral, majoritariamente contra os LPSs (ADLER; FAINE, 1978); a resposta celular ainda não é bem entendida na leptospirose (FAINE et al., 1999). A opsonização das bactérias permite que estas sejam fagocitadas e eliminadas da corrente sanguínea no começo da

infecção (FAINE; SHAHAR; ARONSON, 1964). Indivíduos que contraíram leptospirose ficam protegidos contra reinfecção pelo mesmo sorovar ou por sorovares relacionados (LEVETT, 2001), por um curto período de tempo (LUPIDI et al., 1991).

Os antibióticos são comumente utilizados contra a infecção por leptospirosas, pois sabe-se que essas bactérias são sensíveis às penicilinas e tetraciclinas, além dos estudos sobre o uso de outros antibióticos (GRIFFITH; HOSPENTHAL; MURRAY, 2006).

No Brasil, entre 2005 a 2010, foram notificados mais de 20 mil casos de leptospirose, com uma taxa anual de 3756 casos (Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância Sanitária, 2010). O Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) relata uma média de letalidade de 10,7%. O Brasil encontra-se no décimo sétimo lugar entre os países com alta incidência de leptospirose (PAPPAS et al., 2008).

Leptospirosas possuem morfologia filamentosa e espiralada (FAINE et al., 1999) (Figura 1), são microrganismos aeróbicos obrigatórios, altamente móveis por apresentarem dois flagelos localizados cada um em cada uma de suas extremidades, no espaço periplasmático; as alterações morfológicas, como o característico formato de gancho, são induzidas pela rotação desses flagelos, permitindo a mobilidade das leptospirosas em ambientes aquosos (WOLGEMUTH et al., 2006).

Figura 1 - Micrografia eletrônica de varredura de alta resolução de *L. interrogans* serovar Copenhageni

Fonte: (BHARTI, 2003)

Consideradas bactérias gram-negativas, a parede celular das *Leptospira* é composta por uma membrana citoplasmática associada com o peptidoglicano da região periplasmática, recoberta por uma membrana externa. Essa membrana externa é composta principalmente por fosfolipídeos, proteínas de membrana externa (OMPs) e lipopolissacarídeos (LPSs) (Figura 2). As leptospiras são conhecidas por espiroquetas, e pertencem a família Leptospiraceae. O gênero *Leptospira* agrupa basicamente as espécies que reúnem as cepas patogênicas e aquelas saprófitas de vida livre, encontradas usualmente em água doce de superfície (LEVETT, 2001).

Figura 2 - Estrutura esquemática da parede celular de leptospiros e suas principais proteínas e lipoproteínas de membrana

Lipopolissacarídeo LPS, Flagelo periplasmático EF, Lipoproteína de membrana interna LpL31, proteína transmembrana OmpL1, Proteínas de superfície externa LipL41, LipL36, LipL32, LenA, LigA, LigB.

Fonte: Adaptado de (CINCO, 2010)

Do ponto de vista taxonômico, as características antigênicas decorrentes de antígenos de parede, como a natureza lipoproteica, possibilitam diferenciações sorológicas usadas para o reagrupamento em sorovares/sorogrupos, superando 200 tipos (LEVETT, 2001; CERQUEIRA; PICARDEAU, 2009; BOURHY et al., 2010). As leptospiros são o único gênero patogênico de espiroquetas que também é capaz de sobreviver no meio ambiente, fora do hospedeiro (VINETZ, 2001).

Portanto, a leptospirose é uma doença infecciosa que apresenta importância pelos seus impactos econômicos, tanto em relação aos prejuízos significativos no âmbito pecuário/agrícola, quanto nos sérios problemas para o Sistema Público de Saúde, uma vez que internações e cuidados intensivos tornam-se necessários nos quadros mais graves da doença (FAINE et al., 1999; KO et al., 1999). Assim, além da adoção de medidas preventivas sócio-econômicas e sócio-educativas, são importantes os investimentos em testes diagnósticos eficientes e no desenvolvimento de uma vacina contra a bactéria.

As vacinas contra leptospirose baseadas em preparações de leptospiros atenuada/inativada para uso veterinário já existem no mercado, porém a sua eficácia em animais de grande porte ainda é controversa (ALT, 2001; BOLIN; SRIVASTAVA, 2006; FAINE et al., 1999). Já as vacinas humanas disponíveis atualmente são raras. Baseadas também em preparações de leptospiros atenuada/inativada ou em preparações da membrana externa são licenciadas somente nos países em que foram desenvolvidas, entre elas, a vacina

produzida em Cuba (proteção de 78%), na China (proteção de 75%), no Japão (proteção de 60 a 100%) (KOIZUMI; WATANABE, 2005; MCBRIDE et al., 2005), na França (proteção de 100%) (LAURICHESSE et al., 2007) e na Rússia (proteção de 89 a 98%) (IKOEV et al., 1999).

Nos últimos anos, estudos moleculares e celulares para desenvolvimento de vacinas contra leptospirose têm sido focados na motilidade da bactéria (CHARON; GOLDSTEIN, 2002), nos lipopolissacarídeos (LPSs) (ERRIDGE et al., 2004), nas lipoproteínas (SEIXAS et al., 2007), nas proteínas de membrana externa (OMPs) (GEBRIEL; SUBRAMANIAM; SEKARAN, 2006) e nos fatores de virulência (YANG et al., 2006).

Os projetos de seqüenciamento dos genomas de microrganismos relacionados com patologias favoreceram a estratégia de se explorar e identificar possíveis candidatos vacinais. Para o gênero *Leptospira*, cinco linhagens já tiveram seus genomas determinados por meio de seqüenciamento nucleotídico: para a espécie *L. interrogans*, o sorovar Lai foi seqüenciado na China, em 2003 (REN et al., 2003); em 2004 o genoma da *L. interrogans* sorovar Copenhageni foi realizado no Brasil (NASCIMENTO et al., 2004a; NASCIMENTO et al., 2004b). Em 2006, os genomas de duas linhagens de *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo foram seqüenciados em um mesmo projeto realizado na Austrália (BULACH et al., 2006) e, finalmente, na França foi publicado um trabalho sobre o seqüenciamento da espécie de leptospira de vida livre *L. biflexa* sorovar Patoc (PICARDEAU et al., 2008). As duas espécies patogênicas possuem dois cromossomos, um maior (3,6 a 4,3 mb) e outro menor (316 a 358 kb) e, na espécie de vida livre, além dos dois cromossomos semelhantes ao das espécies patogênicas, observa-se uma terceira unidade de replicação de cerca de 74 kb. Recentemente, outra espécie patogênica *L. santarosai* serovar Shermani também teve seu genoma sequenciado em Taiwan e apresentou um cromossomo de 3,4 mb, dentro da faixa de tamanho dos cromossomos das duas espécies patogênicas seqüenciados anteriormente (CHOU et al., 2012).

Estudos comparando os genomas dos sorovares Copenhageni e Lai de *L. interrogans* mostraram uma grande semelhança geral entre os dois sorovares, embora existam diferenças estruturais significativas, incluindo uma grande inversão cromossômica e extensa variação no número e distribuição dos elementos das sequências de inserção (NASCIMENTO et al., 2004a). Por outro lado, observou-se que o genoma de *L. borgpetersenii* é cerca de 700 kb menor que o genoma de *L. interrogans*, e que tal diminuição parece estar relacionada à atividade de elementos de inserção (BULACH et al., 2006). Os genes ausentes nesta espécie

são principalmente aqueles relacionados à detecção de sinais ambientais, e ao transporte e utilização de metabólitos. Essa diferença sugere que a capacidade de sobreviver em ambientes fora do hospedeiro estaria sendo prejudicada em *L. borgpetersenii*. Segundo os autores, esta espécie estaria se especializando em um ciclo de vida com dependência estrita à transmissão de hospedeiro para hospedeiro. De fato a sobrevivência de *L. borgpetersenii* em ambiente aquático é muito menor que a de *L. interrogans* (BULACH et al., 2006). Quando se compara o genoma das duas leptospiros patogênicas com o genoma da espécie de vida livre *L. biflexa*, essa hipótese é reforçada, uma vez que *L. biflexa* possui um maior número de genes de detecção de sinais ambientais quando comparado a *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*. Outro ponto levantado por Picardeau e colaboradores (PICARDEAU et al., 2008) é que o genoma de *L. biflexa* e *L. borgpetersenii*, ambas as espécies especializadas em um único ambiente (aquático e hospedeiro mamífero, respectivamente), é menor que o genoma de *L. interrogans*, que teria se tornado maior ao adquirir novas informações genéticas necessárias à sobrevivência nestes dois ambientes. Por fim, a análise comparativa baseada em dados BLASTX revelou que cerca de 73% e 68% das sequências codificadoras deram similaridade com as espécies patogênicas *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*, respectivamente, e cerca de 57% com a espécie saprófita *L. biflexa* (CHOU et al., 2012).

Vários genes identificados nos genomas das leptospiros patogênicas já foram classificados como potenciais candidatos vacinais (FELIX et al., 2011; GAMBERINI et al., 2005; YANG et al., 2006), baseados na metodologia da vacinologia reversa, descrita pela primeira vez por Rappuoli (RAPPUOLI, 2000). Essa estratégia tem revolucionado os estudos dos microrganismos causadores de doenças, mostrando importantes resultados na habilidade de prever alvos potenciais para agentes anti-patógenos e candidatos vacinais (WACK; RAPPUOLI, 2005).

1.2 Adesinas Bacterianas

O passo inicial para a interação patógeno-hospedeiro e colonização do tecido é a adesão à superfície do hospedeiro. Uma vez aderida a uma superfície celular, os patógenos são capazes de iniciar processos bioquímicos específicos que incluem proliferação, secreção de toxina e invasão celular que culminam com o aparecimento dos sintomas da doença (WILSON et al., 2002).

A busca por candidatos vacinais está focada, principalmente, na identificação de proteínas expostas na superfície de bactérias. Parte destas proteínas são adesinas responsáveis por reconhecer moléculas receptoras específicas na célula-alvo, direcionando o patógeno para uma localização específica no hospedeiro dando início ao processo de infecção (NIEMANN; SCHUBERT; HEINZ, 2004; PATTI et al., 1994; SOTO; HULTGREN, 1999). As moléculas que servem como receptores para os patógenos incluem proteínas presentes na superfície das membranas, imunoglobulinas de superfície, glicolipídeos, glicoproteínas, e proteínas da matriz extracelular como a fibronectina e o colágeno (WILSON et al., 2002).

Até o momento, algumas adesinas de *Leptospira spp.* foram identificadas devido à capacidade de ligação a componentes de matriz extracelular (MEC), a saber: uma proteína do tipo endostatina que se liga a fibronectina, laminina e proteínas reguladoras do sistema complemento (STEVENSON et al., 2007); uma lipoproteína de membrana externa, LipL32, que se liga especificamente a colágeno tipo IV e a fibronectina (HAUK et al., 2008); uma lipoproteína regulada pela temperatura e osmolaridade LipL53 que se liga a laminina, colágeno IV, fibronectina plasmática e celular (OLIVEIRA et al., 2010); seis adesinas de superfície: Lsa21 capaz de se ligar a laminina, colágeno tipo IV e a fibronectina (ATZINGEN et al., 2008), Lsa27 que se liga especificamente a laminina (LONGHI et al., 2009), Lsa63 que se liga a laminina e colágeno IV (VIEIRA et al., 2010), Lsa66 capaz de se ligar a laminina e fibronectina plasmática (OLIVEIRA et al., 2011), Lsa20 que se liga a laminina e também a plasminogênio humano (MENDES et al., 2011), Lsa25 e Lsa33 que são capazes de se ligar a laminina, essa última também se adere a plasminogênio e C4bp (proteína reguladora do sistema complemento) (DOMINGOS et al., 2012); uma proteína de ligação a fibronectina com massa de 36 KDa que foi identificada como importante no processo de adesão e responsável pela virulência em *L. interrogans* (MERIEN et al., 2000); duas proteínas de superfície induzidas por osmolaridade, LigA e LigB, se aderem a MECs imobilizadas e a proteínas plasmáticas como colágeno tipo I e IV, laminina, fibronectina III, fibrinogênio, elastina (CHOY et al., 2007; HUANG et al., 2009; LIN et al., 2008; LIN et al., 2009a); a proteína TlyC que se liga a laminina, colágeno IV e fibronectina (CARVALHO et al., 2009); uma proteína de membrana externa (OmpL37) que é capaz de se ligar a pele e a elastina, além de ser expressa por leptospiros patogênicos durante a infecção (PINNE; CHOY; HAAKE, 2010).

Portanto, sabendo-se que as adesinas contribuem para a virulência bacteriana, estudos focando os mecanismos moleculares envolvidos na interação entre adesina-receptor parecem ser fundamentais para um melhor conhecimento sobre o processo de infecção por leptospiros.

Por isso, esforços estão sendo feitos para o desenvolvimento de vacinas ou drogas antimicrobianas que permitam bloquear os primeiros estágios de infecção, a aderência à célula receptora, e assim prevenir a infecção bacteriana. As vacinas baseadas em adesinas também demonstraram ser eficazes na proteção contra a infecção (WIZEMANN; ADAMOU; LANGERMANN, 1999).

1.3 *Phage Display*: Bibliotecas apresentadas em fagos

A metodologia do *phage display* foi descrita pela primeira vez por George Smith (1985) ao demonstrar que fagos filamentosos (vírus de bactérias/bacteriófagos) poderiam ser utilizados para apresentar peptídeos antigênicos fundidos a proteína pIII do capsídeo viral. Basicamente, bacteriófagos da família Inoviridae (M13, fd, f1) são utilizados para a produção de proteínas de interesse fusionando-se geneticamente peptídeos exógenos à porção amino-terminal da proteína III, o que não impede a montagem da partícula viral e possibilita a incorporação do peptídeo exógeno ao capsídeo viral. A expressão da proteína de fusão no capsídeo de fagos ocorre de maneira acessível ao reconhecimento por um ligante. Por manipulação genética fusiona-se uma biblioteca de DNA codificando para milhões de variantes de ligantes (e.g. peptídeos, proteínas, anticorpos) a um dos genes que codificam uma proteína do capsídeo viral (pIII, pVI ou pVIII). Essas construções são introduzidas em células bacterianas e passarão a processar a informação genética da proteína de fusão, juntamente com as demais proteínas do fago auxiliar, o que resultará na formação de partículas virais contendo a proteína de interesse acoplada ao capsídeo viral (SMITH, 1993; POSNER et al., 1994; WEBSTER, 2001). A infecção ocorre via pilus sexual de bactérias gram-negativas que apresentam o gene desta fímbria codificado pelo plasmídeo F. A liberação das partículas virais que são produzidas a cada ciclo se realiza a partir da extrusão do DNA através da membrana, sem que haja a lise celular (WEBSTER, 2001) (Figura 3).

Figura 3 - Ciclo de vida do fago filamentoso

O fago filamentoso se liga ao pilus F de uma célula hospedeira (*E. coli*) através da proteína pIII. Em seguida, a proteína TolA despolimeriza as proteínas que revestem o fago que permanecem na membrana externa para serem reutilizadas. A simples fita DNA (ssDNA) do fago entra no citoplasma e se converte em dupla fita DNA (dsDNA), e inicia a replicação e expressão utilizando as proteínas do hospedeiro. A ssDNA e os dímeros da proteína pV formam os precursores do fago. Por fim, pV é substituído pela proteína de revestimento pVIII no canal formado pelas proteínas pI, pXI, pIV e uma tioredoxina do hospedeiro. O fago se torna maduro pelo término de sua montagem e é liberado.

Fonte: (HUANG, BISHOP-HURLEY E COOPER 2012)

A possibilidade de expressão de uma proteína de fusão no capsídeo de fagos, de maneira acessível ao reconhecimento por um ligante, abriu o caminho para a construção de bibliotecas conformacionais apresentadas na superfície dessas partículas virais. A seleção dos fagos que expressam o ligante de interesse envolve um enriquecimento sequencial de fagos que se ligam mais especificamente ao alvo dentre um vasto repertório de clones. Isso é conseguido por meio de ciclos sucessivos de seleção (*panning*) onde cada ciclo compreende uma etapa de ligação do fago ao alvo, captura dos fagos ligados, eluição e amplificação (MARKS et al., 1991). Após ciclos de infecção e re-infecção obtêm-se populações de fagos

que expressam a melhor combinação do ligante de interesse para o alvo em questão. Qualquer método que permita isolar os fagos ligados pode ser usado na seleção, assim sendo, várias metodologias de seleção foram propostas, desde antígeno aderido a um substrato sólido, ou em colunas de afinidade, utilização de antígenos biotinilados ou magnéticos, seleção em células procarióticas fixas, em células de mamíferos, seleção subtrativa, enriquecimento em fragmentos de tecidos e até em animais vivos (HOOGENBOOM et al., 1998). A combinação da apresentação e o enriquecimento de formas ligantes ao longo do processo de seleção é a principal característica da técnica de *phage display*.

Os principais vetores utilizados nessa técnica são do tipo fago ou fagomídeo. Basicamente, os vetores do tipo fagomídeo são plasmídeos que carregam o gene da proteína recombinante do capsídeo e a origem de replicação do bacteriófago M13 (BARBAS et al., 2001). Nesse tipo de sistema, o DNA do fagomídeo é empacotado em partículas virais com a ajuda de um fago auxiliar que fornece todas as proteínas e enzimas do fago selvagem, necessárias para a replicação do fago. A proteína de fusão do capsídeo é apresentada em partículas virais que contêm os genomas do fagomídeo e do fago auxiliar. Essas partículas que apresentam os dois genomas, por sua vez, podem ser selecionadas através de marcador de seleção (BARBAS et al., 1991). O fago auxiliar possui origem de replicação deficiente e seu genoma é ineficientemente empacotado quando comparado ao fagomídeo (BARBAS et al., 2001).

Assim, surgiu o conceito bibliotecas de *phage display* permitindo que essa técnica fosse amplamente utilizada na identificação de peptídeos ligantes de praticamente qualquer alvo biológico, tais como, anticorpos (GRIFFITHS; DUNCAN, 1998), receptores (NYGREN; UHLEN, 1997), enzimas (KAY, 1996), moléculas de adesão (PASQUALINI; KOIVUNEN; RUOSLAHTI, 1997) entre outros (BENHAR, 2001). Essa metodologia vem sendo utilizada para varrer a superfície de células, tecidos ou órgãos em busca de novos marcadores moleculares (BAR; YACOBY; BENHAR, 2008; CHOI et al., 2008; KELLY et al., 2008).

Entre os trabalhos que se utilizam dessa técnica com aplicabilidade e potencial terapêutico, destaca-se o estudo de endereçamento de tumores. Esse estudo vem sendo explorado desde 1996, quando Pasqualini e Ruoslahti utilizaram bibliotecas de fagos apresentando peptídeos randômicos para seleção *in vivo* na busca por moléculas ligantes na superfície endotelial de tecidos como cérebro e rim. Desde então, outros estudos envolvendo seleção *in vivo* apresentando essa metodologia vem sendo explorado (GEORGE; RITTER, 2000; JOHNS; LEE et al., 2007; LO; LIN; WU, 2008; RAJOTTE et al., 1998). Numa abordagem ímpar, utilizando pacientes terminais com câncer, ARAP e colaboradores (ARAP

et al., 2002) realizaram uma seleção *in vivo* por peptídeos ligantes da vasculatura de tecidos específicos, sugerindo que bacteriófagos poderiam ser administrados em humanos, tornando possível a caracterização do perfil molecular dos vasos sanguíneos sob condições específicas. Além das buscas por novos marcadores tumorais, estudos com bibliotecas apresentadas em fagos contra doenças endêmicas tais como dengue (CABEZAS et al., 2008) e malária (LANZILLOTTI; COETZER, 2008) também têm sido explorados com o intuito de se buscar novos agentes terapêuticos e/ou possíveis candidatos vacinais.

Recentemente, Antonara e colaboradores (ANTONARA et al., 2007) utilizaram essa metodologia de seleção *in vivo* para a busca por ligantes localizados no tecido endotelial de órgãos. Os alvos são, portanto, selecionados pelos fagos apresentando fragmentos genômicos da espiroqueta *Borrelia burgdorferi*, agente etiológico da doença de Lyme, uma zoonose transmitida por carrapatos. Um dos objetivos desse trabalho foi a busca por adesinas do patógeno envolvidas na interação com os receptores que estão sendo expressos no sistema vascular dos camundongos durante a infecção. Após alguns ciclos de seleção, foi identificada uma adesina com a atividade confirmada e outros novos candidatos a adesinas.

Phage display tem sido amplamente utilizado na identificação de peptídeos específicos e anticorpos alvos contra patógenos. Essa abordagem pode ser dividida em duas categorias:

- a) na busca por alvos moleculares, tais como enzimas de replicação ou divisão celular e fatores de virulência patógeno-hospedeiro;
- b) o uso de bactérias inteiras.

Ambas as estratégias têm sido amplamente utilizado para o desenvolvimento de novos instrumentos de diagnóstico e terapêuticos nos tratamentos de doenças infecciosas (HUANG; BISHOP-HURLEY; COOPER, 2012). Muitos são os exemplos onde se utilizaram bibliotecas de *phage display* para busca de um alvo molecular que possa servir como potenciais inibidores da interação do patógeno com o seu hospedeiro, entre eles, a adesina SdrC de *Staphylococcus aureus*, utilizada como anti-*S. aureus* (BARBU et al., 2010); o inibidor de peptídeo FTsZ de *Pseudomonas aeruginosa*, importante para o desenvolvimento de uma nova droga antimicrobiana anti-*P. aeruginosa* (PARADIS-BLEAU; SANSCHAGRIN; LEVESQUE, 2004); modelo de membrana bacteriana para a criação de novos antibióticos (XIE et al., 2006); LPS para desenvolver agentes anti-bactérias gram-negativas (KIM et al., 2005; THOMAS et al., 2003); anticorpos contra os vírus H5N1 encontrados em uma biblioteca genômica, podendo ser utilizados para mapear epítomos, diagnósticos e no desenvolvimento de vacinas (KHURANA et al., 2009). Além disso, com o objetivo de se

identificar proteínas do hospedeiro capazes de interagir com a proteína de membrana LipL32, Chaemchuen e colaboradores (2011) utilizaram uma biblioteca de peptídeos randômicos e fizeram *panning* contra a proteína recombinante LipL32. Após três ciclos de seleção, eles identificaram seis diferentes sequências peptídicas identificadas no banco de dados de proteínas que servem como alvos potenciais ligadoras de LipL32: canal de cloro acessório 2, glicoproteína VI, SREC-I, coronina 2A, laminina alfa-5, colágeno XX e receptor de prostaglandina EP1 (CHAEMCHUEN et al., 2011).

Uma das vantagens nos *screenings* de bibliotecas moleculares é a possibilidade de se trabalhar com um número grande de pares de proteínas e ligantes reduzindo o tempo na identificação dos produtos dos genes. *Phage display* parece ser uma tecnologia útil na geração de informações e no fornecimento de ferramentas necessárias para facilitar as pesquisas em genômica funcional como identificar a função e entender as vias de que participam as proteínas codificadas pelos milhares de genes revelados pelos genomas.

Assim, estudos com leptospiros utilizando essa abordagem parecem mostrar viabilidade, já que ainda não está muito claro como ocorre a interação dessas bactérias com o sistema dos hospedeiros acometidos por essa doença. Leptospiros patogênicos causam uma zoonose de importância mundial e mesmo diante dos genes identificados no genoma das leptospiros patogênicos classificados como potenciais candidatos vacinais (FELIX et al., 2011; GAMBERINI et al., 2005; YANG et al., 2006), a busca por novas respostas ainda continua. Acredita-se, portanto, que as contribuições nesses estudos possam trazer alguma relevância para uma melhor compreensão e identificação de potenciais proteínas candidatas com fins terapêuticos, diagnósticos e/ou vacinas.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral a caracterização de novas adesinas de *Leptospira* sp. por meio da técnica de *phage display*. Para isso, foram realizadas as seguintes etapas:

- construção de uma biblioteca de bacteriófagos a partir de fragmentos de DNA genômico da espiroqueta *Leptospira* sp (*Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni) em vetores do tipo fagomídeo;
- seleção *in vivo* e *in vitro* da biblioteca de *L. interrogans* sorovar Copenhageni para a identificação de proteínas que possam mediar a interação da bactéria com diferentes tecidos do hospedeiro;
- identificação de possíveis proteínas candidatas para uso terapêutico/diagnóstico e/ou identificação de proteínas candidatas vacinais;
- validação das proteínas selecionadas pela sua clonagem, expressão, purificação e caracterização da proteína recombinante produzida em *Escherichia coli*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção e cultivo de leptospiros

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

3.2 Isolamento do DNA

Culturas de leptospiros foram submetidas à centrifugação a 6500 RPM por 30 min e lavadas por duas vezes em PBS. O DNA genômico foi isolado das bactérias com uma solução de guanidina-detergente (DNAzol[®] Reagent, Invitrogen[™], Life Technologies do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante.

3.3 Construção da biblioteca

Toda a metodologia da construção da biblioteca de bacteriófagos está baseada nos procedimentos descritos por Barbas e colaboradores (BARBAS et al., 2001) e Jacobsson e colaboradores (JACOBSSON et al., 2003). Os vetores que foram utilizados para a construção da biblioteca são do tipo fagomídeo gentilmente cedidos pela Dra. Karin Jacobsson e Lars Frykberg, Departamento de Microbiologia da Universidade Sueca de Ciências Agrárias (Suécia). O vetor fagomídeo pG3DSS (Figura 4a), por exemplo, é um derivado do pG8SS ambos construídos por Rosander e col. (ROSANDER et al., 2002). O pG3DSS possui uma versão truncada do gene III que codifica a proteína pIII do capsídeo viral e não possui peptídeo sinal tampouco o sítio de ligação ribossomal. Ele contém o promotor *spa* proveniente da proteína A de *Staphylococcus aureus*, seguido pelo sítio de clonagem e um alvo de afinidade (*E-tag*) em fusão com o pIII. E-tag é um pequeno peptídeo reconhecido por

anticorpos monoclonais comerciais permitindo assim, a seleção das proteínas fusionadas apresentadas pelo fago. As proteínas pIII do capsídeo estão presentes em 3 a 5 cópias por fago e estão ancoradas à membrana celular por uma âncora localizada na região C-terminal. A porção N-terminal das proteínas pIII, necessária para infecção em *E.coli* e a C-terminal, importante para a formação das partículas virais se apresentam separadas por um espaçador rico em glicina. Os últimos 93 aminoácidos da porção C-terminal são essenciais para finalizar a montagem e a liberação dos fagos da membrana celular (ROSANDER et al., 2002). O outro vetor utilizado para construção da biblioteca, pG8SAET, pode ser visualizado na figura 4b. Esse último, apresenta promotor e sequência sinal de *S.aureus* e fusão com o gene VIII que codifica a proteína do capsídeo viral (JACOBSSON et al., 2003).

Figura 4 - Desenho esquemático dos vetores tipo fagomídeo utilizados para construção das bibliotecas

(a) Fagomídeo pG3DSS (b) Fagomídeo pG8SAET.

Fonte: Adaptado (JACOBSSON et al., 2003)

O DNA genômico de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni foi fragmentado por sonicação, testando diferentes tempos (*Homogeneizador 4710* - Cole Parmer). Em seguida os fragmentos gênicos foram purificados a partir de um gel de agarose entre uma faixa de 0,2 a 2,3 kbp. Em seguida, os produtos foram tratados com T4 DNA polimerase (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., Lafayette, CO, USA) para deixar as extremidades cegas e, por fim, foram purificados com o kit comercial *QIAquick PCR Purification Kit*, QIAGEN (QIAGEN Biotecnologia Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil). O vetor foi digerido com a enzima de restrição *Sna*BI (Fermentas), tratado com fosfatase alcalina (Fermentas) para remoção do grupo fosfato 5' evitando que o vetor torne a se ligar. Testes de ligações foram realizados para verificar a eficiência do vetor. Após incubar por 16 horas as reações de

ligação, para obtenção das bibliotecas (vetor, contendo o DNA genômico de leptospira fragmentado), foi feito um *pool* dessas, seguido da adição de tRNA de levedura (Invitrogen™) e precipitado com etanol e, assim, eletrotransformado (2,5 kV, 25 μ F, 400 Ω) em bactérias eletrocompetentes *E. coli* TG1 [F+ $\Delta(lac-pro)$ *supE thi hsd* Δ 5/P *traD*36 *proA+B+* *lacI*^q, *lacZ* Δ M15]. Uma biblioteca de grande cobertura requer bactérias eletrocompetentes com frequência de transformação de 10^9 - 10^{10} transformantes por μ g de DNA (JACOBSSON et al., 2003). Após a transformação, as células foram imediatamente transferidos para frascos contendo meio LB (37 °C). Em seguida foi coletada uma alíquota da cultura para a determinação do número total de transformantes e assim, a continuação do crescimento da cultura para a adição de aproximadamente 10^{11} pfu de bacteriófago auxiliar M13K07 (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Após essa infecção, amostras foram plaqueadas para posterior escolha de clones positivos cujo procedimento foi realizado por sequenciamento. Juntamente com o número total de transformantes, os resultados dos clones positivos indicaram o tamanho da biblioteca. A biblioteca foi alíquotada e mantida a -70 °C para uso posterior.

Vale ressaltar que diferentes bibliotecas contendo fragmentos variados de DNA genômico foram construídas. A biblioteca que contém insertos de DNA genômico entre: 2300 a 565 bp foi denominada como “biblioteca de fragmentos de tamanho maior” e a que apresenta insertos entre 545 a 125 bp foi chamada de “biblioteca de fragmentos de tamanho menor”. Portanto, foram construídas as seguintes bibliotecas: “pG3DSS+fragmentos de tamanho maior”, “pG3DSS+fragmentos de tamanho menor”, “pG8SAET+fragmentos de tamanho maior” e “pG8SAET+fragmentos de tamanho menor”.

3.4 Preparo da biblioteca para injeção em hamster

Foram adicionados ao meio de cultura de recuperação das partículas de fago aprotinina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e benzamidina HCl (Sigma-Aldrich), ambos inibidores de tripsina. Após cultivo a 37 °C, sob agitação durante a noite, as partículas de fago do sobrenadante foram filtradas e depois precipitadas com PEG/NaCl (COBURN et al., 1999). Antes de injetar nos animais, o sobrenadante contendo os fagos, foram ressuspensos em tampão salina HEPES (25mM HEPES pH7.5, 150mM NaCl) suplementado com aprotinina e benzamidina (HBSAB).

3.5 Linhagem do modelo animal utilizado no *panning in vivo*

O modelo de experimentação utilizado nos experimentos de seleção em tecidos de animais vivos foi hamster sírio/dourado *Mesocricetus auratus*.

3.6 *Panning* contra tecidos de hamster

A seleção em tecidos foi realizada em dois experimentos distintos. O primeiro experimento, utilizando a biblioteca com o vetor pG3DSS com fragmentos maiores, foi adaptado e baseado nos protocolos conforme os trabalhos de Pasqualini e col. (PASQUALINI et al., 2001) e Antonara e col. (ANTONARA et al., 2007). Para adaptar ao nosso modelo animal, hamster que não possui veia caudal, foi necessário mudar a forma de inoculação das bibliotecas que não foi realizada de forma intravenosa pela veia caudal e sim diretamente no coração do animal. Para isso, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com avertin 2,5% (PAPAIOANNOU; FOX, 1993) e submetidos a uma abertura na cavidade torácica de forma a deixar exposto o coração. Após 5 minutos de circulação dos fagos, o coração foi perfundido com a injeção de HBSAB pelo ventrículo esquerdo. Para a análise da primeira etapa de seleção, tecidos como fígado, rim, pulmão e baço foram coletados, lavados com HBSAB, transferidos para tubos previamente pesados contendo HBSAB e mantidos em gelo seco. Após pesagem dos tecidos, os mesmos foram homogeneizados e preparados para infectar bactérias TG1, seguido do seu crescimento em placas contendo o antibiótico de seleção.

O segundo experimento, utilizando a biblioteca com o vetor PG3DSS com fragmentos menores (insertos de DNA genômico que variam entre 545 a 125 pb), foi baseado nos protocolos descritos por Pasqualini e col. (PASQUALINI et al., 2001) e Hoffman e col. (HOFFMAN et al., 2004) com pequenas adaptações. A perfusão foi realizada inicialmente com 10 mL de tampão citrato no ventrículo esquerdo com o auxílio de um pequeno catéter. Quando o sangue arterial fluiu no cateter (durante a contração cardíaca), foi feita uma pequena incisão no átrio direito para a saída do sangue. A perfusão foi feita até que a circulação estivesse livre de sangue. Em seguida, o animal foi mergulhado em etanol 70% e etanol 100% para evitar contaminação. Os fagos foram recuperados removendo os órgãos de interesse, pesados e homogeneizados manualmente em 1,0 mL de DMEN-PI (DMEN / PMSF 1mM / Aprotinin 20 µg/mL / Leupeptin 1µg/mL) (Sigma-Aldrich). Os tecidos foram lavados

por três vezes com 1,0 mL de tampão de lavagem (DMEN-PI com BSA 1%) da seguinte maneira: misturados no tampão de lavagem por alguns segundos; centrifugados por 5 minutos a 3000 RPM; o sobrenadante descartado cuidadosamente sem perturbar o precipitado. Todo o procedimento foi realizado a 4 °C. Após as lavagens os tecidos foram incubados com 1,0 mL da bactéria TG1, para infecção, por 15 minutos a temperatura ambiente. Uma alíquota foi retirada para saber a quantidade de fagos que foi recuperada (*output*). Em seguida a infecção foi expandida em 10 mL de meio LB contendo ampicilina 100 µg/mL por 30 minutos a temperatura ambiente e depois plaqueada em diferentes volumes (em triplicata) em meio sólido LB/ampicilina 100 µg/mL e incubados por 16 horas a 37 °C. Para amplificar os fagos recuperados, as placas foram lavadas com meio 2YT e expandido para 100 mL contendo ampicilina 100 µg/mL por 4 horas a 37 °C sob agitação. Em seguida foi adicionado 10⁹/mL de fago auxiliar M13K07. Após duas horas de incubação, foram adicionados 50 µg/mL de kanamicina para amplificação por 14 horas. O amplificado foi então centrifugado para obtenção dos fagos para serem utilizados na seleção do ciclo subsequente. Para a seleção em um determinado tecido, rim, por exemplo, somente foram retirados do animal o órgão de seleção (rim) e o órgão controle (baço). Portanto, um animal foi utilizado para a seleção em um tecido específico. A figura 5 ilustra resumidamente a seleção nos tecidos do hamster.

Figura 5 - Esquema do princípio da seleção *in vivo* da biblioteca de fagos

Fonte: Modificado (ARAP, 2005)

3.7 Panning contra soro de pacientes infectados por leptospiras imobilizado em microplacas

Essa seleção foi realizada utilizando a biblioteca contendo o vetor PG3DSS fusionado aos fragmentos de tamanho menor (insertos de DNA genômico que variam entre 545 a 125 pb). A seleção foi realizada utilizando microplacas do tipo Maxisorp (Nunc®). Antes do primeiro ciclo de seleção, foi feita uma incubação da biblioteca, por duas vezes em soro humano não infectado, em uma diluição 1/20 por 1 hora a 37 ° C cada vez. Os fagos não adsorvidos foram então incubados com amostras de soro de pacientes infectados, em uma diluição de 1/200: (1) soro17/09, soro IgM reagente e (2) soro20/09, soro IgM não reagente por duas horas a temperatura ambiente juntamente com o tampão de ligação (tampão fosfato salina contendo 2% BSA e 0,05% tween 20). Foram realizadas 25 lavagens com PBS-T (tampão fosfato salina com 0,05% tween 20) antes de eluir os fagos que apresentavam afinidade pelos soros de pacientes. Para isso, foi feita uma incubação por 10 minutos com tampão de eluição (citrato de sódio 50 mM e cloreto de sódio 140 mM pH 2,0) e neutralizado com tampão de neutralização (2 M Tris pH 8,0). O eluato foi utilizado para infectar 1,0 mL de *E. coli* TG1 (com absorvância de 0,5 a 600 nm) por 15 minutos a temperatura ambiente e adicionado em 10 mL de LB. Uma alíquota da TG1 infectada foi retirada para saber o título do material infectado. Em seguida, foi adicionado ampicilina 20 µg/mL e incubada por 1 hora. Após 1h, a concentração do antibiótico foi completada para 50 µg/mL e a cultura incubada por mais 1 hora. Após 1 hora, foi adicionado à cultura 1,0 mL de fago *helper* (10⁹ fagos/mL) e transferido para 100 mL de cultura contendo 50 µg/mL de ampicilina. Após 2 horas de incubação, foram adicionados à cultura 50 µg/mL de kanamicina. Após 16 horas de incubação, a cultura foi centrifugada por 10 minutos a 10 000 x g a 4 ° C. O sobrenadante foi armazenado para as etapas seguintes de seleções do ligante afim. A cada ciclo foram selecionados clones para confirmação por seqüenciamento.

Cabe ressaltar que as amostras de soro de pacientes infectados foram previamente imobilizadas nas microplacas, bloqueadas com 2% BSA por 1 hora a temperatura ambiente. Após o bloqueio foram realizadas cinco lavagens com PBS-T antes de incubar o eluato que passou pelo soro humano não infectado. Esse experimento foi realizado de forma independente para cada soro de paciente. Os soros de pacientes infectados foram gentilmente cedidos pela Dra. Eliete Romero do Instituto Adolf Lutz.

3.8 Panning contra proteínas de matriz extracelular imobilizadas em microplacas

Com o objetivo de se padronizar a metodologia, foi realizada uma varredura preliminar da biblioteca contendo o vetor pG3DSS fusionado aos fragmentos de tamanho maior. Dois experimentos independentes foram realizados. Para isso, microplacas do tipo Maxisorp (Nunc[®], Thermo Fisher Scientific Inc., Lafayette, CO, USA) foram cobertas com 100 µg matrigel (BDTM, Sparks, MD, USA) que é composto por uma mistura de proteínas de matriz extracelular (laminina, colágeno IV, heparan sulfato proteoglicano, entactina/nidogen) ou cobertas com 10 µg heparan sulfato proteoglicano (Sigma-Aldrich), incubadas a 4 °C por 16 horas. Em seguida, a placa foi bloqueada com 2% de BSA por 1 hora a temperatura ambiente. Após bloqueio foi realizada cinco lavagens com PBS-T (tampão fosfato salina com 0,05% de tween 20) para então incubar a biblioteca. No primeiro ciclo da seleção, a biblioteca (10⁸ fagos/mL) foi incubada duas vezes com BSA 1,0 µg a 37 °C por 1 hora cada vez para então, incubar com 100 µg de matrigel por 2 horas (1 hora a 37 °C e 1 hora a temperatura ambiente sob leve agitação) Novas lavagens foram realizadas (25 lavagens). O processo de lavagem é extremamente importante para a retirada do material que não possui interação com matrigel. Toda etapa de eluição dos fagos ligados e amplificação do eluato foi realizada conforme descrito no item 3.7.

3.9 Panning contra anticorpo monoclonal anti-*Etag* imobilizado em microplacas

Esse procedimento foi baseado nos ensaios de Rosander e colaboradores (2002) com pequenas adaptações. Cabe ressaltar que para este processo, foi realizada a construção de uma nova biblioteca utilizando o vetor pG8SAET contendo fragmentos de DNA genômico de leptospira com um tamanho médio de 500 pb. Todo o procedimento foi realizado de acordo com o que foi descrito anteriormente no item “construção da biblioteca”, com exceção ao tamanho selecionado, desta vez, fragmentos de 500 pb. Microplacas do tipo Maxisorp (Nunc[®]) foram cobertas com três microgramas de anticorpo monoclonal anti-*Etag* (Abnova, abcam[®] Jhongli, Taoyuan County, Taiwan) em tampão PBS por 16 horas a 4 °C. Os poços foram lavados com PBS-T e o bloqueio feito com caseína (100 µg/ml) por uma hora a temperatura ambiente. Após o bloqueio, os poços foram novamente lavados por três vezes com PBS-T e em seguida foram adicionados 150 µL da biblioteca de fagos, incubada previamente por uma hora a temperatura ambiente com a solução de bloqueio. A biblioteca foi incubada por 4 horas na primeira vez e por duas horas nas incubações subseqüentes (total

de três incubações). Após as incubações, os poços foram lavados por 30 vezes com PBS-T. Os fagos ligantes foram recuperados após incubação por 10 minutos com tampão de eluição (citrato de sódio 50 mM, cloreto de sódio 140 mM pH 2,0), neutralizado com tampão Tris 2 M pH 8, e posteriormente utilizado para infectar 2,0 mL de *E. coli* TG1 por 30 minutos a 37 °C sem agitação. Em seguida a cultura foi espalhada em placas de contendo LB sólido contendo ampicilina (50 µg/mL) e incubada a 37 °C por 12 horas. Clones foram selecionados para extração de seu DNA e análises por seqüenciamento.

3.10 Oligonucleotídeos para seqüenciamento

Oligonucleotídeos (*forward* e *reverse*) para cada vetor foram desenhados para realizarmos a confirmação dos clones por seqüenciamento.

3.11 Análise de fagos (clones) selecionados

A cada ciclo, foram selecionados clones para extração de DNA do fagomídeo para análises por seqüenciamento automático pelo método de Sanger, identificação através de busca por similaridade em banco de dados públicos – BLAST e confirmações dos insertos ligantes utilizando as ferramentas de bioinformática do programa Vector NTI® Invitrogen™. Outras ferramentas tais como SMART, PSORTb, Pfam 24.0 também foram utilizados para análises de clones para possíveis inferências de funções biológicas.

3.11.1 Preparação de DNA plasmidial dos clones selecionados

Para o isolamento dos fagomídeos, foi realizado a inoculação dos clones selecionados em placas de 96 poços em meio *Circle Grow* (contendo ampicilina 100 µg/ml) e crescidos durante 22 horas a 37 ° C, sob agitação a 320 rpm. Em paralelo a esse procedimento, foi realizado o inóculo desses mesmos clones em 150 µl de meio 2YT ampicilina por 18 horas para sua estocagem em glicerol 15%, a -80 ° C.

Após esse período, as células foram coletadas por centrifugação e a ressuspensão das mesmas foi efetuada com solução de GTE (Glicose 20%; Tris-HCl 1M, pH 7,4; EDTA 0,5 M, pH 8,0) contendo RNase A, 10 mg/ml (ribonuclease A tipo I-A obtida de pâncreas bovino, Sigma-Aldrich). As células ressuspensas foram lisadas com uma solução de NaOH 0,2% / SDS1% por 10 minutos e, em seguida, a reação foi neutralizada com solução de acetato de

potássio 3M. Após incubação por 10 minutos no gelo e por 30 minutos a 90 ° C, seguida de um resfriamento no gelo, todo o conteúdo do DNA plasmidial foi filtrado em placas MAGVN2250 (Millipore, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) de 96 poços, precipitado com isopropanol 75%, em uma centrifugação de 45 minutos e lavado com etanol 70%. O precipitado foi incubado a 37 ° C, em estufa, para a evaporação total do etanol residual e então ressuscitado em água deionizada estéril (de 40 a 80 µl).

As amostras de clones da preparação foram analisadas em gel de agarose 1% para observar o rendimento da extração de DNA plasmidial.

3.11.2 Seqüenciamento do DNA

As reações de seqüenciamentos foram realizadas adicionando 2,0 a 4,0 µl de DNA de cada clone, 1,0 µl (1,6 pmols) do oligonucleotídeo, 3,0 µl do tampão SM (Tris 1,0 M, MgCl₂ 1,0 M, água deionizada), 1,0 µl do reagente Big Dye v 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) que contém a enzima de amplificação e os nucleotídeos, completando com água deionizada para o volume final de 10 µl.. A marcação das amostras foi realizada no termociclador utilizando uma temperatura de desnaturação de 96 ° C por 4 minutos, seguidos de 40 ciclos a 96 ° C por 30 segundos (desnaturação), 52 ° C por 15 segundos (anelamento), 60 ° C por 4 minutos (extensão) e mantidos a 4 ° C.

As amostras foram precipitadas em etanol e ressuscitadas em formamida HiDi (Applied Biosystems). Para a leitura da seqüência nucleotídica foi utilizado o sequenciador automático por eletroforese capilar, modelo ABI3100 (Applied BioSystems), com capilares de 50 cm e polímero de separação POP6.

3.12 Preparação de células eletrocompetentes

O procedimento de preparo das bactérias eletrocompetentes foi baseado em Ausubel e col. (AUSUBEL et al., 1989) modificado por Jacobsson e col. (JACOBSSON et al., 2003): Pré-inóculo de uma colônia de *E. coli* TG1 em meio LB e seu crescimento a 37 ° C sob agitação. No dia seguinte, inóculo de uma alíquota dessa cultura em meio 2YT até D.O. 0,5-0,6 e então resfriada no gelo durante meia hora. Após o resfriamento, a cultura foi centrifugada a 4000 x g por 20 minutos a 4 ° C. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuscitadas em glicerol 10% e incubadas por 30 minutos no gelo. Esta etapa foi repetida de 4-5 vezes e, por fim, as

células foram ressuspensas com um volume igual de glicerol 10% e congeladas imediatamente a -70°C .

3.13 Clonagem, expressão e purificação de proteínas recombinantes

Três proteínas de *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni foram selecionadas para a produção de proteínas recombinantes com o intuito de se validar o ligante que foi selecionado nos experimentos de *panning*. Os clones dessas proteínas recombinantes foram gentilmente cedidos pela Dra. Patrícia Abreu do Laboratório de Microbiologia do Instituto Butantan. Brevemente, os genes que codificam para essas proteínas foram amplificados a partir do DNA de *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni Fiocruz L1-130 (ATCC número BAA-1198) por PCR. Os produtos gerados do PCR foram digeridos com enzimas de restrição que reconhecem as regiões que os flanqueavam, gerando pontas coesivas. Esse material digerido foi ligado ao plasmídeo pAE, previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição.

O vetor pAE (RAMOS et al., 2004) possui um promotor derivado do fago T7, adiciona uma cauda de seis histidinas à porção amino-terminal da proteína recombinante e produz um fenótipo de resistência a ampicilina em bactérias portadoras deste plasmídeo (Figura 6). A região da cauda de histidina presente na porção N-terminal possibilita a purificação de proteínas fusionadas a essa cauda por meio da cromatografia de afinidade a metais bivalente como, por exemplo, afinidade a níquel. O produto da ligação foi transformado em *E. coli* DH5 α competente; as bactérias submetidas à transformação foram selecionadas em placas contendo ampicilina. Colônias foram selecionadas, cultivadas em meio líquido (2YT) e submetidas à extração de DNA plasmidial utilizando-se *kit* comercial da GE Healthcare (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, England). Os plasmídeos foram seqüenciados para confirmar a correta inserção do gene clonado no vetor.

Figura 6 - Figura esquemática ilustrando o vetor de expressão pAE

Fonte: (RAMOS et al., 2004).

3.14 Obtenção de proteínas recombinantes

As construções plasmidiais, contendo cada um dos genes clonados, foram transformadas em bactérias *E. coli* BL21(SI) competentes e selecionadas em meio sólido LB-ON (meio LB sem NaCl) contendo ampicilina, seguida da análise de algumas colônias para se detectar a expressão da proteína recombinante. Para isso, clones foram expandidos em cultivo líquido (LB-ON), e estas culturas foram induzidas com a adição de 0,3 M de NaCl quando atingiram uma densidade óptica (DO) de 0,6 em 600 nm. A bactéria *E. coli* BL21(SI) apresenta o gene da T7 RNA polimerase sob o controle da ação do promotor *proU* de *E. coli* responsivo a osmolaridade, induzível por NaCl (BHANDARI; GOWRISHANKAR, 1997). Após três horas de crescimento, tais cultivos foram centrifugados para a separação das bactérias do meio de cultura. As bactérias centrifugadas foram ressuspensas em tampão de amostra para eletroforese de proteínas e vigorosamente homogeneizadas. Em seguida, as amostras foram submetidas a uma eletroforese. Através da observação de bandas presentes nas amostras induzidas e ausentes nas amostras não induzidas (na massa esperada para a

proteína recombinante), foram escolhidos como clones produtores da proteína recombinante. Os clones escolhidos foram armazenados em 20% de glicerol a -80 °C.

Para a expressão da proteína recombinante em maior escala, um clone produtor foi crescido em um litro de meio LB-ON até atingir a DO de 0,6 a 600 nm, quando foram induzidos por 3 horas com a adição de 0,3 M de NaCl. A seguir, as bactérias foram coletadas através de centrifugação (5000 RPM por 15 minutos), ressuspensas em 100 ml de PBS 1X e congeladas. Após isso, a ressuspensão bacteriana foi lisada fisicamente através de um *French Pressure*. Este lisado foi novamente centrifugado para a separação do sobrenadante do corpúsculo de inclusão (10000 RPM, 30 minutos). O corpúsculo de inclusão foi lavado com 2M uréia e novamente centrifugado (10000 RPM, 10 min). Este procedimento foi realizado por duas vezes; após isso, o corpúsculo lavado foi solubilizado em tampão Tris 20 mM/NaCl 0,5 M/uréia 8 M por 24 horas. Um gel com uma amostra do sobrenadante e do corpúsculo de inclusão foi corrido para se determinar a localização da proteína recombinante nestas subfrações celulares.

3.15 Purificação e diálise das proteínas recombinantes

Uma vez localizada a proteína recombinante, a subfração que a continha foi submetida à cromatografia de afinidade a níquel. A purificação foi realizada a partir do corpúsculo de inclusão, em condição desnaturante (em tampão Tris 20 mM/NaCl 0,5 M/uréia 8 M). A renaturação da proteína recombinante foi realizada a partir do gotejamento de 10 mL da solução contendo os corpúsculos de inclusão solubilizados em 2,0L de tampão Tris 20 mM/NaCl 0,5 M. A solução de renaturação contendo a proteína recombinante foi deixada sob agitação por 22h a temperatura ambiente.

Uma resina quelante (5,0 mL) foi saturada com uma solução de sulfato de níquel (0,3 M) por uma hora. Em seguida, a coluna foi lavada e equilibrada com tampão Tris 20 mM/NaCl 0,5 M e a solução de renaturação foi passada pela coluna; o material não adsorvido foi coletado. Após a passagem da amostra, a coluna foi lavada com 10 volumes (em relação ao volume da resina) de concentrações crescentes de imidazol: 5 mM, 20 mM, 40 mM, 60 mM, 100 mM. Por fim, foi realizada uma eluição do material adsorvido à coluna com 1,0 M imidazol. Todas as amostras coletadas foram submetidas à eletroforese de proteína, para a visualização da fração cromatográfica em que se encontrava a proteína, bem como a sua purificação. As amostras purificadas foram dialisadas com a solução tampão Tris 20 mM/NaCl 0,5 M pH 7,0 ou a solução de tampão fosfato (PBS: NaCl 1,37 mmol/L, KCl 27

mmol/L, Na_2HPO_4 100 mmol/L, KH_2PO_4 14mmol/L pH 7,4) para a retirada do imidazol. Cada diálise foi realizada por pelo menos 4 horas, a 4 °C.

3.16 Obtenção e titulação dos antisoros policlonais

Anticorpos policlonais foram gerados contra todas as proteínas recombinantes obtidas. Para isso, seis camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados por quatro semanas, com a injeção intraperitoneal de dez microgramas da proteína recombinante e 100 microgramas de íon alumínio (no formato de $\text{Al}(\text{OH})_3$) como adjuvante. Os camundongos foram sangrados antes da primeira imunização para a obtenção de um soro pré-imune. Durante o período de imunização, os animais foram semanalmente sangrados, por quatro vezes. Em todas as sangrias, os sangues foram misturados em uma única amostra. Em seguida, foi permitida a coagulação do sangue por 30 minutos a 37 °C, seguido de uma permanência por uma hora a 4 °C. Após esse tempo, o soro foi separado do material coagulado através de centrifugação (2000 RPM, 10 min, 4 °C) e mantido congelado (-20 °C) até o uso.

O título de cada antisoro foi determinado por ELISA. Os poços de uma placa de micropoços foram revestidos com um micrograma da proteína recombinante de interesse, diluída em tampão carbonato-bicarbonato (Na_2CO_3 50 mmol/L, NaHCO_3 50 mmol/L, pH 9,6). O revestimento foi feito a 4 °C por 16 horas. Os poços foram lavados três vezes com PBS-T (tampão fosfato/0,05% de Tween 20) e bloqueados com 10% leite desnatado diluído em PBS-T por uma hora a 37 °C. A solução de bloqueio foi então descartada e os poços foram novamente lavados três vezes com PBS-T. Em seguida, os poços foram incubados por uma hora e meia a 37 °C com diluições crescentes do soro em 1% BSA (albumina sérica bovina) diluído em PBS-T. Por fim, os poços foram lavados três vezes com PBS-T e incubados por uma hora a 37 °C com o anticorpo específico anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase, diluído em 1% BSA PBS-T, de acordo com uma titulação prévia. Após isso, os poços foram novamente lavados três vezes com PBS-T e reveladas com a adição de 0.04% orthophenylenediamina e 0.05% H_2O_2 , diluídos no tampão citrato-fosfato (citrato de sódio 100 mmol/L e fosfato monobásico NaH_2PO_4 300 mmol/L, pH 5,0). Após cerca de 10 minutos, as reações foram interrompidas com a adição de ácido sulfúrico (8N). As placas foram submetidas à espectrometria em 492 nm para leitura e titulação.

3.17 Cromatografia de afinidade a heparina

A proteína recombinante contendo a região carboxi-terminal de LigB (rLB-Ct) foi submetida a cromatografia de afinidade a heparina. Para isso, 0,2 mg/mL de rLB-Ct foi diluído em tampão Tris 20 mM/NaCl 0,15 M, pH6.8. A amostra foi carregada em uma coluna de 1,0 cm de diâmetro (Amersham Pharmacia Biosciences) contendo 1,0 mL de resina *Heparin-Sepharose Fast FlowTM* (GE Healthcare) pré-equilibrada com tampão Tris 20 mM /NaCl 0,15 M, pH 6.8. Após a adsorção da proteína recombinante rLB-Ct, a coluna foi lavada com 20 volumes de tampão Tris 20 mM/NaCl 0,15 M, pH 6.8. A eluição da proteína adsorvida na resina foi realizada por gradiente descontínuo de NaCl: tampão Tris 20 mM pH 6.8 com concentrações crescentes de NaCl: 0,2 M, 0,3 M, 0,4 M, 0,5 M e 1,0 M. As frações eluídas foram submetidas a análises através da leitura dos índices de refração dos tampões e das amostras coletadas, seguidas por eletroforese dessas amostras. Para a leitura do índice de refração, para determinarmos a concentração de NaCl, foi utilizado o refratômetro modelo American Optical Corp. 10423 (Massachusetts Inst. of Technology, Keene, NH, USA) e utilizando soluções de concentrações conhecidas de NaCl.

3.18 Adesão das proteínas recombinantes aos componentes de matriz extracelular (MECs)

A adesão aos componentes de matriz extracelular foi realizada de acordo com Barbosa e colaboradores (BARBOSA et al., 2006). Brevemente, poços de uma placa de micropoços foram revestidos com um micrograma de cada MEC, diluídos em 100 µl de PBS, e incubados por toda uma noite a 4 °C. A solução de revestimento foi então lavada por três vezes com PBS-T (PBS contendo 0,05 % de Tween-20) e os poços bloqueados com 200 µl de BSA 1% em PBS por duas horas a 37 °C. Em seguida, um micromolar de cada proteína recombinante foi adicionado aos poços, e estas foram incubadas por uma hora e meia a 37 °C. Após a incubação, os poços foram lavados por seis vezes com PBS-T e incubados com o antisoro específico da proteína de interesse, diluído em PBS (1:4000), por uma hora a 37 °C. A seguir, as placas foram novamente lavadas por três vezes com PBS-T e incubadas com o anti-IgG peroxidase de camundongos diluídos em PBS (1:5000), por uma hora a 37 °C. Então, os poços foram lavados por três vezes com PBS-T e revelados com a adição de 0,04 % orthophenylenediamina e 0,05 % H₂O₂ diluídos no tampão citrato-fosfato. Após cerca de 10 minutos, as reações foram interrompidas com a adição de ácido sulfúrico (8N). A seguir, as

placas foram submetidas à espectrometria em 492 nm. Os experimentos foram realizados por três vezes, todas em triplicatas.

3.19 Adesão das proteínas recombinantes às diferentes linhagens celulares

As linhagens A31 (célula de fibroblasto de camundongo, *Mus musculus*), LLC-PK1 (célula epitelial de túbulo proximal de rim de porco, *Sus scrofa*) e VERO (célula epitelial de rim de macaco verde, *Cercopithecus aethiops*) foram mantidas em DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por calor, 5 mM de L-glutamina (Gibco), 100 µg/mL de ampicilina e estreptomicina e mantidas a 37 °C em atmosfera contendo 5 % de CO₂. As células confluentes foram lavadas três vezes com 5,0 mL de PBS (por frasco), seguida de tripsinização com uma solução de 3,0 mL de PBS contendo 800 µL de tripsina por 10 minutos a 37 °C. As células foram retiradas dos frascos de cultura e centrifugadas por duas vezes a 1500 x g e ressuspensas em PBS até uma densidade de aproximadamente 10⁶ células/mL. Em seguida, 200 µL de cada célula foram gentilmente fixadas em microplacas com uma solução de formaldeído 0,1% preparada em PBS por 10 minutos a 37 °C. Após lavagem com PBS, as células foram bloqueadas por uma hora com BSA 2%, lavadas e incubadas por duas horas com 1,0 µg de cada proteína recombinante. Para os experimentos de competição, as proteínas foram incubadas com 1,0 µg de cada MEC por uma hora antes de incubar com as células. Os procedimentos seguintes foram realizados de acordo com o item descrito anteriormente com exceção da quantidade de antisoro específico de cada proteína e anti-IgG peroxidase, que foram utilizadas nas diluições 1:5000 e 1:8000, respectivamente.

3.20 Propagação dos clones de bacteriófagos recombinantes

Clones selecionados nos experimentos de *panning* foram propagados para as suas validações. Para isso, *E. coli* do tipo TG1 foram crescidos até uma D.O. 0,6 nm em um volume de 5,0 mL e utilizados para inocular 5,0 µL da placa estoque (glicerol) do clone em questão. Após incubar por 30 minutos a temperatura ambiente, uma alíquota foi retirada para saber o título da infecção, o volume foi aumentado para 50 mL contendo meio de cultura LB acrescido de 20 µg/mL de ampicilina e incubados por 1 hora a 37 °C. Após 1 hora, foi adicionado ampicilina para uma concentração final 50 µg/mL e incubado por mais 1 hora. Em seguida, aproximadamente 10¹¹ pfu de bacteriófago auxiliar M13K07 e 50 mL meio LB

contendo ampicilina 50 µg/mL foram adicionados e deixados por 2 horas a 37 °C sob agitação. Por fim, 50 µg/mL de kanamicina foram adicionados à cultura e incubados a 37 °C sob agitação. Para a recuperação dos fagos, após 16 horas, a cultura foi centrifugada a 3000 x g por 15 minutos a 4 °C. O *pellet* foi armazenado para a extração de DNA plasmidial (*QIAprep Spin Miniprep Kit*, QIAGEN). O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo contendo PEG 8000 4% (m/v) e NaCl 3% (m/v) e incubado por 5 minutos a 37 °C e 300 RPM, seguida de incubação por 30 minutos no gelo. A amostra foi centrifugada a 15000 x g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado de fagos foi ressuspensionado em 1,0 mL de tampão PBS. Um microlitro desse precipitado foi retirado para a titulação e o restante armazenado a 4 °C.

3.21 Experimento de ligação do clone de bacteriófago recombinante à heparina

Como forma de validar o clone selecionado, 10 µg/mL de heparina (Sigma-Aldrich) foram imobilizados em poços de microplaca do tipo Nunc® e incubados a 4 °C por uma noite. No dia seguinte, os poços foram bloqueados com BSA 2 % por 2 horas, seguida por 10 lavagens com tampão PBS. 10⁸ partículas de fagos por poço foram adicionadas e incubadas por 1 hora a 37 °C. Como controle, foi utilizada a mesma quantidade de fago M13K07 (New England, Biolabs). Os poços foram lavados por 25 vezes e os fagos foram eluídos com tampão de eluição, conforme descrito anteriormente no item 3.8. O eluato foi utilizado para infectar 1,0 mL de bactéria TG1, incubados por 15 minutos a temperatura ambiente e plaqueados em meio LB-ágar contendo o antibiótico apropriado (ampicilina 50 µg/mL para o clone e kanamicina 20 µg/mL para M13K07) para contagem de colônias no dia seguinte.

3.22 Ensaio de imunização com fagos e avaliação do seu potencial protetor

Grupos de 10 hamsters fêmeas (*M. auratus*), recém-desmamados que pesavam entre 80 e 120 g, foram divididos em oito grupos de cinco animais cada grupo. Os grupos foram imunizados duas vezes, com intervalos de 15 dias, via subcutânea. Os grupos receberam 50 µg de LigA recombinante; 10¹² de partículas de fagos para as condições: clone E11 (fago que expressa o fragmento de LigA), o quarto ciclo da biblioteca PG3DSS contendo fragmentos maiores, o *pool* da biblioteca pG3DSS e o fago selvagem; 0,1 mL de bacterina (10⁸ células/dose); vacina comercial Farrow Sure® B Pfizer (Laboratórios Pfizer Ltda, São Paulo, Brasil) e PBS. Todas as preparações, exceto as preparações de fagos, continham hidróxido de

alumínio como adjuvante (10µg hidróxido de alumínio para cada 1,0 µg de proteína recombinante). A preparação da bacterina foi realizada de acordo com Silva e colaboradores (SILVA et al., 2007), utilizando cultura de *L. interrogans* sorovar Copenhageni inativada. Os fagos foram amplificados e precipitados como descrito anteriormente, filtrados com membrana 0,2 µm Millipore™ para sua esterilização, e inativados a 65 °C. Os soros dos animais foram coletados através do plexo retrorbital no dia 0 (pré-imune) e no dia 30.

Os animais vacinados foram desafiados intraperitonealmente com *L. interrogans* sorovar Copenhageni, linhagem ATCC BAA-1198, com uma dose de 10^3 vezes a DL50. Para o cálculo da DL50, foram preparados inóculos com diluições do macerado do fígado de hamsters infectados e cultivados em meio EMJH enriquecido a 28 °C. Após duas semanas de cultivo, diferentes diluições dos inóculos foram injetadas em animais sadios para observar a concentração mínima capaz de levar ao óbito 50 % dos animais infectados (DL50). Para calcular a DL50 foi utilizado o método de Reed-Muench (REED e MUENCH, 1938).

3.23 *Streptococcus pneumoniae*

A bactéria *S. pneumoniae* linhagem ATCC 6303, foi crescido em meio contendo ágar-sangue, sem oxigênio a 37 °C. No dia seguinte, foi realizado um pré-inóculo em meio líquido THY (Todd-Hewitt Broth, BD com 0,5% extrato de levedura) e deixado a 37 °C sem agitação. A bactéria foi crescida até uma densidade óptica igual a 1,0 e centrifugada a 6000 RPM por 10 minutos. Para resusper o centrifugado, foram utilizados 5,0 mL de tampão TEN pH 8,0 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM e NaCl 10 mM), seguida da adição de 5,0 mL de DOC (Deoxycholic Acid Sodium Salt, Calbiochem®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e incubado a 37 °C por 3 minutos. Em seguida, adicionou-se 1,0 mL de SDS 10% e incubado por 10 minutos a 65 °C. Um volume igual de fenol tamponado foi adicionado e misturado por 2 minutos, seguida de uma centrifugação a 6000 RPM por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa superior foi coletada e transferida para um tubo novo para uma nova extração com fenol. Foi adicionado um volume igual de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) e centrifugado a 14000 RPM por 15 minutos a 4 °C. Coletou-se a fase aquosa superior e foi realizada uma precipitação com três volumes de etanol 100 % contendo NaCl 0,2 M, centrifugado a 10000 RPM por 15 minutos a 4 °C. O precipitado foi ressuscitado em 500 µL de TE (Tris-HCl 10 mM /EDTA 1mM) e uma alíquota foi submetida para análise em gel de agarose.

Todos os procedimentos das etapas de construção das bibliotecas, descritos anteriormente, foram realizados e adaptados para a bactéria *S. pneumoniae* para a padronização da metodologia, já que é uma bactéria de rotina do nosso laboratório.

4 RESULTADOS

4.1 Isolamento e quantificação dos vetores

Os vetores do tipo fagomídeo (pG3DSS e pG8SAET) foram transformados e isolados através de um kit comercial para extração de DNA plasmidial - *MIDIPREP Purification Kit* QIAGENTM - podendo ser visualizados na figura 7. Os vetores foram confirmados por seqüenciamento. Para a quantificação do material, foi realizada a leitura por espectrofotometria - NanoDrop ND-100TM Thermo Scientific. A tabela 1 mostra a quantificação dos vetores.

Figura 7 - Gel de agarose 1 % para a visualização da preparação dos vetores

(1) clone 1 de pG3DSS, (2) clone 2 de pG3DSS, (3) clone 1 de pG8SAET, (4) clone 2 de pG8SAET, (5) 1,0 µg Marcador molecular λ HindIII (Invitrogen). (1) ao (4) 2,0 µl de material.

Tabela 1 - Quantificação da preparação dos vetores do tipo fagomídeo por espectrofotometria

Amostra	Quantificação	Relação	Total de material
	ng/ µl	260/280 (nm)	µg
pG3DSS (1)	49,6	1,88	9,92
pG3DSS (2)	55,4	1,86	11,08
pG8SAET (1)	280,6	1,90	56,12
pG8SAET (2)	249,5	1,88	49,90

4.2 Isolamento e quantificação de DNA genômico das bactérias

Após a extração do DNA genômico, todo o material foi quantificado por espectrofotometria considerando 50 µg/mL como uma unidade de absorbância a 260 nm. Para a bactéria *L. interrogans* sorovar Copenhageni o rendimento da extração foi de 1,4 a 2,0 mg/mL, enquanto que para a bactéria *S. pneumoniae* 6303 o rendimento foi de 1,0 a 1,7 mg/mL.

4.3 Fragmentação do DNA genômico

Foi realizado um teste de homogeneização do material para a padronização do procedimento de fragmentação do DNA genômico. Para isso, 500 ng de DNA genômico de *S. pneumoniae* 6303 foram submetidos a diferentes tempos de homogeneização no sonicador: 20, 40, 60, 70, 80, 90 segundos, assim por diante até 180 segundos. Em seguida, escolheram-se os tempos 40, 60, 80 e 100 segundos para fragmentar 5,0 µg de DNA genômico de cada bactéria que pode ser visualizado na figura 8. Em seguida, os fragmentos dos tempos 40/60s e 80/100s foram misturados aplicados em um de agarose 1,2% para a seleção de tamanhos de DNA para serem utilizados na construção das bibliotecas. Em seguida, esses materiais foram purificados utilizando o kit comercial *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, GE Healthcare. A figura 9 mostra uma alíquota do material purificado, onde podem ser visualizados os tamanhos dos fragmentos selecionados: insertos que variam de 2300 a 565 pb e insertos que variam de 545 a 125 pb representam os fragmentos de maior e menor tamanhos, assim denominados respectivamente.

Figura 8 - Gel de agarose 1% para visualização da fragmentação do DNA genômico

(1) Marcador molecular λ HindIII (Invitrogen), (2) 0,5 μ l e (3) ao (6) 2,0 μ l de *S. pneumoniae* em diferentes tempos, (7) Marcador molecular 1kb plus DNA (Invitrogen), (8) 0,5 μ l e (9) ao (12) 2,0 μ l *L. interrogans* em diferentes tempos, (13) Marcador molecular λ PstI (preparado em nosso laboratório).

Figura 9 - Gel de agarose 1,2% para a visualização dos fragmentos selecionados

(1) e (2) fragmentos de maior tamanho de *S. pneumoniae*, (3) fragmentos de menor tamanho de *S. pneumoniae*, (4) fragmentos de maior tamanho de *L. interrogans*, (5) fragmentos de menor tamanho de *L. interrogans*, (6) 1,0 μ g de marcador molecular λ HindIII (Invitrogen), (7) 30 ng de pGEM-3Zf+ linearizado (Invitrogen).

4.4 Quantificação do DNA fragmentado

Todo o material fragmentado foi quantificado por espectrofotometria através do aparelho NanoDrop ND-100TM Thermo Scientific e estão mostrados na tabela 2.

Tabela 2 - Quantificação do DNA fragmentado em ng/μl e suas respectivas relações de pureza

Amostra	Quantificação ng/μl	Relação 260/280 (nm)
<i>S. pneumoniae</i> maior tamanho (1)	44,6	1,6
<i>S. pneumoniae</i> maior tamanho (2)	48,5	1,8
<i>S. pneumoniae</i> menor tamanho	16,8	2,1
<i>L. interrogans</i> maior tamanho	17,0	1,8
<i>L. interrogans</i> menor tamanho	22,1	1,8

4.5 Tratamentos dos insertos de DNA e dos vetores

As quantidades das enzimas utilizadas para os tratamentos dos insertos dos DNA fragmentados estão representados na tabela 3. Foram tratados 250 ng e 50 ng do material de *S. pneumoniae* de maior e menor tamanhos respectivamente. Para *L. interrogans* foram tratados 250 ng e 100 ng de maior e menor tamanhos respectivamente. Além dos fragmentos do material genômico, foram tratados também o DNA que codifica a proteína LipL32 de *L. interrogans* bem como seus fragmentos, a saber, fragmentos N-terminal, intermediário e C-terminal. LipL32 é conhecida como a lipoproteína majoritária que faz parte da membrana externa de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, tem atividade de adesina e possui massa molecular de 32kDa. Esta proteína recombinante é produzida em nosso laboratório e está sendo utilizada como controle de nossos experimentos. Portanto, foram utilizados 100 ng do DNA de cada fragmento que compõe o gene da proteína LipL32 e 250 ng do DNA do gene inteiro de LipL32. Os cálculos da quantidade de insertos a serem tratados foram realizados de acordo com o tamanho médio dos fragmentos, considerando ainda a perda durante a purificação desses insertos tratados.

Foram tratados 1,5 µg de cada vetor. Os vetores foram digeridos com 2,7 u da enzima SnaBI (Fermentas) e, em seguida, desfosforilados com 1 u da enzima fosfatase alcalina (SAP, USB). Após cada tratamento, foi utilizado um kit comercial *QIAquick Gel Extraction Kit*, QIAGEN para purificação dos insertos e dos vetores.

Tabela 3 - Quantidade de enzimas utilizadas para os tratamentos dos insertos

Fragmentos	<i>S. pneumoniae</i>		<i>L. interrogans</i>					
	maior tamanho	menor tamanho	maior tamanho	menor tamanho	LipL32	C-terminal	N-terminal	Intermediário
T4 DNA pol	4 u	4 u	4 u	4 u	4 u	4 u	4 u	4 u
dNTP mix	2mM	2mM	2mM	2mM	2mM	2mM	2mM	2mM
Tampão 5X (µl)	2,0	2,0	4,0	2,0	4,0	4,8	4,8	4,8
DNA (µl)	5,0	3,0	14,7	4,52	14,04	16,95	16,95	15,62
H ₂ O (µl)	1,7	3,7	-	2,18	0,16	2,78	0,95	1,45
Volume final (µl)	10,0	10,0	20,0	10,0	20,0	25,0	24,0	25,0
PNK*	10 u	10 u	10 u	10 u	10 u	10 u	10 u	10 u
ATP	20mM	20mM	20mM	20mM	20mM	20mM	20mM	20mM
Tampão (µl)	2,0	2,0	2,5	2,0	2,5	3,0	3,0	3,0
H ₂ O (µl)	6,0	6,0	-	6,0	0,5	0,5	0,5	0,5
Volume final (µl)	20,0	20,0	25,0	20,0	25,0	30,0	30,0	30,0

*PNK = kinase

4.6 Ligação dos insertos nos vetores e validação das bibliotecas

A ligação dos insertos foi realizada para todos os fragmentos e para os dois vetores. Por exemplo, para o vetor pG3DSS foi feita uma ligação com os fragmentos maiores e uma ligação dos fragmentos menores, assim como para o vetor pG8SAET foram realizadas ligações com fragmentos maiores e menores. Para *L. interrogans* foram feitas também ligações com todos os fragmentos de LipL32 e com o DNA do gene que codifica a proteína LipL32 inteira. A relação utilizada na ligação foi 1 de vetor para 1 de inserto com os cálculos baseados no número de moléculas (razão molar de 1:1 de fragmento/vetor¹) e foram utilizadas de 5 u a 20 u de T4 DNA ligase (New England, Biolabs) juntamente com PEG 5% de concentração final. Após a ligação, os materiais foram precipitados e eletrotransformados em bactérias eletrocompetentes. A validação das bibliotecas foi realizada após busca por similaridade com seqüências da bactéria em estudo nos bancos de dados públicos. Para isso

¹ considerando $x \text{ g/}\mu\text{l de DNA} / [\text{tamanho do vetor em pb} \times 660 \text{ mol/g}] \times 6,022 \times 10^{23}$
 Sendo 660 mol/g = massa molecular estimado para cada par de nucleotídeo;
 $6,022 \times 10^{23}$ = constante de Avogadro.

foram seqüenciados 20 clones de cada biblioteca e em média foram obtidos 95% de vetores que continham insertos de fragmentos genômicos de *S. pneumoniae* ou *L. interrogans*.

4.7 Título primário das bibliotecas

Para *S. pneumoniae* o título primário da biblioteca pG8SAET+ fragmentos menores foi de $2,4 \times 10^4$ colônias. Sabendo que o genoma dessa bactéria apresenta um tamanho aproximado de 2,0 Mb e considerando o tamanho dos insertos de fragmentos menores como média de 335 pb (insertos que variam de 545 a 125 bp), temos uma cobertura de 4 vezes o seu genoma se seqüenciássemos todos os clones obtidos. Assim, para a padronização da técnica, essa biblioteca foi utilizada para fazer uma varredura preliminar.

Para *L. interrogans* os títulos primários das bibliotecas obtidos estão representados na tabela 4. Vale ressaltar que para os fragmentos maiores (insertos que variam de 2300 a 565bp) foi utilizado o valor médio de 1432,5 pb e para os fragmentos menores (insertos que variam de 545 a 125bp) foi utilizado o valor médio de 335 pb. Os títulos obtidos são suficientes para cobrir o genoma dessa bactéria que possui um tamanho de 4,6 Mb.

Cálculo da Cobertura do Genoma: $\frac{\text{número de transformantes} \times \text{tamanho médio dos insertos}}{\text{tamanho do genoma da bactéria}}$

Tabela 4 - Títulos primários obtidos das bibliotecas de *L. interrogans* e o cálculo do número de vezes que a biblioteca está cobrindo o genoma da bactéria a partir do título primário considerando o tamanho médio das seqüências

Biblioteca	Título Primário	Cobertura do genoma (número de vezes)
pG8SAET + fragmentos maiores	$2,5 \times 10^5$	78
pG8SAET + fragmentos menores	$6,4 \times 10^4$	5
pG3DSS + fragmentos maiores	$2,8 \times 10^5$	87
pG3DSS + fragmentos menores	$9,1 \times 10^4$	7
pG8SAET + fragmentos de 500 pb	$1,8 \times 10^5$	19

4.8 Seleção da biblioteca de *L. interrogans* contra os tecidos de hamster: biblioteca pG3DSS contendo fragmentos de tamanho maior

Para a realização da seleção *in vivo*, foram realizados dois experimentos independentes. A tabela 5 mostra o número total de amostras dos experimentos, onde foram realizados sete ciclos de *panning* utilizando a biblioteca contendo o vetor PG3DSS fusionado aos fragmentos de maior tamanho (insertos de DNA genômico com tamanho médio de 1500 pb) contra o tecido alvo. No total, 288 clones da seleção em rim dos ciclos II, III, V e VII e 264 clones da seleção em fígado dos ciclos I, III, V e VII foram submetidos para análise por seqüenciamento. Clones da seleção em baço do ciclo V também foram analisados conforme a tabela 5. Clones da seleção em pulmão nos ciclos V e VII também foram recuperados, entretanto, as análises ainda não foram finalizadas.

Tabela 5 - Total de clones analisados por seqüenciamento a cada ciclo e nos respectivos tecidos

Ciclo	Número de clones seqüenciados		
	Tecido		
	Rim	Fígado	Baço
I	1	48	-
II	47	-	-
III	48	48	-
V	96	48	24
VII	96	96	-
	288	264	24

Primeiramente, os resultados obtidos dos clones selecionados foram divididos em seqüências válidas, aquelas que estavam na orientação correta; e seqüências não válidas, aquelas que não estavam na orientação correta ou seqüências de qualidade baixa (figura 10). Essa divisão foi realizada devido à de quantidade de amostras a serem analisadas e anotadas manualmente uma a uma. Somente os clones que continham a orientação correta do inserto foram submetidos a uma nova etapa de seqüenciamento para confirmação do quadro de leitura do fragmento que está sendo expresso em fusão à proteína pIII do fago. Considerando que o vetor pG3DSS não possui peptídeo sinal tampouco o sítio de ligação ribossomal, foi realizado uma análise buscando o códon de iniciação e peptídeo sinal que deveria estar localizado na seqüência clonada no fago.

Portanto, somente foram considerados insertos que codificavam um peptídeo ou proteína verdadeira aqueles que atendiam os seguintes critérios:

- a) orientação correta;
- b) mesmo quadro de leitura da proteína de fusão do capsídeo viral;
- c) sequência sinal ou uma sequência que a mimetize.

Figura 10 - Análise preliminar dos experimentos de seleção da biblioteca construída com o vetor pG3DSS contendo fragmentos de tamanho maior de *L. interrogans* em rim e fígado

A quantidade de biblioteca utilizada (*input*) para o experimento e a quantidade recuperada após cada ciclo (*output*) foi monitorada através de preparações de alíquotas retiradas para infecção em *E. coli* e contagem de clones no dia seguinte como mostra a tabela 6. Foram injetados 2×10^8 partículas virais (200 μ L) de biblioteca amplificada a cada ciclo. Observa-se que foi coletada uma amostra do baço do animal cujo rim foi retirado para comparar a quantidade de fagos recuperados.

Tabela 6 - Quantidade de partículas virais recuperados (pfu/mL) após o tempo de interação com cada tecido de hamster a cada ciclo de seleção

Ciclo	Rim	Fígado	Pulmão	Baço (rim)
I	$2,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^7$	$2,1 \times 10^5$	$2,0 \times 10^3$
II	$1,5 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$	$1,0 \times 10^3$
III	$1,0 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^3$
IV	$5,0 \times 10^5$	$7,0 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	0
V	$2,4 \times 10^5$	$9,3 \times 10^4$	$7,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$
VI	$1,7 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^2$	0
VII	$1,0 \times 10^5$	$3,1 \times 10^5$	$7,6 \times 10^5$	$6,0 \times 10^3$

Após sete ciclos de seleção nos tecidos, foram identificados apenas dois clones únicos, não enriquecidos, nos experimentos de varredura em rim. O primeiro produto identificado nesse experimento possui identidade com a LIC10678, uma proteína de *L. interrogans* sorovar Copenhageni que está descrita como regulador de resposta. Essa proteína apresenta um domínio REC, homólogo ao domínio CheY de *E.coli*, responsável pelo seu movimento flagelar. Os sistemas de transdução de sinal do tipo dois componentes, permitem que a bactéria seja capaz de responder e se adaptar aos estímulos externos, tais como estresse, fatores de crescimento (SKERKER et al., 2005). Algumas bactérias possuem mais de 200 tipos de sistemas dois componentes finamente reguladas (LAUB; GOULIAN, 2007). O outro clone mostrou identidade com a proteína LIC11523, uma proteína quimiotática, que apresenta três domínios PAS, envolvido em sinalização de várias proteínas que são utilizadas como sinalizador; um domínio HAMP, encontrado em proteínas integrais de membrana que faz parte das vias de transdução de sinal dos sistemas dois componentes; e, por fim, um domínio MA, presentes nas proteínas quimiotáticas receptoras de metil pertencentes a família de receptores que podem responder a diferentes sinais quimiotáticos, em resposta aos sinais externos (DERR; BODER; GOULIAN, 2006). A tabela 7 mostra a identificação desses clones, bem como o seu número de acesso no banco de dados. Os domínios descritos dessas proteínas estão marcadas em suas sequências de aminoácidos (APÊNDICE A).

Tabela 7 - Clones identificados após seleção da biblioteca pG3DSS contendo fragmentos de tamanho maior de *L. interrogans* em rim de hamster

Ciclo	Clone	Produto identificado	Número de acesso no <i>GenBank</i>
III	G09	LIC10678: <i>response regulator</i>	gb AAS69299.1
III	B12	LIC11523: <i>chemotaxis protein</i>	gb AAS70119.1

4.9 Seleção da biblioteca de *L. interrogans* contra os tecidos de hamster: biblioteca pG3DSS contendo fragmentos de tamanho menor

A tabela 8 mostra o número total de amostras do experimento de número 2, onde foram realizados quatro ciclos (*rounds*) de *panning* utilizando a biblioteca contendo o vetor PG3DSS fusionado aos fragmentos de tamanho menor (insertos de DNA genômico que variam entre 545 a 125 pb).

Os resultados obtidos dos clones selecionados foram novamente divididos em seqüências válidas e seqüências não válidas (figura 11). Uma análise mais detalhada, da mesma forma descrita anteriormente também foi realizada. O resultado da análise através de busca por similaridade nos bancos de dados públicos (BLAST) dos clones e seus respectivos produtos codificados pelas seqüências fusionadas à proteína pIII do fago identificou, no *panning* em rim, dois clones no quarto *round* (clones F05 e B11) que codificava uma proteína anotada no genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni como provável lipoproteína (LIC12976, [gb|AAS71526.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gb|AAS71526.1)).

Em nosso grupo, outro experimento de *panning* em células de mamíferos (células epiteliais LLC-PK1) também selecionou essa mesma proteína LIC12976. Para validar a proteína selecionada, o gene da proteína LIC12976 foi amplificado e clonado para a sua produção sob a forma de proteína recombinante (parte da tese de doutorado da aluna Swiany Silveira Lima, em desenvolvimento). Além disso, anticorpos policlonais foram gerados e experimentos adesão da proteína recombinante a outras linhagens celulares (A31, LLC-PK1 e VERO) e experimentos de adesão a laminina, mostraram que a proteína recombinante é capaz de se ligar a essas moléculas (em fase de submissão²).

² Lima, S.S. et al. Shotgun phage display identifies LIC12976 from *Leptospira interrogans* as a new adhesin, 2012.

Foram injetados 2×10^8 (200 μ L) da biblioteca amplificada a cada ciclo e a quantidade de fagos recuperados a cada ciclo foi monitorada conforme descrito anteriormente. Observa-se que foi coletada uma amostra do baço e do pulmão do animal cujo rim foi retirado para comparar a quantidade de fagos recuperados (tabela 9).

Tabela 8 - Total de clones analisados por seqüenciamento no IV *round* e nos respectivos tecidos

Número de clones seqüenciados em cada tecido		
Rim	Fígado	Pulmão
192	96	96

Figura 11 - Análise preliminar dos experimentos de seleção da biblioteca construída com o vetor pG3DSS contendo fragmentos de tamanho menor em rim, fígado e pulmão

Tabela 9 - Quantidade de partículas virais recuperados (pfu/mL) após o tempo de interação com cada tecido a cada ciclo

Ciclo	Rim	Fígado	Pulmão	Baço (rim)	Pulmão (rim)
I	$4,0 \times 10^6$	$1,6 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	0	Não coletado
II	$5,0 \times 10^6$	$3,6 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5$	0	Não coletado
III	$2,5 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$	$1,9 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4$	Não coletado
IV	$2,6 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^3$	0	0

4.10 Seleção da biblioteca de *L. interrogans* contra proteínas de matriz extracelular imobilizadas em microplacas

A biblioteca contendo o vetor pG3DSS carregando os fragmentos de tamanho maior (insertos de DNA genômico que variam entre 2300 a 565 pb) foi utilizada para os experimentos de *panning in vitro*. Para isso, foram realizados dois experimentos independentes selecionando os produtos apresentados pelos fagos que continham afinidade por Heparan Sulfato Proteoglicano (HSPG) (Sigma-Aldrich) e por matrigel (BDTM).

Foram realizados quatro ciclos de seleção contra HSPG. Primeiramente foi realizada uma análise global dos clones que estavam sendo selecionados, separando as seqüências na orientação correta. Na etapa seguinte, esses clones foram reanalisados um a um para confirmar se estava em fase com o vetor (mesmas análises descritas anteriormente). No total foram analisadas 344 seqüências, dessas 32% (110 seqüências) correspondem àqueles clones que estavam na orientação correta e apenas 1,2% (quatro seqüências) estavam em fase como vetor (tabela 10).

Após quatro ciclos de seleção, foram identificados no último *round*, três diferentes clones, sendo que um deles aparecia também no terceiro ciclo. Esses clones estão representados na tabela 11 que mostra o resultado da análise final através de busca por similaridade nos bancos de dados públicos (BLAST) dos clones e seus respectivos produtos codificados pelas seqüências fusionadas à proteína pIII do fago. Observou-se que o clone que aparece nos ciclos III e IV foi identificado no genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni como proteína hipotética e está anotado como metaloendopeptidase no genoma de *L. interrogans* sorovar Lai com 99% de identidade (gb|AAN50654.1, LA3456). Essa proteína apresenta um domínio conservado pertencente à família das peptidases M23. Proteínas dessa família são conhecidas como endopeptidases e também inclui algumas lipoproteínas de *E. coli* (ODINTSOV et al., 2004)

O monitoramento da quantidade de fagos recuperados a cada ciclo conforme descrito anteriormente pode ser visualizado na tabela 12. Foram utilizadas 2×10^9 partículas virais/mL da biblioteca amplificada por ciclo.

As proteínas do tipo imunoglobulina-like LigA (LIC10465) e LigB (LIC10464), selecionadas após quatro ciclos de seleção em heparan sulfato proteoglicano, foram escolhidas para serem expressas e purificadas sob a forma de proteínas recombinantes.

Para o experimento de seleção em matrigel, foram realizados quatro ciclos de *panning* (dados não mostrados).

Tabela 10 - Representação do número de seqüências analisadas, em cada ciclo, no *panning* da biblioteca “pG3DSS + fragmentos de tamanho maior” em heparan sulfato proteoglicano

Ciclo	Número total de clones sequenciados	Clones na orientação correta	Clones em fase com o vetor
I	81	26	0
II	87	24	0
III	88	26	0
IV	88	34	4

Tabela 11 - Análise dos clones selecionados em heparan sulfato proteoglicano e seus respectivos produtos codificados pelas suas seqüências fusionadas ao fago

Clone	Ciclo	Produto	Número de acesso no <i>GenBank</i>
F09	III	LIC10721: <i>hypothetical protein</i>	gb AAS69342.1
H10	IV	LIC10721: <i>hypothetical protein</i>	gb AAS69342.1
B08	IV	LIC10465: LigA	gb AAO65920.1
F11	IV	LIC10464: LigB	gb AAS69085.1

Tabela 12 - Quantidade de partículas virais recuperados (pfu/mL) após o tempo de interação com heparan sulfato proteoglicano a cada ciclo

Ciclo	Número de partículas virais recuperadas (pfu/mL)
I	$2,5 \times 10^5$
II	$2,8 \times 10^4$
III	$3,3 \times 10^4$
IV	$1,7 \times 10^4$

4.10.1 O clone selecionado em HSPG que apresenta a LigB é capaz de se ligar a heparina

A propagação do clone F11 que expressa parte da proteína LigB de *L. interrogans* sorovar Copenhageni foi realizada para verificar sua possível interação com o substrato heparina. Uma vez que o clone F11 foi identificado na seleção contra HSPG, não era possível afirmar se a sua interação era devido a sua cadeia de heparan sulfato (HS) ou devido aos polipeptídicos covalentemente ligados à essa cadeia de HS. Portanto, o clone F11 amplificado foi submetido ao experimento de ligação à heparina, um análogo a HSPG (ROD'EN, 1989), como mostra a figura 12. Observa-se que F11 é capaz de se aderir a heparina, sugerindo que a cadeia de heparan sulfato seja responsável por essa interação. Como controle, foi utilizado o fago selvagem M13K07 que não apresentou ligação tão significativa quando comparado ao clone F11. A proteína recombinante que expressa parte do fragmento selecionado F11 foi produzida, conforme descrito nos itens seguintes, para possíveis experimentos de validação.

Figura 12 - Ligação do bacteriófago recombinante a heparina

(F11) clone do fago recombinante expressando parte da proteína LigB de *L.interrogans* sorovar Copenhageni, (M13) fago selvagem M13K07.

Fonte: Adaptado (CHING et al., 2012)

4.11 Seleção da biblioteca de *L. interrogans* contra soro de pacientes infectados com leptospira

Foram realizados quatro ciclos (*rounds*) de *panning* utilizando a biblioteca contendo o vetor pG3DSS fusionado aos fragmentos de tamanho menor (insertos de DNA genômico que variam entre 545 a 125 pb) contra soro humano de pacientes infectados com leptospira (dois experimentos independentes: condições 17/09, IgM reagente e 20/09, IgM não reagente). A quantidade de clones que foram seqüenciados e os fagos recuperados (*output*) em cada ciclo estão resumidos na tabela 13. Para cada ciclo foram utilizadas 1×10^8 pfu/mL.

Tabela 13 - Quantidade de clones analisados por seqüenciamento em cada ciclo de seleção e quantidade de partículas virais recuperadas após cada ciclo

Ciclos	Número de clones seqüenciados		Número de partículas virais recuperadas (pfu/mL)	
	Soro 17/09	Soro 20/09	Soro 17/09	Soro 20/09
I	37	36	$3,3 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$
II	41	41	$2,4 \times 10^4$	$4,5 \times 10^3$
III	8	16	$7,8 \times 10^3$	$1,3 \times 10^4$
IV	84	84	$4,0 \times 10^4$	$9,3 \times 10^4$
Total	170	177	—	—

Após quatro ciclos de seleção, dois clones válidos da condição soro 20/09 foram identificados: o clone A07 no ciclo I e o F03 no ciclo III. O primeiro, A07, foi identificado como LIC10284 ([gb|AAS68911.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/AA68911.1)), cujo produto anotado no genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni descreve a proteína hemolisina A (TlyA), relacionada com patogenicidade, virulência e adaptação ou produção de toxina (CARVALHO et al., 2009). A hemolisa TlyA foi inicialmente identificadas como hemolisina na espiroqueta *Brachyspira hyodysenteriae*, causadora da disenteria suína (TER HUURNE et al., 1994). Já o outro clone (F03) foi identificado como LIC11345 ([gb|AAS69946.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/AA69946.1)), apresenta uma região transmembrana e seu produto anotado no genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni descreve um receptor de ferro-ferricromo. Esse receptor é responsável pelo transporte de ferro interagindo com TonB, proteína responsável pelo acoplamento do ferro ao seu sideróforo.

4.12 Seleção da biblioteca de *L. interrogans* contra anticorpo monoclonal anti-*Etag*

Os resultados observados nos experimentos anteriores mostraram que a biblioteca que continha insertos de tamanho médio 1500 pb apresentavam mais de um gene clonado por fagomídeo, o que poderia ter dificultado a expressão da proteína fusionada ao fago. Com intuito de diminuir ou eliminar este problema, uma nova biblioteca foi construída e, desta vez, foi utilizada para a construção o vetor pG8SAET com fragmentos de DNA de tamanho médio 500 pb. Além disso, de acordo com Jacobsson e colaboradores (2003) a seleção da biblioteca contra o anticorpo anti-*Etag* antes de iniciarmos uma seleção no alvo pretendido aumentaria, teoricamente, a frequência dos clones positivos, já que seriam selecionados os clones que estão em fase com o *Etag* que, por sua vez, está no mesmo quadro de leitura da proteína pVIII do vetor.

A validação dessa biblioteca foi realizada por sequenciamento e demonstrou que das 24 sequências analisadas apenas uma era representada por um fagomídeo sem inserto, sendo que das 23 sequências que continham os fragmentos clonados, apenas duas restabeleciam a fase de leitura correta com a proteína pVIII do vetor utilizado. De acordo com Jacobsson e colaboradores (2003), este baixo número de clones que restabelecem a fase de leitura do vetor é esperado, tendo em vista que nesta técnica somente um clone em 18 estará na orientação correta e terá a mesma fase de leitura do vetor.

O título primário da biblioteca em questão foi de $1,8 \times 10^5$ clones e, se considerarmos a probabilidade de um clone correto em 18, a biblioteca construída apresenta a cobertura de uma vez do genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. O título secundário dessa biblioteca, obtido após a infecção com o fago auxiliar M13K07, foi de $5,1 \times 10^{12}$ cfu/ml.

4.13 Biblioteca de *S. pneumoniae*: *panning* contra proteínas de matriz extracelular imobilizadas em microplacas

Com o objetivo de se padronizar a metodologia, a biblioteca contendo o vetor pG8SAET+fragmentos de tamanho menor de *S. pneumoniae* foi utilizada para uma varredura preliminar. Para isso foi realizado o procedimento de seleção de produtos apresentados pelos bacteriófagos que tenham afinidade por matrigel (BDTM) que é composto por uma mistura de proteínas de matriz extracelular. Após três ciclos de seleção, foi possível observar o enriquecimento de um ligante cujo produto foi identificado como “ABC transporter, ATP-

binding protein” de *S. pneumoniae*. Foram seqüenciados 16, 26 e 23 clones dos ciclos I, II e III, respectivamente. Dentro de cada ciclo observou-se o aparecimento do ligante em questão em oito dos 16 clones (I *round*), 17 dos 26 clones (II *round*) e 23 dos 23 clones (III *round*). A figura 13 mostra que houve um aumento dessa forma ligante, sugerindo que houve seu enriquecimento após o segundo ciclo (*round*).

Figura 13 - Enriquecimento do ligante mais afim com matrigel após três ciclos de *panning* da biblioteca de *S. pneumoniae*

4.14 Oligonucleotídeos utilizados

A tabela 14 mostra os oligonucleotídeos desenhados para a confirmação dos clones por seqüenciamento. Enquanto que a tabela 15 lista os oligonucleotídeos utilizados para as clonagens das proteínas recombinantes rLB-Ct, rLB-Nt e rLA-Ct.

Tabela 14 - Oligonucleotídeos para seqüenciamento dos clones selecionados no *panning*

Oligonucleotídeo	Seqüência
pG3_F	5' - GGAAGAGCCGGTTTTAAGCCT - 3'
pG3_R	5' - AGGTCAGACGATTGGCCTTGG - 3'
G3DelRev	5' - CATTGACAGGAGGTTGAGGC - 3'
pG8_F	5' - TATCTGGTGGCGTAACACCTGCT - 3'
pG8_R	5' - GATCGTCACCCTCGGATCCCTAGG - 3'

Tabela 15 - Oligonucleotídeos utilizados para as clonagens das proteínas recombinantes

Proteína recombinante	Primers 5' → 3' (sítios de restrição sublinhados)
rLB-Ct	<i>forward</i> - <u>CTCGAGG</u> CTGAAATTAAAAATACC - XhoI <i>reverse</i> - <u>GAAGCTT</u> TTAGGATAAATCAAGGG - HindIII
rLB-Nt	<i>forward</i> - <u>CCTCGAGG</u> GTCTGGTAGGATTAAC - XhoI <i>reverse</i> - <u>CCATGGC</u> TAAATATCCGTATTAGAGG - NcoI
rLA-Ct	<i>forward</i> - <u>CTCGAGC</u> TTACCGTTTCCAACACAAAC - XhoI <i>reverse</i> - <u>CCATGGT</u> TATGGCTCCGTTTAAATAGAG - NcoI

4.15 Expressão e purificação das proteínas recombinantes

Na tentativa de validar os clones selecionados nos experimentos de *panning* em HSPG, as proteínas do tipo imunoglobulina-like (*Ig-like*) LigA e LigB de *L. interrogans* sorovar Copenhageni foram escolhidas para expressão e purificação sob a forma de proteínas recombinantes. LigA e LigB contém 13 e 12 domínios do tipo *Ig-like*, respectivamente, apresentando uma alta conservação em seus 630 resíduos de aminoácidos da região amino-terminal e uma região carboxi-terminal variável (PALANIAPPAN et al., 2004). Portanto, as proteínas recombinantes produzidas foram: região carboxi-terminal de LigA (rLA-Ct) e regiões carboxi- e amino- terminal de LigB (rLB-Ct e rLB-Nt, respectivamente).

A figura 14 mostra um esquema das proteínas LigA e LigB, bem como as proteínas recombinantes produzidas com seus domínios representados. A proteína rLA-Ct apresenta parte do sétimo domínio *Ig-like* ao 13º domínio *Ig-like* (aminoácidos 631 - 1224) da proteína LigA, rLB-Nt vai do início da proteína LigB sem a sequência sinal até parte do começo sétimo domínio *Ig-like* (aminoácidos 26 - 630) e rLB-Ct é composto por parte do final do sétimo domínio ao 12º domínio *Ig-like* mais 38 resíduos de aminoácidos após esse domínio (aminoácidos 631 - 1156). As figuras 15 (A) e 15 (B) mostram as purificações das proteínas rLB-Nt (64,3kDa) e rLB-Ct (55,6kDa), respectivamente. Observa-se que a proteína rLB-Nt

foi eluída nas frações 40, 60 e 100 mM de imidazol, enquanto que a proteína rLB-Ct foi eluída na fração 40 mM de imidazol.

Figura 14 - Representação esquemática das proteínas LigA e LigB

(A) Proteína LigA com seus domínios e sua proteína recombinante rLA-Ct, (B) Proteína LigB com seus domínios, as proteínas recombinantes rLB-Nt e rLB-Ct e, F11, o clone selecionado no experimento de *panning*. Em (A) e (B) * representa o domínio *Ig-like* das proteínas e as numerações representam os aminoácidos do início e fim das proteínas recombinantes e do clone F11. Fonte: modificado de (CHING et al., 2012).

Figura 15 - Visualização dos géis de SDS-PAGE 12% das purificações das proteínas recombinantes

(A) rLB-Nt: (1) eluição da fração 40mM imidazol, (3) ao (7) eluições da fração 60mM, (8) ao (10) eluições da fração 100mM; (B) rLB-Ct: (1) proteína solubilizada em 8M uréia, (3) ao (10) eluições da fração 40mM imidazol. Em ambos: (2) marcador de massa molecular LMW (GE Healthcare).

4.16 Cromatografia de afinidade a heparina

Como forma de validar o clone F11 selecionado nos experimentos de *panning* em HSPG, a proteína recombinante rLB-Ct foi submetida a cromatografia de afinidade a heparina. Até o momento não existe descrito na literatura dados sobre a interação da proteína LigB com heparina ou com HSPG, apesar da importância sobre a interação de moléculas do tipo glicosaminoglicanas que compõem os tecidos com agentes patógenos. Com exceção do ácido hialurônico, todas as glicosaminoglicanas se apresentam nos tecidos sob a forma de proteoglicanas (DREYFUSS et al., 2009). Ainda assim, mesmo após a confirmação de que o fago carregando parte da proteína LigB foi capaz de interagir com heparina, submetemos a proteína recombinante rLB-Ct ao ensaio de afinidade com heparina para tentar corroborar com os resultados do ensaio de adesão do fago. A cromatografia mostrou que proteína rLB-Ct foi eluída com 0,5 M de NaCl conforme mostra a figura 16. Foram coletadas amostras dos tampões e de cada amostra eluída para leitura no refratômetro e checagem da concentração de sal utilizada. A figura 17 ilustra um gráfico contendo as leituras das amostras com seus índices de refração, em valores absolutos e a concentração de NaCl em mol.L⁻¹ com os valores calculados de acordo com a equação da reta dos valores obtidos da leitura dos índices de refração (APÊNDICE C). Pode-se observar que as concentrações de NaCl calculadas

através da leitura dos índices de refração estão próximas aos valores das concentrações preparadas das amostras.

Figura 16 - Cromatografia de afinidade a heparina, mostrando a fração eluída da proteína rLB-Ct

Gel de SDS-PAGE 12% corado com prata. M: marcador de massa molecular, INPUT: amostra de entrada, 0.16 a 1.0 M: concentrações crescentes de NaCl (CHING et al., 2012).

Figura 17 - Leitura das amostras submetidas à cromatografia de afinidade à heparina com seus índices de refração, em valores absolutos e a concentração de NaCl em mol.L⁻¹

4.17 Adesão das proteínas recombinantes aos componentes de matriz extracelular (MECs) e diferentes linhagens celulares

4.17.1 A proteína rLB-Ct é capaz de se ligar ao HSPG e à heparina

Os componentes utilizados para os experimentos de adesão à matriz extracelular foram: matrigel (BD™), laminina (Sigma-Aldrich), fibronectina (Sigma-Aldrich), heparan sulfato proteoglicano (HSPG) (Sigma-Aldrich), heparina sódica (Roche). A albumina bovina (BSA) foi utilizada como controle. Além disso, foi observada a adesão da proteína recombinante TlyC produzida e descrita pelo nosso grupo como adesina (CARVALHO et al., 2009). Foram utilizadas 1,0 µg de cada MEC e de cada proteína recombinante, e 1000 UI (Unidades Internacionais) de heparina sódica para o experimento observado na figura 18.

Observa-se que a proteína rLB-Ct possui característica de adesão aos substratos testados, inclusive a heparan sulfato proteoglicano e a heparina sódica, o que não ocorre com a rLB-Nt. A proteína recombinante rLB-Ct que possui a região do clone de fago F11 se mostrou capaz de aderir-se à heparina tão bem quanto ao HSPG. O clone F11, por sua vez, apresenta o 12º domínio *Ig-like* da proteína LigB mais 112 resíduos de aminoácidos da região não repetitiva de LigB (APÊNDICE D). Trabalhos recentes que descrevem a ligação de LigB aos MECs mostraram a importância do 12º domínio *Ig-like* da proteína LigB na sua interação com essas moléculas (LIN; CHANG, 2007; LIN et al., 2009b; LIN et al., 2009c). Choy e colaboradores mostraram que os fragmentos da região amino-terminal de LigB (domínios *Ig-like* 1-3 e domínios *Ig-like* 4-6) produzidos por eles também não se liga aos MECs (CHOY et al., 2007), corroborando com os nossos resultados apresentados pela proteína recombinante rLB-Nt. Já a proteína rLA-Ct não apresentou uma adesão significativa, apesar de já ter sido descrita anteriormente como adesina ligadora de alguns MECs, tais como colágeno I, laminina, fibronectina e fibrinogênio (CHOY et al., 2007; LIN et al., 2010).

Figura 18 - Adesão das proteínas recombinantes TlyC, rLA-Ct, rLB-Nt e rLB-Ct aos componentes de matriz extracelular (MECs) e a heparina sódica

MECs: matrigel, laminina, fibronectina (Fn), heparan sulfato proteoglicano (HS). Heparina sódica (HP)

4.17.2 A proteína recombinante rLB-Ct se liga às células de mamíferos, e a heparina é capaz de reduzir essa interação

A figura 19 mostra a ligação das proteínas recombinantes às diferentes linhagens celulares de mamíferos testadas. Pode-se observar que rLB-Ct, se comparada com as outras proteínas recombinantes, apresenta uma melhor adesão às células A31, LLC-PK1 e VERO. As outras proteínas recombinantes, descritas como adesinas LigA, TlyC e LipL32 não apresentaram uma ligação significativa. Até o presente momento, não existem na literatura trabalhos que descrevem a interação de nenhuma dessas proteínas com células de mamíferos. Para a proteína LigB, Lin e Chang (2008) mostraram que a proteína LigB é capaz de influenciar a adesão das leptospiros em células epiteliais de rim canino (LIN; CHANG, 2008).

Um experimento de ligação das proteínas recombinantes com as diferentes linhagens de células na presença ou na ausência de MECs e heparina sódica também foi realizado. Na figura 20 podemos observar que a heparina sódica faz com que haja uma queda significativa na interação da rLB-Ct com as três linhagens celulares, reduzindo em 27% a ligação de rLB-Ct, quando comparamos com as outras proteínas recombinantes. Observa-se que o mesmo não ocorre quando se adiciona fibronectina e laminina. Essa queda do sinal da ligação de rLB-Ct,

quando se adiciona heparina ou HSPG, pode ser explicada por uma possível competição pelos sítios de ligação nos receptores apresentados pelas células. Devido a grande diversidade estrutural de suas cadeias, o heparan sulfato é capaz de se ligar e interagir com uma variedade de proteínas, como fatores de crescimento, quimiocinas, componentes de matriz extracelular, entre outros receptores que compõem a matriz extracelular (DREYFUSS et al., 2009).

Figura 19 - Adesão das proteínas recombinantes rLA-Ct, rLB-Ct, rLB-Nt, TlyC e LipL32 à diferentes linhagens celulares A31, LLC-PK1 e VERO

(A31) célula de fibroblasto de camundongo, (LLC-PK1) célula epitelial de túbulo proximal de rim de porco, (VERO) célula epitelial de rim de macaco verde.

Figura 20 - Adesão das proteínas recombinantes rLB-Ct, rLB-Nt, rLA-Ct e TlyC à diferentes linhagens celulares A31, LLC-PK1 e VERO, na presença ou na ausência de HP e MECs

Heparina sódica (HP) e MECs: fibronectina (Fn) e laminina (lam).

4.18 Ensaio de imunização com fagos e avaliação do seu potencial protetor

Bacteriófagos filamentosos são comumente utilizados como adjuvantes imunogênicos para peptídeos e proteínas apresentados na superfície do fago. Estudos recentes mostraram que a imunização utilizando fagos conjugados com peptídeos heterólogos pode iniciar uma resposta de anticorpos específicos contra peptídeos mais direcionada do que o uso de adjuvantes tradicionais conjugado a esses mesmos peptídeos (HENRY et al., 2011). Assim como as partículas morfolologicamente e antigenicamente semelhantes a vírus, denominadas *virus-like particles* (VLPs), o fago apresenta inúmeras propriedades que os favorecem ser uma boa escolha para o estudo de resposta humoral. O fago é altamente imunogênico, produzindo um elevado título de anticorpos após uma única imunização sem a necessidade do uso de adjuvantes (HASHIGUCHI et al., 2010; VAN HOUTEN et al., 2006; VAN HOUTEN et al., 2010). Estudos já demonstraram a capacidade imunoprotetora da proteína recombinante LigA

utilizando hamster como modelo animal. No entanto, essa proteína não foi capaz de impedir a colonização de leptospiros no tecido renal (PALANIAPPAN et al., 2006; SILVA et al., 2007). No nosso ensaio, utilizamos o fago que expressava o fragmento da proteína LigA para a avaliar seu potencial imunoprotetor. Foram utilizados também o ciclo em que esse clone foi selecionado, já que poderíamos encontrar mais clones que pudessem expressar outros fragmentos dessa mesma proteína e toda a biblioteca contendo os fragmentos genômicos. No entanto, o ensaio de imunização utilizando fagos para avaliar o seu potencial protetor mostrou que eles não foram capazes de proteger os animais imunizados como pode ser observado na figura 21. Os controles utilizados, tais como a vacina comercial, a bacterina (bactéria inativada) e a proteína recombinante de LigA se mostraram capazes de proteger os animais contra o desafio utilizando leptospiros virulentos.

Figura 21 - Avaliação do desafio animal quanto ao número de animais sobreviventes

Grupos dos animais imunizados: PBS+Al (controle negativo contendo tampão mais o adjuvante hidróxido de alumínio), Vacina Comercial (controle positivo), Bacterina+Al (controle positivo contendo preparado de bactéria inativada), LigA+Al (controle positivo contendo a proteína recombinante LigA), E11 (clone do fago que expressa o fragmento de LigA), HS-IVR (o *pool* quarto ciclo da biblioteca pG3DSS contendo fragmentos maiores), Biblioteca (o *pool* da biblioteca PG3DSS contendo fragmentos maiores) e PG3 (fago selvagem).

5 DISCUSSÃO

Sabe-se que o primeiro passo da interação patógeno-hospedeiro para colonizar o tecido ocorre por meio da adesão à superfície desse hospedeiro. Uma vez aderidos à superfície celular, os patógenos são capazes de desempenhar processos bioquímicos específicos, tais como proliferação, secreção de toxinas, invasão celular e eventos que culminam com o aparecimento dos sintomas da doença. Proteínas conhecidas como adesinas, localizadas na superfície das bactérias, são chamadas *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules* (MSCRAMMs) (PATTI et al., 1994). Espécies patogênicas de *Leptospira* apresentam MSCRAMMs que se aderem às moléculas da matriz extracelular do seu hospedeiro, podendo representar potenciais alvos para o desenvolvimento de drogas, vacinas ou diagnóstico.

Uma das estratégias para combater leptospirose é a adoção de medidas preventivas. O investimento no desenvolvimento de uma vacina eficiente poderia ser uma dessas estratégias, já que ainda não existe uma vacina eficaz licenciada para o uso em humanos, exceto em alguns países. Considerada uma das zoonoses mais difundidas no mundo, a leptospirose tem sido cada vez mais reconhecida por ser um problema de saúde pública, pois afeta a população de países em desenvolvimento e de regiões tropicais. Diante disso, nos últimos anos, muitos esforços têm sido feitos na tentativa de se descobrir um método capaz de combater essa doença.

A técnica de *phage display* é uma metodologia que vem sendo muito explorada há algumas décadas e abriu caminhos para a descoberta de ligantes de interesse por alvos específicos. As bibliotecas genômicas de *phage display*, construídas no presente trabalho, foram elaboradas a partir de fragmentos aleatórios do genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni e tinham como propósito a identificação de possíveis adesinas através da seleção nos tecidos-alvos nos quais a bactéria se aloja e em moléculas presentes na matriz extracelular do hospedeiro.

Alguns autores mostraram que bibliotecas genômicas de *phage display* obtidas a partir de um microrganismo são capazes de representar, em teoria, todas as proteínas (ou parte delas) codificadas pelo genoma em questão. Tais bibliotecas podem ser utilizadas para identificar possíveis proteínas do patógeno que possuem afinidade por vários alvos, tais como, moléculas de matriz extracelular, células inteiras, tecidos animais, entre outros materiais biológicos (ANTONARA et al., 2007; BECKMANN et al., 2002; BJERKETORP et al., 2002; 2004;

JACOBSSON; FRYKBERG, 1996; 2001; JACOBSSON, 2003; MULLEN et al., 2007; NILSSON et al., 2004;).

Os resultados apresentados nessa tese envolvem as primeiras padronizações de construção de biblioteca genômicas para *phage display* no Brasil e os primeiros testes de seleção em tecidos de hamster dourado (*in vivo*). Para isso, tiveram que ser avaliadas bibliotecas que apresentavam diferentes tamanhos de fragmentos genômicos. Uma varredura preliminar *in vitro* contra proteínas de matriz extracelular imobilizada em microplacas também foi realizada com o objetivo de se padronizar a técnica. Além disso, foram realizados experimentos preliminares com seleções em soros de pacientes diagnosticados com leptospirose.

Como resultados iniciais, obtivemos um grande número de clones que foram selecionados e submetidos ao sequenciamento automático, gerando uma considerável massa de resultados para serem analisados individualmente. Essas análises nos mostraram uma grande quantidade de fagos que carregavam fragmentos de DNA genômico da bactéria mas que não reestabeleciam o quadro de leitura da proteína de fusão do capsídeo viral, impedindo assim a correta expressão da proteína ou do peptídeo em fusão. Assim, foram realizados experimentos em que as bibliotecas eram submetidas às seleções contra o anticorpo anti- *Etag* (AbnovaTM) com o intuito de se melhorar o processo de *panning*. Esse procedimento adicional foi realizado com base nos resultados de Rosander e colaboradores (2002), cujo trabalho mostrou que após a seleção da biblioteca contra o anticorpo, a maioria dos fagos selecionados apresentava fragmentos clonados em fase com o vetor. Esses vetores do tipo fagomídeo possuem um *Etag* contendo 13 aminoácidos fusionados ao gene III ou VIII do capsídeo viral (vetores pG3DSS e pG8SAET, respectivamente). Em teoria, somente o fragmento clonado em fase com esse *tag* e, por sua vez, em fase com uma das proteínas do capsídeo viral poderia resultar num fago viável (ROSANDER et al., 2002). No entanto, os nossos resultados não mostraram nenhuma melhoria na taxa de obtenção de seqüências em fase com essa construção. Pela nossa experiência, ao final de três ciclos de seleções com o anticorpo anti-*Etag*, a quantidade de clones cujos genes anotados no genoma de *L. interrogans* estavam na fase correta foi apenas um pouco mais do que 3%.

A aplicabilidade de uma biblioteca de *phage display* também depende da qualidade da apresentação do peptídeo/polipeptídeo, pois um determinado fago da biblioteca só será selecionado se o polipeptídeo heterólogo estiver eficientemente exibido em sua superfície. . A forma de apresentação dessas proteínas varia muito e depende do seu tamanho (WILSON; FINLAY, 1998). Por exemplo, centenas ou milhares de peptídeos pequenos podem ser

apresentados por cada partícula de fago, enquanto que proteínas maiores (contendo 100 resíduos de aminoácidos) são geralmente apresentadas em uma cópia ou menos por fago (IANNOLO et al., 1995; SIDHU; WEISS; WELLS, 2000). Além disso, a eficiência de uma biblioteca também pode depender da proteína fusionada encontrar-se na região amino-terminal ou carboxi-terminal da proteína do capsídeo viral (FUH et al., 2000; FUH; SIDHU, 2000; ROSANDER et al., 2002).

Durante a análise dos resultados da biblioteca contendo os fragmentos maiores (média 1500 pb), observamos que a maioria dos casos apresentava fragmentos que correspondiam a dois genes diferentes, o que poderia dificultar a expressão do proteína heteróloga em fusão com a proteína do fago. De fato, esse problema parece ter sido eliminado quando foi realizado o *panning* utilizando a biblioteca de fragmentos menores. No entanto, conforme descrito nos resultados, nem todos os processos de seleção puderam ser realizados com todas as bibliotecas construídas. Em sua maioria, foi utilizada a biblioteca cuja construção continha o vetor pG3DSS fusionado aos fragmentos maiores. O vetor pG3DSS foi construído sem a sequência sinal que normalmente orienta a proteína de fusão para a membrana da bactéria onde a partícula viral é montada. Em teoria, somente as proteínas extracelulares deveriam ser selecionadas quando se utiliza esse tipo de vetor. Quando fragmentos randômicos de DNA são inseridos nesse vetor, apenas fagomídeos contendo uma inserção que codifica uma sequência sinal dará origem a partículas de fago que apresentam a proteína de fusão (ROSANDER et al., 2002). Além disso, embora a sequência sinal de diferentes organismos seja, muitas vezes, intercambiável, existem exemplos de sequências sinais que não funcionam eficientemente quando são expressas em um outro hospedeiro (CHANG et al., 1987; SMITH; DUNCAN; MOIR, 1985).

Diante dos resultados ainda não satisfatórios com essa biblioteca, optamos pela construção da biblioteca “pG8SAET + fragmentos de 500 pb”, que pode ser justificada por ser uma estratégia possivelmente mais eficiente para selecionar, através do *panning* utilizando o anticorpo anti-*Etag* como substrato, os clones que estivessem em fase com o vetor. O vetor pG8SAET foi construído com o promotor e sequência sinal de *S.aureus* em fusão com o gene VIII, que codifica a proteína do capsídeo viral (JACOBSSON et al., 2003). Assim, a expressão não depende da sequência sinal do fragmento clonado. Além disso, trabalhos de Jacobsson e colaboradores mostraram que, diferentemente do vetor baseado no gene da proteína pIII cujos resultados não revelavam mais do que 20% de clones positivos, o uso do vetor baseado no gene da proteína pVIII (pG8SAET) resultava em quase 100% de clones positivos (JACOBSSON; FRYKBERG, 1995; 1996).

Dessa forma, uma primeira conclusão advinda de nossos resultados é que a estratégia de uso de bibliotecas genômicas contendo fragmentos aleatórios não se mostrou tão eficiente como imaginamos. Jacobsson e Frykberg (2001) relataram que, mesmo utilizando o vetor pG8SAET e diante de um grande número de clones *E-tag* positivos, a prevalência de insertos curtos e sem sobreposição foram encontrados (JACOBSSON; FRYKBERG, 2001). Outro obstáculo que essa metodologia pode apresentar é em relação à cobertura do genoma do microorganismo em questão. Rosander e colaboradores (2003) relataram que o tamanho da biblioteca de fagos utilizada para os experimentos de seleção também é um ponto importante para o sucesso da estratégia. Quanto maior o número de clones, maior será a representação das proteínas que estão em fusão com a proteína viral. Quando esses mesmos autores compararam os resultados obtidos na construção de duas bibliotecas de microorganismos diferentes, eles observaram que aquela biblioteca que continha um número maior de clones (1×10^8 para *Bradyrhizobium japonicum*) apresentou mais clones positivos do que a biblioteca com um número mais baixo de clones (8×10^5 para *S. aureus*). Além disso, somente uma fração de clones de fagos irá apresentar a proteína heteróloga fusionada em sua superfície, uma vez que o inserto deverá apresentar uma orientação correta, estar em fase com a sequência do vetor e não apresentar um códon de parada (ROSANDER et al., 2003). Os títulos das bibliotecas genômicas geralmente são mais baixos quando se compara com as bibliotecas de peptídeos (títulos de pelo menos $1,1 \times 10^9$) (CORTESE et al., 1996) ou com as bibliotecas de anticorpos (títulos entre 10^9 e 10^{10}) (SHEETS et al., 1998). No entanto, deve-se ressaltar que, diferentemente das bibliotecas genômicas de fragmentos randômicos, as bibliotecas de peptídeos e de anticorpos apresentam insertos bem menores. Assim, questões problemáticas inerentes à técnica como a conformação da proteína heteróloga apresentada pelo fago, não são consideradas nos casos de bibliotecas de peptídeos ou anticorpos. As médias do título primário das nossas bibliotecas foram de $2,7 \times 10^5$ para as que continham fragmentos de tamanho médio 1500 pb, $7,8 \times 10^4$ para as que continham fragmentos de 350 pb e $1,8 \times 10^5$ para a biblioteca com insertos de tamanho médio 500 pb.

Portanto, através do levantamento dos artefatos e problemas discutidos até aqui, podemos entender a ausência de resultados contundentes em relação a seleção e identificação de adesinas. Ainda assim, como últimos esforços, além das tentativas de obtermos títulos mais elevados das nossas bibliotecas, mesmo utilizando mais eletrotransformações de uma mesma biblioteca, nós testamos o uso de um outro vetor modificado (dados não apresentados). As dificuldades de obtenção do anticorpo monoclonal anti-*Etag* nos levaram a investir na modificação de um vetor que apresenta um *tag* de histina fusionado com a proteína pIII do

capsídeo viral do bacteriófago (resultados ainda preliminares). O uso de uma seleção em resina quelante permitiria a obtenção de clones em fase com a proteína pIII com o uso desse sistema.

Mesmo diante dos problemas relatados, o processo seletivo levou à identificação das proteínas LigA e LigB, que foram selecionadas no experimento de *panning* em heparan sulfato proteoglicano. LigA e LigB são proteínas de superfície do tipo imunoglobulina-like que já foram descritas como adesinas e sugeridas como MSCRAMMs, uma categoria de proteínas envolvidas na colonização do tecido do hospedeiro (PATTI et al., 1994). Diversos trabalhos já descreveram a adesão de LigA e LigB à proteínas de matriz extracelular e proteínas plasmáticas como colágenos tipo I e IV, laminina, fibronectina III e fibrinogênio (CHOY et al., 2007; LIN et al., 2010). Recentemente, Lin e colaboradores (2009) também descreveram a adesão de LigB à tropoelastina e elastina (LIN et al., 2009c). Além disso, experimentos com LigA já mostraram que essa proteína apresenta capacidade de proteger animais desafiados contra leptospiros virulentas, mostrando ser um forte candidato vacinal, porém, sem impedir infecções renais (FELIX et al., 2011; PALANIAPPAN et al., 2006). Foi observado também que a expressão dessas proteínas pode ser induzida por osmolaridade (MATSUNAGA et al., 2005; MATSUNAGA et al., 2007). Outros estudos mostraram ainda que animais imunizados com a bactéria *L. interrogans* morta não foram capazes de produzir o anticorpo contra a proteína LigA e LigB, provavelmente pela baixa expressão de dessas proteínas; em contraste, animais infectados com *L. interrogans* produziram anticorpos contra a proteína LigA e LigB, consistente com maiores níveis de expressão dessa proteína durante a infecção do animal do que durante a cultura *in vitro* (MATSUNAGA et al., 2003).

Assim, a identificação das proteínas LigA e LigB nos pareceu promissora. Na tentativa de se validar os clones que expressavam fragmentos dessas proteínas, selecionados em Heparan Sulfato Proteoglicano (HSPG) pela técnica de *phage display*, suas proteínas recombinantes foram produzidas e testadas quanto a sua adesão ao HSPG e a heparina. Uma vez que esses clones foram identificados após seleção contra HSPG, não foi possível, nessa fase, afirmar se a ligação do produto dos fagos era devida à interação com a porção polipeptídica ou com a porção glicosaminoglicana (GAG) da molécula. Além disso, esses clones foram amplificados sob a forma de fagos e submetidos aos ensaios de ligação ao HSPG e a heparina, seu análogo estrutural (RODÉN, 1989).

Heparan sulfato é um polissacarídeo (glicosaminoglicano) ubiquamente expresso como proteoglicana em matriz extracelular e na superfície de células. Sob a forma de proteoglicana, conhecida por HSPG, essa glicoproteína parece exercer diversos papéis durante

a resposta inflamatória (PARISH, 2006). Estudos já demonstraram a contribuição do HPSG na interação célula-célula e célula-moléculas de matriz extracelular (ALVAREZ-DOMINGUEZ et al., 1997). Outros estudos também observaram que HSPGs se comportam como receptores de alguns microrganismos, tais como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Borrelia burgdorferi*, *Bordetella pertussis* entre outros (WADSTROM; LJUNGH, 1999; MENOZZI et al., 2002). Além disso, já foram descritos trabalhos sobre vários patógenos que utilizam os proteoglicanos como receptores de adesão, se ligando à porção GAG, promovendo a sua fixação e internalização na célula hospedeira (BARTLETT; PARK, 2010; GUO et al., 1998). Assim, acredita-se que a interação de proteínas específicas (adesinas, por exemplo) dos microrganismos com receptores do hospedeiro (cadeias de carboidratos do glicoconjugado) permite que o patógeno desencadeie o primeiro passo para o estabelecimento da infecção, causando a doença (ROSTAND; ESKO, 1997).

Nossos experimentos demonstraram que somente a região carboxi-terminal de LigB recombinante (rLB-Ct) se ligou ao heparan sulfato, o mesmo não ocorrendo com a sua região amino-terminal (rLB-Nt), nem com a proteína recombinante de LigA (rLA-Ct). Um resultado semelhante ocorreu quando se observou que a proteína rLB-Ct parece ter uma melhor adesão com as diferentes linhagens celulares testadas quando comparada às outras proteínas. Trabalhos recentes mostraram que a proteína LigB é capaz de mediar a interação de leptospiros à células MDCK (células epiteliais de rim canino) (LIN; CHANG, 2007; 2008). Esse mesmo grupo também demonstrou a ligação de LigB à região ligadora de gelatina da fibronectina a às células MDCK (LIN et al., 2010). Além disso, a especificidade da interação de rLB-Ct foi testada na presença ou não de heparina sódica, causando uma redução do sinal de ligação de rLB-Ct quando a heparina foi adicionada ao ensaio de adesão.

Esses resultados possibilitam validar o clone selecionado pelo *panning* apesar de não ter sido observado o enriquecimento do clone em questão (LigB) após quatro ciclos de seleção. O enriquecimento de um determinado clone após sucessivos ciclos de *panning*, apesar de ser desejável, parece não ser o ponto crucial para se obter sucesso nesse tipo de metodologia (ROSANDER et al., 2002). O que se espera, na maioria dos casos, é um aumento de número de clones eluídos a cada ciclo de seleção e uma diminuição dos clones cuja orientação esteja errada. Jacobsson e colaboradores demonstraram um aumento de até 10^3 vezes de fagos recuperados (JACOBSSON et al., 2003; MULLEN et al., 2007). No nosso caso, os experimentos de seleção em HSPG apresentou um aumento de 10 vezes entre o ciclo anterior (III *round*) e o ciclo em que os clones foram selecionados (IV *round*).

Além disso, foi possível observar que a proteína recombinante rLB-Ct é capaz de se aderir tanto ao HSPG quanto à heparina. Nossos resultados dos experimentos de ligação à heparina sugerem que a cadeia de GAG da molécula HSPG parece mediar a interação da proteína rLB-Ct, podendo assim agir como receptor de *L. interrogans* para a colonização e invasão do tecido do hospedeiro.

Até o momento não foi descrita a interação das proteínas LigA e LigB de leptospira com HSPG. Estudos de Breiner e colaboradores (2009) demonstraram que a bactéria *L. interrogans* sorovar Copenhageni é capaz de se ligar a moléculas receptoras de superfície celular, incluindo proteoglicanas tais como condroitin sulfato proteoglicana e HSPG (BREINER et al., 2009). Nos nossos estudos, foram realizados também experimentos de ligação da bactéria a HSPG para observar a adesão das leptospiros, porém não obtivemos sucesso (dados não mostrados).

Além das proteínas LigA e LigB selecionadas no *panning* em heparan sulfato, foi encontrada também a proteína LIC10721, que aparece uma vez no terceiro e no quarto *round*. Essa proteína está anotada como hipotética no genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni e como metaloendopeptidase no genoma do sorovar Lai. Essa metaloendopeptidase pertence à família de peptidases M23, que são metalopeptidases dependentes de zinco. A família de peptidases M23, também conhecidas por endopeptidases, inclui algumas lipoproteínas de bactérias para as quais ainda não foi demonstrada nenhuma atividade proteolítica (RAWLINGS et al., 2008).

Já nos experimentos de *panning* em tecidos de hamster, foram selecionados três clones no rim, sendo dois deles da biblioteca de fragmentos maiores, cujas proteínas identificadas foram LIC10678 e LIC11523, e um deles da biblioteca de fragmentos menores, LIC12976. Mais uma vez não houve um enriquecimento de nenhum desses clones, sendo a LIC12976 encontrada duas vezes no quarto ciclo.

Esta última proteína está classificada como proteína de estrutura celular/componente de membrana/possível lipoproteína de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. No entanto, com dados do programa Pfam, somente foi possível identificar um domínio ligador de nucleotídeo. A LIC12976 também é encontrada em outras espécies patogênicas de leptospiros e apresenta um pouco mais de 30% de similaridade com a espécie de vida livre. Esta mesma proteína foi selecionada paralelamente nos experimentos de *panning* contra células LLC-PK1 utilizando outra biblioteca (pG3DSS contendo fragmentos maiores), sendo o mesmo clone de fago (carregando a mesma região da proteína LIC12976) identificado na seleção das duas bibliotecas. Assim, optamos por investigar a proteína LIC12976 sob a forma de proteína

recombinante. Essa mostrou capacidade de se aderir a laminina e as células de mamíferos A31, LLC-PK1 e VERO. Além disso, essa proteína também foi testada para avaliar seu potencial uso como antígeno vacinal e também foi encontrada na superfície de *L. interrogans* (dados de outro projeto de doutoramento desenvolvido em nosso laboratório).

A proteína LIC10678 está anotada como uma proteína reguladora de resposta e apresenta um domínio do tipo REC, ou seja, um domínio receptor de sinal do tipo sistema de dois componentes. Esse é um tipo de sistema de transdução de sinal que capacita as bactérias a responderem e se adaptarem aos estímulos extracelulares, tais como, fatores ambientais, estresse e condições de cultivo (SKERKER et al., 2005). Já a proteína LIC11523 é uma proteína que apresenta um domínio “Methyl-accepting chemotaxis-like (MA)” e está classificada como proteína envolvida em processos celulares/quimiotexia e mobilidade. Proteínas quimiotáticas receptoras de metil (*Methyl-accepting chemotaxis proteins-MCPs*) pertencem a uma família de receptores bacterianos que fazem a mediação por quimiotaxia a diversos sinais (DERR; BODER; GOULIAN, 2006).

As análises dos experimentos em animais mostraram mais uma vez que não foi possível obtermos o aumento de clones ao longo dos ciclos de seleção e nem enriquecimento de nenhum clone específico, mesmo após sete *rounds*. Esses experimentos também nos mostraram as dificuldades enfrentadas diante da adaptação ao nosso modelo animal, pois todo o processo de seleção precisou ser ajustado e ainda não existem, na literatura, procedimentos que descrevam o *panning* em hamster.

Os experimentos contra soro de paciente contaminado por leptospira mostrou a seleção da proteína TlyA, conhecida como hemolisina, um fator de virulência dessa espiroqueta que, por sua vez, está classificada no genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni como relacionada com patogenicidade, virulência e adaptação. A outra proteína selecionada nesse experimento foi a LIC11345, uma proteína do tipo receptora TonB que interage com outras proteínas receptoras de membrana externa e que se encarrega pela ligação de alta afinidade a substratos específicos para o periplasma. Apesar de serem clones únicos, esses resultados são interessantes, pois o *panning* foi realizado contra soro de paciente diagnosticado com leptospirose, cujo IgM não é reagente. O fato da hemolisina ter sido encontrada nessa seleção nos mostra uma certa consistência, pois sabe-se que quando o paciente já se encontra na segunda fase da doença (fase imune), já é possível a detecção de anticorpos específicos no sangue.

A princípio, como perspectivas do projeto, estamos tentando analisar os outros clones selecionados até o momento, através de estudos detalhados das sequências que estão

apresentadas em fusão com a proteína do capsídeo viral. Assim, poderemos avaliar se é possível seguir com as próximas etapas da validação desses clones, tais como, clonagens, purificações e expressões em sistema de *E. coli* sob as formas de proteínas recombinantes.

Além disso, estamos trabalhando em uma nova biblioteca contendo fragmentos genômicos pequenos em um vetor que apresenta um *tag* de histina fusionado com a proteína pIII do capsídeo viral do bacteriófago. Dessa forma, uma pré-seleção através de uma coluna contendo níquel para adsorver os fagos que apresentam a proteína ou peptídeo de leptospira fusionado em fase correta com a pIII, diminuiria, teoricamente, os problemas de orientação dos clones selecionados nos experimentos de *panning*. Para isso, modificamos os vetores pComb3XSS e pComb3XTT que apresentam, resumidamente, o promotor *lacZ*, uma sequência sinal *ompA*, mais as cadeias leves e pesadas do anticorpo, seguidas de um *tag* que codifica seis resíduos de histidina, um *tag* que codifica o peptídeo hemaglutinina A e o gene da proteína pIII. Esses vetores são derivados do vetor pComb, elaborado por Barbas e colaboradores e comumente utilizados para a construção de biblioteca de anticorpos (BARBAS et al., 1991). Em uma análise preliminar, a biblioteca construída utilizando esses vetores não foi capaz de mostrar resultados satisfatórios, pois após duas seleções em coluna de níquel, não observamos o aumento de clones que continham insertos válidos (dados não mostrados).

Durante mais de duas décadas, a ferramenta de *phage display* tem sido utilizada para identificar interações proteína-proteína e reconhecer sítios em sistemas receptores-ligantes e antígeno-anticorpo. Recentemente, muitos trabalhos demonstraram o sucesso da seleção de alvos *in vivo* (HAJITOU; PASQUALINI; ARAP, 2006; KOLONIN et al., 2006; RAJOTTE; RUOSLAHTI, 1999). Como exemplo, a identificação de um peptídeo que se liga ao endotélio de tecidos tumorais permitiu sua conjugação sintética com um agente quimioterapêutico, resultando no direcionamento da droga diretamente no tumor (ARAP; PASQUALINI; RUOSLAHTI, 1998). Esses estudos estabeleceram a base para aplicação da tecnologia de *phage display* em análises das interações proteína-receptor em outras áreas, incluindo doenças infecciosas. Esses trabalhos, em sua maioria, utilizam bibliotecas de peptídeos. A seleção de bibliotecas de *phage display* em organismos vivos parece ser uma abordagem promissora para se buscar ligantes específicos encontrados nos tecidos, já que se aproveita do fato de utilizar a própria circulação sanguínea como forma de disseminar os fagos.

Apesar de existirem na literatura vários relatos sobre a utilização de *phage display* para doenças infecciosas causadas por microrganismos com seleções *in vitro*, há somente um trabalho que utilizou a seleção *in vivo*. Recentemente Antonara e colaboradores (2007)

mostraram a identificação de adesinas de *B. burgdorferi*, agente causador da doença de Lyme transmitida por carrapatos e que causa infecção sistêmica, através da seleção nos tecidos de camundongo (ANTONARA et al., 2007). Nesse trabalho, a biblioteca genômica utilizada foi construída com insertos que variavam entre 200 pb e 1000 pb, e foi baseada no vetor descrito por Clackson e colaboradores (CLACKSON et al., 1991). Assim como nos nossos experimentos, esses autores também relataram alguns problemas da técnica, mostrando a complexidade do processo de seleção. Os autores explicam, por exemplo, que o não enriquecimento de um determinado clone pode ser explicado pela falta de reprodutibilidade do *panning* em um mesmo tecido, resultado dos eventos seletivo e estocástico que podem ocorrer em qualquer tipo de seleção. Eles também enfatizam a importância de se começar a seleção com várias bibliotecas e com várias réplicas do meio seletivo, como o camundongo no caso deles (ANTONARA et al., 2007). Além disso, há um grande número de adversidades inerentes a qualquer tipo de seleção que utiliza bibliotecas de *phage display* devido a biologia do próprio bacteriófago, como já foi discutido anteriormente.

Nossos resultados mostraram que a tecnologia de *phage display* utilizando bibliotecas genômicas para seleção *in vivo* não se mostrou tão eficiente quanto parecia. Apesar de se ser poderosa, essa técnica não é banal e é desejável que se façam controles finos de todas as etapas do trabalho. Muitas vezes, o sucesso da técnica só é possível de ser apurado no final do processo, quando se utiliza o sequenciamento dos clones obtidos para verificar se a seleção funcionou, inviabilizando assim modificações nas etapas ou nas metodologias experimentais no decurso do projeto. Outros estudos do nosso grupo, que foram conduzidos através do *screening* em diferentes componentes de matriz extracelular, mostraram resultados mais robustos, onde fomos capazes de mostrar o enriquecimento de uma proteína na seleção contra fibronectina (18 clones em 24). Esses resultados, entre outras proteínas que foram identificadas como possíveis proteínas de adesão e os processos de validações desses clones ainda estão em curso (dados não mostrados).

Não obstante, nossos resultados utilizando a abordagem de *phage display* genômico de leptospiros mostraram que, apesar das limitações, essa técnica pode auxiliar na elucidação dos componentes envolvidos na interação dessas bactérias com os hospedeiros acometidos pela doença. Exemplo disso foi a identificação da LigB como um ligante de HSPG. Porém, ainda será preciso uma melhoria nas padronizações para as seleções em animais vivos, como também uma análise mais detalhada nas sequências que foram selecionadas. Um maior número de seleções, preparações de bibliotecas com uma cobertura mais ampla e a utilização de um vetor mais efetivo valem como perspectivas relevantes para passos futuros dos

objetivos propostos no presente projeto. Assim, acreditamos que estudos mais aprofundados e a nossa experiência com a ferramenta de *phage display* poderão ainda contribuir para uma melhor compreensão e identificação de potenciais proteínas candidatas com fins terapêuticos, diagnósticos e/ou vacinas, não só para a espiroqueta *L. interrogans* sorovar Copenhageni como também para outros patógenos causadores de doenças.

6 CONCLUSÕES

- Foram construídas cinco bibliotecas de bacteriófagos a partir de fragmentos de DNA genômico da espiroqueta *L. interrogans* sorovar Copenhageni: pG3DSS+fragmentos maiores (média dos insertos de 1500pb), pG3DSS+fragmentos menores (média dos insertos de 350pb), pG8SAET+fragmentos maiores, pG8SAET+fragmentos menores e pG8SAET+500pb.
- A seleção *in vivo* em rim de hamster possibilitou a identificação de três possíveis ligantes: LIC10678, LIC11532 e LIC12976. Somente a proteína LIC12976 foi validada através da produção da sua forma recombinante e mostrou que é capaz de se ligar a laminina e células de mamíferos (esses resultados fazem parte de um outro projeto desenvolvido do nosso grupo).
- A hemolisina A (TlyA) e uma proteína de membrana externa (LIC11345) foram selecionadas no *panning* contra soro de paciente contaminado por leptospira cujo IgM não era reagente.
- As proteínas LigA e LigB foram selecionadas através do *panning* contra heparan sulfato proteoglicano e suas proteínas recombinantes foram produzidas para tentar validar o processo de seleção.
- A região c-terminal da proteína LigB recombinante (rLB-Ct) mostrou a sua capacidade de se ligar melhor ao heparan sulfato proteoglicano e à heparina do que com as outras MEC testadas (fibrinectina e laminina).
- rLB-Ct também apresentou afinidade pelas linhagens celulares de mamíferos A31, LLC-PK1 e VERO. Além disso, a adição de heparina sódica mostrou uma redução de mais de 70% da ligação da rLB-Ct com as linhagens celulares, sugerindo a importância da região de glicosaminoglicana de heparan sulfato proteoglicano na interação da LigB com as células testadas, podendo ser um indicativo de que para a

colonização e invasão do tecido do hospedeiro, as leptospiros utilizem glicosaminoglicanas como receptores da adesina LigB.

- O fago carregando um fragmento de LigA não foi capaz de proteger os animais imunizados nos ensaios de desafio. Apesar de muitos trabalhos descreverem sobre o uso de fagos como um potencial adjuvante e/ou, como um melhorador da resposta de anticorpos, não foi possível observar nenhum tipo de resposta imunológica dos animais desafiados.

REFERÊNCIAS*

- ADLER, B.; FAINE, S. The antibodies involved in the human immune response to leptospiral infection. **J. Med. Microbiol.**, v. 11, n. 4, p. 387-400,1978.
- ALVAREZ-DOMINGUEZ, C. et al. Host cell heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of *Listeria monocytogenes*, and the listerial surface protein ActA is involved in heparan sulfate receptor recognition. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 1, p. 78-88,1997.
- ANTONARA, S. et al. *Borrelia burgdorferi* adhesins identified using in vivo phage display. **Mol. Microbiol.**, v. 66, n. 1, p. 262-76,2007.
- ARAP, M. A. Phage display technology - Applications and innovations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 1, p. 1-9,2005.
- ARAP, W. et al. Steps toward mapping the human vasculature by phage display. **Nat. Med.**, v. 8, n. 2, p. 121-7,2002.
- ARAP, W.; PASQUALINI, R.; RUOSLAHTI, E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. **Science**, v. 279, n. 5349, p. 377-80,1998.
- ATZINGEN, M. V. et al. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. **BMC Microbiol**, v. 8, p. 70,2008.
- AUSUBEL, F. M. et al. **Current Protocols in Molecular Biology**. New York: John Wileys & Sons, Inc 1989.
- BAR, H.; YACOBY, I.; BENHAR, I. Killing cancer cells by targeted drug-carrying phage nanomedicines. **BMC Biotechnol.**, v. 8, p. 37,2008.
- BARBAS, C. F., 3RD et al. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. **Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.**, v. 88, n. 18, p. 7978-82,1991.
- BARBAS, C. F. et al. **Phage Display: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- BARBOSA, A. S. et al. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 11, p. 6356-64,2006.
- BARBU, E. M. et al. beta-Neurexin is a ligand for the *Staphylococcus aureus* MSCRAMM SdrC. **PLoS Pathog.**, v. 6, n. 1, p. e1000726,2010.
- BAROCCHI, M. A. et al. Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 12, p. 6926-32,2002.
- BARTLETT, A. H.; PARK, P. W. Proteoglycans in host-pathogen interactions: molecular mechanisms and therapeutic implications. **Expert Rev. Mol. Med.**, v. 12, p. e5,2010.

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

- BECKMANN, C. et al. Identification of novel adhesins from Group B streptococci by use of phage display reveals that C5a peptidase mediates fibronectin binding. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 6, p. 2869-76, 2002.
- BENHAR, I. Biotechnological applications of phage and cell display. **Biotechnol. Adv.**, v. 19, n. 1, p. 1-33, 2001.
- 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. 4403-6, 1997.
- BHARTI, A. R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect. Dis.**, v. 3, n. 12, p. 757-71, 2003.
- BJERKETORP, J. et al. A novel von Willebrand factor binding protein expressed by Staphylococcus aureus. **Microbiology**, v. 148, n. Pt 7, p. 2037-44, 2002.
- BJERKETORP, J. et al. Sorting a Staphylococcus aureus phage display library against ex vivo biomaterial. **J. Med. Microbiol.**, v. 53, n. Pt 10, p. 945-51, 2004.
- BOLIN, C. A.; ALT, D. P. Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to Leptospira borgpetersenii serovar hardjo. **Am. J. Vet. Res.**, v. 62, n. 7, p. 995-1000, 2001.
- BOURHY, P. et al. Isolation and characterization of new Leptospira genotypes from patients in Mayotte (Indian Ocean). **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, n. 6, p. e724, 2010.
- BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. Fundação Nacional de Saúde. 5 ed. FUNASA, 2002. 842p.
- BREINER, D. D. et al. Leptospira interrogans binds to human cell surface receptors including proteoglycans. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 12, p. 5528-36, 2009.
- BRINKMAN LABORATORY AT SIMON FRASER UNIVERSITY. **PSORTdb 2.0**. Disponível em: <<http://db.psort.org/>>. Acesso em 20mai. 2012.
- BULACH, D. M. et al. Genome reduction in Leptospira borgpetersenii reflects limited transmission potential. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 103, n. 39, p. 14560-5, 2006.
- CABEZAS, S. et al. Selection of phage-displayed human antibody fragments on Dengue virus particles captured by a monoclonal antibody: application to the four serotypes. **J. Virol. Methods**, v. 147, n. 2, p. 235-43, 2008.
- CARVALHO, E. et al. Leptospiral TlyC is an extracellular matrix-binding protein and does not present hemolysin activity. **FEBS Lett.**, v. 583, n. 8, p. 1381-5, 2009.
- CERQUEIRA, G. M.; PICARDEAU, M. A century of Leptospira strain typing. **Infect. Genet. Evol.**, v. 9, n. 5, p. 760-8, 2009.
- CHAEMCHUEN, S. et al. Identification of candidate host proteins that interact with LipL32, the major outer membrane protein of pathogenic Leptospira, by random phage display peptide library. **Vet. Microbiol.**, v. 153, n. 1-2, p. 178-85, 2011.

CHANG, C. N. et al. High-level secretion of human growth hormone by *Escherichia coli*. **Gene**, v. 55, n. 2-3, p. 189-96,1987.

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

CHING, A.T. et al. *Leptospira interrogans* shotgun phage display identified LigB as a heparin-binding protein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 2012 Oct 5. [Epub ahead of print]

CHOI, J. H. et al. Identification and characterization of nonapeptide targeting a human B cell lymphoma, Raji. **Int. Immunopharmacol.**, v. 8, n. 6, p. 852-8,2008.

CHOU, L. F. et al. Sequence of *Leptospira santarosai* serovar Shermani genome and prediction of virulence-associated genes. **Gene**,2012.

CHOY, H. A. et al. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 5, p. 2441-50,2007.

CINCO, M. New insights into the pathogenicity of leptospires: evasion of host defences. **New Microbiol.**, v. 33, n. 4, p. 283-92,2010.

CLACKSON, T. et al. Making antibody fragments using phage display libraries. **Nature**, v. 352, n. 6336, p. 624-8,1991.

COBURN, J. et al. Characterization of a candidate *Borrelia burgdorferi* beta3-chain integrin ligand identified using a phage display library. **Mol. Microbiol.**, v. 34, n. 5, p. 926-40,1999.

CORTESE, R. et al. Selection of biologically active peptides by phage display of random peptide libraries. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 7, n. 6, p. 616-21,1996.

DE FARIA, M. T. et al. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. **Acta Trop.**, v. 108, n. 1, p. 1-5,2008.

DERR, P.; BODER, E.; GOULIAN, M. Changing the specificity of a bacterial chemoreceptor. **J. Mol. Biol.**, v. 355, n. 5, p. 923-32,2006.

DOMINGOS, R. F. et al. Features of two proteins of *Leptospira interrogans* with potential role in host-pathogen interactions. **BMC Microbiol.**, v. 12, n. 1, p. 50,2012.

DOUNGCHAWEE, G. et al. Early diagnosis of leptospirosis by immunoglobulin M immunoblot testing. **Clin. Vaccine. Immunol.**, v. 15, n. 3, p. 492-8,2008.

DREYFUSS, J. L. et al. Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 81, n. 3, p. 409-29,2009.

ERRIDGE, C. et al. Lipopolysaccharides of *Bacteroides fragilis*, *Chlamydia trachomatis* and *Pseudomonas aeruginosa* signal via toll-like receptor 2. **J. Med. Microbiol.**, v. 53, n. Pt 8, p. 735-40,2004.

EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY LABORATORY. **SMART**. Disponível em:
< <http://smart.embl-heidelberg.de/>>. Acesso em: 18jun. 2012.

FAINE, S. et al. **Leptospira and Leptospirosis**. 2nd edition. Melbourne, Australia: MediSci, 1999.

FAINE, S.; SHAHAR, A.; ARONSON, M. Phagocytosis and Its Significance in Leptospiral Infection. **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.**, v. 42, p. 579-88, 1964.

FELIX, S. R. et al. Subunit approach to evaluation of the immune protective potential of leptospiral antigens. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 18, n. 12, p. 2026-30, 2011.

FONSECA CDE, A. et al. Leptospira DNA detection for the diagnosis of human leptospirosis. **J. Infect.**, v. 52, n. 1, p. 15-22, 2006.

FUH, G. et al. Analysis of PDZ domain-ligand interactions using carboxyl-terminal phage display. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 28, p. 21486-91, 2000.

FUH, G.; SIDHU, S. S. Efficient phage display of polypeptides fused to the carboxy-terminus of the M13 gene-3 minor coat protein. **FEBS Lett.**, v. 480, n. 2-3, p. 231-4, 2000.

GAMBERINI, M. et al. Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 244, n. 2, p. 305-13, 2005.

GEBRIEL, A. M.; SUBRAMANIAM, G.; SEKARAN, S. D. The detection and characterization of pathogenic *Leptospira* and the use of OMPs as potential antigens and immunogens. **Trop. Biomed.**, v. 23, n. 2, p. 194-207, 2006.

GRIFFITH, M. E.; HOSPENTHAL, D. R.; MURRAY, C. K. Antimicrobial therapy of leptospirosis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 19, n. 6, p. 533-7, 2006.

GRIFFITHS, A. D.; DUNCAN, A. R. Strategies for selection of antibodies by phage display. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 9, n. 1, p. 102-8, 1998.

GUO, B. P. et al. Decorin-binding adhesins from *Borrelia burgdorferi*. **Mol. Microbiol.**, v. 30, n. 4, p. 711-23, 1998.

GUSSENHOVEN, G. C. et al. LEPTO dipstick, a dipstick assay for detection of *Leptospira*-specific immunoglobulin M antibodies in human sera. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 1, p. 92-7, 1997.

HAJITOU, A.; PASQUALINI, R.; ARAP, W. Vascular targeting: recent advances and therapeutic perspectives. **Trends Cardiovasc. Med.**, v. 16, n. 3, p. 80-8, 2006.

HASHIGUCHI, S. et al. Immunological basis of M13 phage vaccine: Regulation under MyD88 and TLR9 signaling. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 402, n. 1, p. 19-22, 2010.

HAUK, P. et al. In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 6, p. 2642-50, 2008.

HENRY, K. A. et al. Developing strategies to enhance and focus humoral immune responses using filamentous phage as a model antigen. **Bioeng. Bugs.**, v. 2, n. 5, p. 275-83, 2011.

HOFFMAN, J. A. et al. In vivo and ex vivo selections using phage displayed libraries. In: CLARKSON, T. e LOWMAN, H., B. (Ed.). **Phage Display: a practical approach**. Oxford: Oxford University Press, 2004. cap. 10, p. 171-192.

HOOGENBOOM, H. R. et al. Antibody phage display technology and its applications. **Immunotechnology**, v. 4, n. 1, p. 1-20,1998.

HUANG, B. et al. S-nitrosoproteome in endothelial cells revealed by a modified biotin switch approach coupled with Western blot-based two-dimensional gel electrophoresis. **J. Proteome Res.**, v. 8, n. 10, p. 4835-43,2009.

HUANG, J. X.; BISHOP-HURLEY, S. L.; COOPER, M. A. Development of anti-infectives using phage display: biological agents against bacteria, viruses, and parasites. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 56, n. 9, p. 4569-82,2012.

IANNOLO, G. et al. Modifying filamentous phage capsid: limits in the size of the major capsid protein. **J. Mol. Biol.**, v. 248, n. 4, p. 835-44,1995.

IKOEV, V. N. et al. The evaluation of the reactogenicity and immunogenic activity of a new concentrated inactivated leptospirosis vaccine. **Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.**, n. 4, p. 39-43,1999.

JACOBSSON, K. A novel family of fibrinogen-binding proteins in *Streptococcus agalactiae*. **Vet. Microbiol.**, v. 96, n. 1, p. 103-13,2003.

JACOBSSON, K.; FRYKBERG, L. Cloning of ligand-binding domains of bacterial receptors by phage display. **Biotechniques**, v. 18, n. 5, p. 878-85,1995.

JACOBSSON, K.; FRYKBERG, L. Phage display shot-gun cloning of ligand-binding domains of prokaryotic receptors approaches 100% correct clones. **Biotechniques**, v. 20, n. 6, p. 1070-6, 1078, 1080-1,1996.

JACOBSSON, K.; FRYKBERG, L. Shotgun phage display cloning. **Comb. Chem. High Throughput Screen.**, v. 4, n. 2, p. 135-43,2001.

JACOBSSON, K. et al. Shotgun Phage Display - Selection for Bacterial Receptins or other Exported Proteins. **Biol. Proced. Online**, v. 5, p. 123-135,2003.

JOHNS, M.; GEORGE, A. J.; RITTER, M. A. In vivo selection of sFv from phage display libraries. **J Immunol. Methods**, v. 239, n. 1-2, p. 137-51,2000.

JOUGLARD, S. D. et al. Nested polymerase chain reaction for detection of pathogenic leptospires. **Can. J. Microbiol.**, v. 52, n. 8, p. 747-52,2006.

KAY, B. K. W., J.; MCCAFERTY, J. **Phage display of peptides and proteins**. A laboratory manual. San Diego: Academic Press, Inc., 1996.

KELLY, K. A. et al. Detection of early prostate cancer using a hepsin-targeted imaging agent. **Cancer Res**, v. 68, n. 7, p. 2286-91,2008.

KHURANA, S. et al. Antigenic fingerprinting of H5N1 avian influenza using convalescent sera and monoclonal antibodies reveals potential vaccine and diagnostic targets. **PLoS Med.**, v. 6, n. 4, p. e1000049,2009.

- KIM, Y. G. et al. Screening of LPS-specific peptides from a phage display library using epoxy beads. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 329, n. 1, p. 312-7,2005.
- KO, A. I. et al. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. **Lancet.**, v. 354, n. 9181, p. 820-5,1999.
- KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospirosis vaccines: past, present, and future. **J. Postgrad. Med.**, v. 51, n. 3, p. 210-4,2005.
- KOLONIN, M. G. et al. Synchronous selection of homing peptides for multiple tissues by in vivo phage display. **FASEB J.**, v. 20, n. 7, p. 979-81,2006.
- LANZILLOTTI, R.; COETZER, T. L. Phage display: a useful tool for malaria research? **Trends Parasitol.**, v. 24, n. 1, p. 18-23,2008.
- LAUB, M. T.; GOULIAN, M. Specificity in two-component signal transduction pathways. **Annu. Rev. Genet.**, v. 41, p. 121-45,2007.
- LAURICHESSE, H. et al. Safety and immunogenicity of subcutaneous or intramuscular administration of a monovalent inactivated vaccine against *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae in healthy volunteers. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 13, n. 4, p. 395-403,2007.
- LEE, T. Y. et al. Peptide-mediated targeting to tumor blood vessels of lung cancer for drug delivery. **Cancer. Res.**, v. 67, n. 22, p. 10958-65,2007.
- LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 14, n. 2, p. 296-326,2001.
- LEVETT, P. N. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 36, n. 4, p. 447-52,2003.
- LIN, Y. P.; CHANG, Y. F. A domain of the *Leptospira* LigB contributes to high affinity binding of fibronectin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 362, n. 2, p. 443-8,2007.
- LIN, Y. P.; CHANG, Y. F. The C-terminal variable domain of LigB from *Leptospira* mediates binding to fibronectin. **J. Vet. Sci.**, v. 9, n. 2, p. 133-44,2008.
- LIN, Y. P. et al. Fibronectin binds to and induces conformational change in a disordered region of leptospiral immunoglobulin-like protein B. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 35, p. 23547-57,2009a.
- LIN, Y. P. et al. A novel fibronectin type III module binding motif identified on C-terminus of *Leptospira* immunoglobulin-like protein, LigB. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 389, n. 1, p. 57-62,2009b.
- LIN, Y. P. et al. Repeated domains of leptospira immunoglobulin-like proteins interact with elastin and tropoelastin. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 29, p. 19380-91,2009c.
- LIN, Y. P. et al. The terminal immunoglobulin-like repeats of LigA and LigB of *Leptospira* enhance their binding to gelatin binding domain of fibronectin and host cells. **PLoS One**, v. 5, n. 6, p. e11301,2010.
- LIN, Y. P. et al. Calcium binds to leptospiral immunoglobulin-like protein, LigB, and modulates fibronectin binding. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 37, p. 25140-9,2008.

LO, A.; LIN, C. T.; WU, H. C. Hepatocellular carcinoma cell-specific peptide ligand for targeted drug delivery. **Mol. Cancer. Ther.**, v. 7, n. 3, p. 579-89,2008.

LONGHI, M. T. et al. A newly identified protein of *Leptospira interrogans* mediates binding to laminin. **J. Med. Microbiol.**, v. 58, n. Pt 10, p. 1275-82,2009.

LUPIDI, R. et al. Serological follow-up of patients involved in a localized outbreak of leptospirosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, n. 4, p. 805-9,1991.

MARKS, J. D. et al. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. **J. Mol. Biol.**, v. 222, n. 3, p. 581-97,1991.

MATSUNAGA, J. et al. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Mol. Microbiol.**, v. 49, n. 4, p. 929-45,2003.

MATSUNAGA, J. et al. Response of *Leptospira interrogans* to physiologic osmolarity: relevance in signaling the environment-to-host transition. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 6, p. 2864-74,2007.

MATSUNAGA, J. et al. Osmolarity, a key environmental signal controlling expression of leptospiral proteins LigA and LigB and the extracellular release of LigA. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 1, p. 70-8,2005.

MCBRIDE, A. J. et al. Leptospirosis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 18, n. 5, p. 376-86,2005.

MCBRIDE, A. J. et al. Evaluation of the EIE-IgM-Leptospirose assay for the serodiagnosis of leptospirosis. **Acta Trop.**, v. 102, n. 3, p. 206-11,2007.

MENDES, R. S. et al. The novel leptospiral surface adhesin Lsa20 binds laminin and human plasminogen and is probably expressed during infection. **Infect. Immun.**, v. 79, n. 11, p. 4657-67,2011.

MENOZZI, F. D. et al. Enhanced bacterial virulence through exploitation of host glycosaminoglycans. **Mol. Microbiol.**, v. 43, n. 6, p. 1379-86,2002.

MERIEN, F. et al. Identification of a 36-kDa fibronectin-binding protein expressed by a virulent variant of *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 185, n. 1, p. 17-22,2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em:
<<http://portal.saude.gov.br>>. Acesso em 10jan. 2012

MULLEN, L. M. et al. Comparative functional genomic analysis of Pasteurellaceae adhesins using phage display. **Vet. Microbiol.**, v. 122, n. 1-2, p. 123-34,2007.

NASCIMENTO, A. L. et al. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 7, p. 2164-72,2004a.

NASCIMENTO, A. L. et al. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, n. 4, p. 459-77,2004b.

NACIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **GenBank**. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>. Acesso em: 22 jun. 2011.

NACIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **BLAST: Basic Local Alignment Search Tool**. Disponível em: < <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 04ago. 2012.

NIEMANN, H. H.; SCHUBERT, W. D.; HEINZ, D. W. Adhesins and invasins of pathogenic bacteria: a structural view. **Microbes Infect.**, v. 6, n. 1, p. 101-12,2004.

NILSSON, M. et al. A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus lugdunensis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 241, n. 1, p. 87-93,2004.

NYGREN, P. A.; UHLEN, M. Scaffolds for engineering novel binding sites in proteins. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 7, n. 4, p. 463-9,1997.

ODINTSOV, S. G. et al. Latent LytM at 1.3Å resolution. **J. Mol. Biol.**, v. 335, n. 3, p. 775-85,2004.

OLIVEIRA, R. et al. Characterization of novel OmpA-like protein of *Leptospira interrogans* that binds extracellular matrix molecules and plasminogen. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e21962,2011.

OLIVEIRA, T. R. et al. LipL53, a temperature regulated protein from *Leptospira interrogans* that binds to extracellular matrix molecules. **Microbes Infect.**, v. 12, n. 3, p. 207-17,2010.

PALANIAPPAN, R. U. et al. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. **Mol. Cell Probes**, v. 19, n. 2, p. 111-7,2005.

PALANIAPPAN, R. U. et al. Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by *Leptospira interrogans* and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA. **J. Med. Microbiol.**, v. 53, n. Pt 10, p. 975-84,2004.

PALANIAPPAN, R. U. et al. Immunoprotection of recombinant leptospiral immunoglobulin-like protein A against *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 3, p. 1745-50,2006.

PAPAIOANNOU, V. E.; FOX, J. G. Efficacy of tribromoethanol anesthesia in mice. **Lab. Anim. Sci.**, v. 43, n. 2, p. 189-92,1993.

PAPPAS, G. et al. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 12, n. 4, p. 351-7,2008.

PARADIS-BLEAU, C.; SANSCHAGRIN, F.; LEVESQUE, R. C. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* FtsZ peptide inhibitors as a tool for development of novel antimicrobials. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 54, n. 1, p. 278-80,2004.

PARISH, C. R. The role of heparan sulphate in inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, n. 9, p. 633-43,2006.

PASQUALINI, R. et al. In Vivo Selection of Phage Display Libraries In: (Ed.). **Phage Display: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. cap. 22.1-22.4,

PASQUALINI, R.; KOIVUNEN, E.; RUOSLAHTI, E. Alpha v integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands. **Nat. Biotechnol.**, v. 15, n. 6, p. 542-6,1997.

PATTI, J. M. et al. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 48, p. 585-617,1994.

PICARDEAU, M. et al. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. **PLoS One**, v. 3, n. 2, p. e1607,2008.

PINNE, M.; CHOY, H. A.; HAAKE, D. A. The OmpL37 surface-exposed protein is expressed by pathogenic *Leptospira* during infection and binds skin and vascular elastin. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, n. 9, p. e815,2010.

POSNER, B. et al. Catalytic antibodies: perusing combinatorial libraries. **Trends Biochem. Sci.**, v. 19, n. 4, p. 145-50,1994.

RAJOTTE, D. et al. Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by in vivo phage display. **J. Clin. Invest.**, v. 102, n. 2, p. 430-7,1998.

RAJOTTE, D.; RUOSLAHTI, E. Membrane dipeptidase is the receptor for a lung-targeting peptide identified by in vivo phage display. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 17, p. 11593-8,1999.

RAMOS, C. R. et al. 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. 1103-9,2004.

RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 3, n. 5, p. 445-50,2000.

RAWLINGS, N. D. et al. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Res.**, v. 36, n. Database issue, p. D320-5,2008.

REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **The American J. Hygiene**, n. 27, p. 493-7,1983.

REN, S. X. et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. **Nature**, v. 422, n. 6934, p. 888-93,2003.

ROD'EN, L. Highlights in the history of heparin. In: LANE, D. e LINDAHL, U. (Ed.). **Heparin: chemical and biological properties, clinical applications**. London: Edward Arnold, 1989. p.1-23.

ROSANDER, A. et al. Phage display as a novel screening method to identify extracellular proteins. **J. Microbiol. Methods.**, v. 51, n. 1, p. 43-55,2002.

ROSANDER, A. et al. Identification of extracytoplasmic proteins in *Bradyrhizobium japonicum* using phage display. **Mol. Plant. Microbe Interact.**, v. 16, n. 8, p. 727-37,2003.

ROSTAND, K. S.; ESKO, J. D. Microbial adherence to and invasion through proteoglycans. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 1, p. 1-8,1997.

SEIXAS, F. K. et al. Evaluation of different ways of presenting LipL32 to the immune system with the aim of developing a recombinant vaccine against leptospirosis. **Can. J. Microbiol.**, v. 53, n. 4, p. 472-9,2007.

SHEETS, M. D. et al. Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 95, n. 11, p. 6157-62,1998.

SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS. **Expasy**. Disponível em:
< <http://www.expasy.org/tools/>>. Acesso em 20mai 2012.

SIDHU, S. S.; WEISS, G. A.; WELLS, J. A. High copy display of large proteins on phage for functional selections. **J. Mol. Biol.**, v. 296, n. 2, p. 487-95,2000.

SILVA, E. F. et al. 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. 6277-86,2007.

SKERKER, J. M. et al. Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: a system-level analysis. **PLoS Biol.**, v. 3, n. 10, p. e334,2005.

SMITH, G. P. Surface display and peptide libraries. **Gene**, v. 128, n. 1, p. 1-2,1993.

SMITH, R. A.; DUNCAN, M. J.; MOIR, D. T. Heterologous protein secretion from yeast. **Science**, v. 229, n. 4719, p. 1219-24,1985.

SOTO, G. E.; HULTGREN, S. J. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. **J. Bacteriol.**, v. 181, n. 4, p. 1059-71,1999.

SRIVASTAVA, S. K. Prospects of developing leptospiral vaccines for animals. **Indian J. Med. Microbiol.**, v. 24, n. 4, p. 331-6,2006.

STEVENSON, B. et al. Leptospira interrogans endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. **PLoS One**, v. 2, n. 11, p. e1188,2007.

TER HUURNE, A. A. et al. Characterization of three putative Serpulina hyodysenteriae hemolysins. **Microb. Pathog.**, v. 16, n. 4, p. 269-82,1994.

THOMAS, C. J. et al. Biopanning of endotoxin-specific phage displayed peptides. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 307, n. 1, p. 133-8,2003.

VAN HOUTEN, N. E. et al. Engineering filamentous phage carriers to improve focusing of antibody responses against peptides. **Vaccine**, v. 28, n. 10, p. 2174-85,2010.

VAN HOUTEN, N. E. et al. Filamentous phage as an immunogenic carrier to elicit focused antibody responses against a synthetic peptide. **Vaccine**, v. 24, n. 19, p. 4188-200,2006.

VIEIRA, M. L. et al. Lsa63, a newly identified surface protein of Leptospira interrogans binds laminin and collagen IV. **J. Infect.**, v. 60, n. 1, p. 52-64,2010.

VINETZ, J. M. Leptospirosis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 14, n. 5, p. 527-38,2001.

WACK, A.; RAPPUOLI, R. Vaccinology at the beginning of the 21st century. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 17, n. 4, p. 411-8,2005.

WADSTROM, T.; LJUNGH, A. Glycosaminoglycan-binding microbial proteins in tissue adhesion and invasion: key events in microbial pathogenicity. **J. Med. Microbiol.**, v. 48, n. 3, p. 223-33,1999.

WEBSTER, R. Filamentous Phage Biology. In: (Ed.). **Phage Display Libraries: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. cap. 1.1.

WELLCOME TRUST SANGER INSTITUTE. **Pfam**. Disponível em:
< <http://pfam.sanger.ac.uk/>>. Acesso em: 02mai. 2012.

WELLCOME TRUST SANGER INSTITUTE. **MEROPS**. Disponível em:
< <http://merops.sanger.ac.uk/>>. Acesso em: 02mai. 2012.

WILSON, D. R.; FINLAY, B. B. Phage display: applications, innovations, and issues in phage and host biology. **Can. J. Microbiol.**, v. 44, n. 4, p. 313-29,1998.

WILSON, J. W. et al. Mechanisms of bacterial pathogenicity. **Postgrad. Med. J.**, v. 78, n. 918, p. 216-24,2002.

WIZEMANN, T. M.; ADAMOU, J. E.; LANGERMANN, S. Adhesins as targets for vaccine development. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 5, n. 3, p. 395-403,1999.

WOLGEMUTH, C. W. et al. The flagellar cytoskeleton of the spirochetes. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, v. 11, n. 3-5, p. 221-7,2006.

XIE, Q. et al. In vitro system for high-throughput screening of random peptide libraries for antimicrobial peptides that recognize bacterial membranes. **J. Pept. Sci.**, v. 12, n. 10, p. 643-52,2006.

YANG, H. L. et al. In silico and microarray-based genomic approaches to identifying potential vaccine candidates against *Leptospira interrogans*. **BMC Genomics**, v. 7, p. 293,2006.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Sequências das proteínas selecionadas nos experimentos de *panning* com a região clonada no fago em destaque.

Legenda: região sublinhada: região clonada no bacteriófago
em vermelho: seqüência sinal predita pelo SMART
em azul: domínios preditos pelo SMART/Pfam
realce em cinza: sobreposição de domínios

***Panning* contra heparan sulfato proteoglicano:**

>LIC10721 (proteína hipotética)

MRNIIFIFISFTSYNLSADIPDLKGCKPKIEWICILTRNENNKIEFYVQNRTPSGEYPFSVNFYFTSLENFESDV
TLPYRFISRGSSSEPKILTISPIDIYKSSSYSSQIYVRAGDNNAPKENMIPYRLPFESTSRVGQGYKGKFTHAGT
IPYALDFVLPEGSSVLAAKGGLVIAKEDKYQSGGIHPSFKDKANFIQILHKDGSIAEYAHLKYKSVFVQIGQIIQ
TGDKIALSGNTGFSSAPHLHFHVLRPSIDFQTLESFPTSFETDEGVLDELKTGTVYWNPSKVLPAKIFFEEDLK
ICSDLVQKKLLDCEEKLNPQKRAILALEVKKPGKYDLKVEVCNPNFVCKRIDWILQPEWKSSIFYLDWNLFPEQM
TGNRYRIQVINDIEIIKTWVVER*
Pfam: Peptidase_M23

>LIC10465 (Lig A)

MKKIFCISIFLSMFFQSCMSWPLLTSLAGLAAGKRGGDSSFFHLLLGNSNP**TITRIELSYQDSS**IANGTSTTLEV
TAIFDNGTNQNITDSTSIVPDSQS~~VVTIEGNRV~~RGIASGSSIIKAEYNGLYSEQKITVTPAILNSIQVTSLES
LPGKGNRQFSAIGIFSDGSHQDISNEPLIVWSSSNPDLVRVDDSGLASGINLGTAHIRASFQSKQGAEMTVGDA
VLSQIQVTSNDLNIPLGKKQKLTATGIYSDNSNRDISSSVIWNSSNSTIANIQNNGILETADTGIVTVSASSENI
IGSVKLIVTPAALVSISVSPNTSTVAKGLQENFKATGIFTDNSNSDITDQVTWDSSNTDILSISNASDSHGLAST
LNQGNVKVTASIGGIQGSTDFKVTQAALTSIEVSPTRTSIAKGLTQKFTAIGIFTDNSKKDITDQVTWNSSSAIV
SVSNLDNNKGLGKTNSVGNTTITATLGKVSNGNTWFTVVPVAVLTSIQINPVNPSLAKGLTQKFTATGIYSDNSNKD
ITSVAVTWFFSSDSSIATISNAQKNQGNAYGAATGATDIKATFGKVSSPVSTLSVTAAKLVEIQITPAAASKAKGLT
ERFKATGIFTDNSNSDITNQVTWNSSNTDILT~~VSNTNAK~~RLGSLTKQGTVKVTASMGGIEDSVDFTVTQATLTS
IEVSPTRASIAKGMTQKFTATGIFTDHSKKNITEQVTWKSSSKALSMLNAPGEEGTGKAI~~AVGKTTITATLE~~KLS
GKTDITVTPAVLTSIQISPVKHS~~LVKGLTEKFS~~ATGIYSDNSNKDITSSVTHSSNNSVATISNTKGYQQQAYGT
GTGTVNIKATLGNVSSQVSKLSVTAAELTEIVLNPTSSHKAKGLTENFKATGVFTDNSTKDITDQVTWKSSNAAY
AKISNATGSKGVVNALSKGTSHISATLGSISSANATFQVTPARIASIEVTPNNFFLIKGLSHPFKAIGIYTDNTK
TDITKQVSWSSSDPNVASIDNTFSLAGSATAIDDGKTNITATLSDSMSASTTLYVTSAVLIDIEVKPSIFVLSEG
LTLQLTATGIYSDHSTHDLTQVVQWTSKSPSNIAIENTAGKKGKVTALAFGDSEFTATYDSIKSNRAWIFVNDEK
LVNITISSSQVLTDKGSAAQQFKAIGTFQGGSQQLDLDLVTWKSSDSKVVISNSNDDRGLTTALSVGSSKISAIY
GSIHSDSIDFEVTPEILASIKTEP*
SMART: Bacterial Ig-like domain

>LIC10464 (Lig B)

MKKIFCISIFLSMFFQSCMSWPLLTGLVGLTAGKKSNGLSFFHLLLGNFNP**TITRIELSYQDSS**IANGTSTTLEV
TAIFDNGTNQNITDSTSIVPDSQS~~VVTIEGNRV~~KGIASGSSIIKAEYNGLYSEQKITVTPAILNSIQVTSLES
LPGKGNRQFSAIGIFSDGSHQDISNEPLIVWSSSNPDLVRVDDSGLASGINLGTAHIRASFQSKQGAEMTVGDA
VLSQIQVTSNDLNIPLGKKQKLTATGIYSDNSNRDISSSVIWNSSNSTIANIQNNGILETADTGIVTVSASSENI
IGSVKLIVTPAALVSISVSPNTSTVAKGLQENFKATGIFTDNSNSDITDQVTWDSSNTDILSISNASDSHGLAST
LNQGNVKVTASIGGIQGSTDFKVTQAALTSIEVSPTRTSIAKGLTQKFTAIGIFTDNSKKDITDQVTWNSSSAIV
SVSNLDNNKGLGKTNSVGNTTITATLGKVSNGNTWFTVVPVAVLTSIQINPVNPSLAKGLTQKFTATGIYSDNSNKD
ITSVAVTWFFSSDSSIATISNAQKNQGNAYGAATGATDIKATFGKVSSPVSTLSVTAAKLVEIQITPAAASKAKGLT
ERFKATGIFTDNSNSDITNQVTWNSSNTDIAEIKNTSGSKGITNTLTPGSSEISAALGSIKSSKVILKVTAPAQLI
SIAVTPINPSVAKGLIRQFKATGTYTDHSVQDV~~TALATWSSSNPGKAMVNNVTGSVTT~~VATGNTNIKATIDSISG
SSVLNVTPALLTSIEITPTINSITHGLTKQFKATGIFSDKSTQNLTLQVLTWISSDPSKIEIENTSGKKGIATASK

LGSSNIKAVYKFIQSSPIPIVTDLKLKSITISPSSSSIAKGLTQQFKAIGTFIDGSEQEITNLVTWYSSKSDVA
PINNAANAKGLATALSIGSSNISAIYNSISSNKINFNVSAATLDSIKINPVNNIAKGLTQQYTALGVYSDSTIQ
DISDSVTWSSSNSDSISISNSTETKGKATALQIGNSKITATYNSISENIDITVSAATLSSISISPINTNINATVS
KQFFAVGTYSDBGTKADLTSSSVTWSSSNKSQAKVSNASKTKGLVTGIASGNSIITATYGSVSGNTILTVNKTDITIA
PTVQSVVSLSPPTTIQVVYSEINNKALDLNFKYIIDSSNFIGHCSDNTDFNSNSQTADFSLSSIKGSKNTFTIT
LSHSQILNKSYTLVVNKQGIHDLSSIPNSLSCPNNSDFIGKEQLKLTSAVCNSLNQVIVSFSKPLYSGKEATKSV
ECSNPSQCESRYKFAGVSSLGSITSVRILDGKVCGGAPADSSKICLTHSLLQSGGQYTIIAANDLNGDGFNDKSW
GAIRDSFDQENLQSSPKDRINFIGCGNSPLNFMDDGPIMSDPFGDGSDFGFLVDYNNQIYLGPNVKGNAARFNYD
GTFPESIFFSFTKDINADNRASSRDGGIPVPNYVTIGHTGCTLNSADITTCGCPDNEDGRGVFAIGSLNKKSHIF
IAGSRPRRFDYLYSSD TDNLNFKYIDMGEITGTATAGTSSIAVIDDRIHVGFAGKKNKLNAPDFGKITFTNTSD
QNRCAAGNNDASDGYRGNRFRIDRMPYFGGLSVEDADNYETYS DNSSINWGYVVGIDSLFVFKELYAANGGF
PNSLHNGSIIHSTANPSPCEGNSNRCSWKDTAPRSNPKWHNSPHNNWFSLELTKYRNLI PADKAFSQFAEFNGR
LYVTRTICVTKEDHSGLRQSLQTVEGCTDGSYTNRRPQLWKCDPTLTGDTTTC EAEDWSLVGDNGTGFTNFGDNS
NHSMTMMVASGSYLYIGFDNENGIQIWRTNLENPGSSSHNWEPIGIGGLRDVTNRQIYSAISGMNFGVNFVYISV
GNKNKPKVIYRQQNQ*

Pfam: transmembrane

SMART: Bacterial Ig-like domain

Panning contra rim:

>LIC10678 (regulador de resposta)

MSPTPNYSSYTFLAVDDSEINLKLIVHTLQPFQIFTAESAADARNVLLTNRIDVLLLDVSMPDQDGFSCREL
REIERFKLLPILFITGINREVGFD EAI SHGGDDFIQKPFQPKELIAKIRAFIRIKILQDELLEQKKNYERELIMA
RKVQQELLPEKELEWNGVSLSTIFQPLMQIGGDYTD AWIEDDSLHIFIADCSGHGPSAALLAAMLKMQVSSLS PD
QSLQEKVQTLRHNLEKILPDEFSITFFYGI LHKDLSFEYSNGGHPAPMLYQNGEVSILPGMGPLIIP I EINVKEE
FKSVQLQKDSYMLLYTDGATEISDKSMNILGEDKLKKIFQESVSIGGDILVSMMESILAHSDRGTNDDDIAMMVL
KL*

Pfam: Rec domain

response regulator domain

>LIC11523 (proteína quimiotáctica)

MFRKNLGIWIGLAITINGFVFLSIQNFRGPNPSTETNFEEQLQSVQHSSSEFLKTEESISEFLLYLSLGKEKETL
VSSLEEIEKNLKNLRSSSFESDRKKNPAILKFDKKIGTLFSSIEELKEKIYRSKDIKDDTSFLKSDFFTDLSF
RRTRLEAVKELSNSVETASVTVVSSTPTEIQFLVTILEYSGISILLISFLWWSNRSNQRTILNLEMEFLRMRTAV
DNVTTNIMMADRNFNIVYMNKAIQMMFNKAESDIKKQLSNFNLSNLMGTNIDS FHKNPAPHQRGLLDKLSDTFRSS
ITIGGREFDLIANPIADVNGNKLGTVVIEWSDVTEQNKIQKQRKLENEELTRVKVALDNVTTNIMMADRNLNVVYM
NKSIRAMFHS AEDDIKKQFNNDPSRLIGTNIDI FHKNPAYQRGLLDKLTDTFRSSINIGGRTFNLIANPIIDET
GDRLGSVIEWSDVTEQNKIAEQRKIENEELIRVKVALDNTSTNIMIADNEFNIRYMNQAVVKMF EIGEGDIKKQF
AHFNLKSLVGSNIDQFHKNPAPHQRGVLSSTFGIHKATIKIGGRTFDLIANPILDSNGKRLGSVIEWSDVTNELAV
QEEVEGIVSAAAKGNFTTRISLDSKTGFFLNLSRSLNQLLEVSNRGLNEVVEALERISSGDLTQKITNEYHGTFG
KLKEYSNITMDKLSEIIGDIIVRSSSLVTSASEVSS TANSLSQGASEQAASVEETTSSLEEMTASIDQNAQNSRQ
TEQISSKSSQDAEEGGASVIETVKAMKQIAEKISIIEDIAYQTNLLALNAAIEAARAGDHGKGFVAVASEVRKLA
ERSQKSANEISSLAGNSVAIAEKAGNLISQIVPSIRKTADLVQEITAASDEQSSGVSEINKAMGQLDQVSQQNAS
ASEELAAISEEMNAQAEQLKESVLFFKISDGDKRLTNGGGLLHRDFSGTGIIKATPTTRKDLPGKISPITEKFER
Y*

Pfam: transmembrane

PAS domain

MA domain

>LIC12976 (lipoproteína)

MKIAILGSGIAGLSACWYLSKEHDVILIERHSLPGMDAHGTDISLKDGVFRFDVPFRAFKQNYYPCLIEMYNEAG
IEFRPVDYSFSLSERDGTTFYQFATIGIGGNFYPFVSPVCFKNGESRKIFSDTIRFYGESAKQLES LRGEQLTIS
GFLQRFYGSKEFENKYLIPMFATINTCTILSAKNYPAEAVIRYHSGKGLKFLRFLTASHGTKDITEKLSIGAKELR
LKTNPRIEQNGKKVFSFDDGKEEFDRV IATPANQAISLLPDEMAPEKELLSSFHYEESI LMHTDPSFMPNK
KRHWAPLCFTLSPETDKPSATIRLNKVLPEIGKVEIFQTWNP LEEPKRGT LISRSRFERPIIDLKNQKTVEKLKA
LQEQPGRKIWF CGSYARYGIPLLEAGVSTSLDVKRWVENSERF*

Panning contra soro de paciente infectado:

>LIC10284 (Tly A)

MAREKIRLDVLLFERGFADSLEKAKSLILSGSVLVNEQKITKVGFKFPKDSEIRILNIIPEYVSRGVYKLLKAFF
VFPLQVDGKLCIDLGAFTGGFTQVLLLEKGAWKVFACDVGYGQLAEKLRNHSSVIVKDRFHLKNLSALEIDWENNR
FQTPHPEAIVIVMDLSFISLRSVFPVIQKLRKEKDIPKLECVSLIKPQFEANRNDLVKGILKDSKIRFQIVLSLC
RYLKKEIGGFVLGLEWSPIEGRDGNKEILLFWSL*

Pfam: [heat shock protein domain](#)

>LIC11345 (proteína receptora TonB)

MEKTKPFIIVFSLKNNIIFYFFLSFLSLETFFFFPVRVFSQEHSKQFKKESSETKDLKTEELNKDEKQSEGIFVKG
YTGKGLTGMKQNVRLKDIPATVKIIDYKELKARAADQWLSAISYVPGIFVIQNYGGFNTLTIRGLDSRNTLLLLKD
GARDDTFLIQNSSPMSNLTNVERIEILKGPNSVLYGQGAMAGVIHIITKKPQKKAGYEFSTKGNFGSKRAYVGA
TGPIGTESLRYRIDAATSEYQGFRKNSYNLNNISTSFWDISVKHTLSILSGKNFDFIKPDAGLPKSKKPNIDLI
APGVYLNNNYNTKEDYLNESGNFKIQLDKFSNKLSMKSFISYLPQTYYYFSAEDLTISSRDENTIERDHFHFE
TKRSPLQGTVELQCIFQTGFKHKLLSGEYHWMVSRHRQRYFPIGSTNINVLYPQIDLTQSLPVNFKDRKILYQQ
MHSLYFQDLMELSKIIFVLGGRYDSWVRENVTEKLSWNDRYVSKPEDRTIHRFDAKVF~~TYRLGLVYQPLHYTT~~
~~AYVGYSTAFIPVTFINIKGNQLKPEMGEQIELGQRLEFAKGKIQLTSALFAAKKYDVAVRINSKPALYNQAGELR~~
~~TNGYEFDIDLRLTQRWSLKSGYAHTIAEWESFRFVNSKGNEIDYKGNRPINVPRNTANLWTTYTFASGLGFGGLGG~~
RYIDSIAGDNANSFSIPPYGLYDASLYYQYKHFRFQINCNNISNKKYFISSTPNPTPGPPRQFLFTASAKF*

Pfam: [transmembrane domain](#); [TonB domain](#)

APÊNDICE B - Tabela resumindo as análises pelos programas disponíveis em rede das proteínas selecionadas nos experimentos.

Proteína	Seleção	Ciclo	Sequência sinal (SMART)	TMHMM2	Pfam	Psorth
LIC10721	heparan sulfato	III e IV	1-16		peptidase M23	citoplasmática
LIC10678	rim	III	-		domínio REC	citoplasmática
LIC11523	rim	III	1-22		domínios PAS e MA	citoplasmática
LIC12976*	rim	IV (duas vezes)	1-16		domínio ligador de nucleotídeo	citoplasmática
LIC10284	soro de paciente	I	-		S4-domínio ligador RNA	citoplasmática
LIC11345	soro de paciente	III	-	transmembrane region	receptor TonB dependente	membrana externa

* Anotada no genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni como lipoproteína

APÊNDICE C - Curva do Índice de Refração dos tampões e das amostras coletadas

APÊNDICE D - Sequência da proteína LigB de *L. interrogans* sorovar Copenhageni e seus domínios Big (*Bacterial immunoglobulin-like* - Big 1 ao Big 12).

10464 LigB	(1)	1	Signal Peptide	→	rLB-Nt	Big1	90
			MKKIFCISIFLSMFFQSCMSWPLLTGLVGLTAGKKSNGLSFFHLLLGNFNP			TITRIELSYQDSSIANGTSTTLEVTAFDNGTNQNTIDL	
10464 LigB	(91)	91			Big2	180	
			TSIVPDSQSQSVVTIEGNRVKGIASGSSIIKAEYNGLYSEQKITVTPA			ILNSIQVTSLESGLPKGTNRQFSAIGIFSDGSHQDISNEPLIV	
10464 LigB	(181)	181			Big3	270	
			WSSSNFDLVRVDDSGLASGINLGTAHIRASFQSKQAEEMTVGDA			VLSQLQVTSNDLNIPLGKKQKLTATGIYSDNSNRDISSSVIWNSS	
10464 LigB	(271)	271			Big4	360	
			NSTIANIQNNGILETADTGIVTVSASSENIIIGSVKLIVTPA			ALVSISVSPTNSTVAKGLQENFKATGIFTDNSNDITDQVTWDSSTNDI	
10464 LigB	(361)	361			Big5	450	
			LSISNASDSHGLASTLNQGNVKVTASIGGIQGSTDFKVIQA			ALTSIEVSPTRTSIAKGLTKQFTAGIFTDNSKKDITDQVTWNSSAIV	
10464 LigB	(451)	451			Big6	540	
			SVSNLDNNKGLGKTNSVGNTTITATLGKVSQNTWFTVPA			VLTSIQINPVNPSLAKGLTKQFTATGIYSDNSNKDITSAVTWFSDDSSIA	
10464 LigB	(541)	541			Big7	630	
			TISNAQKNQGNAYGAATGATDIKATFGKVSSPVSTLSVTA			AKLVEIQITPAAASKAKGLTERFKATGIFTDNSNDITNQVTWNSSNTDI	rLB-Nt ←
10464 LigB	(631)	631			Big8	720	
			AEIKNTSGSKGITNTLTPGSSEISAALGSIKSKVILKVTPA			QLISIAVTPINPSVAKGLIRQFKATGTYTDHVSQDVLTALATWSSSNFG	
10464 LigB	(721)	721			Big9	810	
			KAMVNN--VTGSVTTVATGNTNIKATIDSISGSSVLNVTPA			LLTSIEITPTINSITHGLTKQFKATGIFSDKSTQNLTLQVLTWISSDPK	
10464 LigB	(809)	811			Big10	900	
			IEIENTSGKKGIATASKLGSSNIKAVYKFIQSSPIPIVTDL			KLKSIITISPSSSSIKAGLTQQFKAIGTFIDGSEQEITNLVTWYSSKSD	
10464 LigB	(899)	901			Big11	990	
			VAPINNAANAKGLATALSIGSSNISAIYNSISSNKINFNVSAT			LDSEIKINPVNNNIAKGLTQQYTALGVYSDSTIQIDISDSVTWSSNS	
10464 LigB	(989)	991	cloneF11		Big12	1080	
			DSISISNSTETK GKATALQIGNSKITATYN-SISENIDITVSA			ATLSSISISPINTNINATVSKQFFAVGTYSYGTRKADLTSSVTVSSSN	
10464 LigB	(1078)	1081				1170	
			KSQAKVSNASKTKGLVTGIASGNSIITATYGSVSGNTILT			VNKTDTIAPTQSVVLSPTTIQVVYSESINNKEALDLSNYKIIDSSNFI	
10464 LigB	(1168)	1171	cloneF11			1260	
			GHCSDNDFNSNSQTADFSLSSIKGSKNTFTITLSHSQILN			KSQYTLVNVKQGIHDLSSIPNSLSCPNNSDFIGEQLKLTSAVCNSLNQV	
10464 LigB	(1258)	1261				1350	
			IVSFSKPLYSGKEATKSVECSNPSQCESRYKFAGVSSLSG			SITSVRILDGKVCGGAPADSSKICLTHSLQSGGQYTIIAANDLNGDGF	
10464 LigB	(1348)	1351				1440	
			KSWGAIKRSFDQENLQSSPKDRINFIGCGSNPLNFM			DGPIMSDPFGDGSDFGLVDYNNQIYLGPNVKNQAARFNYDGT	
10464 LigB	(1438)	1441				1530	
			KDINADNRASSRDGGIPVPNYVTIHTGCTLNSADITTC			GCPDNEDGRGVFAIGSLNKKSHIFIAGSRPRRFDLYYSSD	
10464 LigB	(1528)	1531				1620	
			DMGEITGTATAGTSSIAVIDDRIHVGFACNNKLNAPDF			GKITFNTSDQNRCAAGNCDASDGYRGNFRIDRMPYFGGLS	
10464 LigB	(1618)	1621				1710	
			YTSNDSINWGYVVIDSLFVFKELYAANGGPNLSLHNGS			IIHSTSANPSPCEGNSRCSSWKDTAPRNPKNWNSPHNNWF	
10464 LigB	(1708)	1711				1800	
			NLIPADKAFSQFAEFNGRLYVTRTICVTKEDHSLRQSL			QTVGCTDGSYTNRRPQLWKCDPTLTGDTTTC	
10464 LigB	(1798)	1801				1890	
			DNSNHSMTMMVASGSYLYIGFDNENGIQIWRNLEN			PGSSSHNWEPIGIGGLRDVTNRQIYSAISGMNFGVNFVY	
10464 LigB	(1888)	1891					
			QNQ*				

Os domínios Big estão representados em negrito, a proteína recombinante rLB-Nt está representada por flechas e a proteína recombinante rLB-Ct está grifada. O clone de fago selecionado está em cinza.

APÊNDICE E - Trabalhos publicados em revistas científicas no período do doutoramento