LEANDRO TOSHIO KOCHI

Avaliação do papel funcional de duas proteínas de *Leptospira interrogans* no processo de adesão do patógeno ao hospedeiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia

**São Paulo
2018**

LEANDRO TOSHIO KOCHI

Avaliação do papel funcional de duas proteínas de *Leptospira interrogans* no processo de adesão do patógeno ao hospedeiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lucia Tabet Oller do Nascimento

Versão original.

**São Paulo
2018**

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Kochi, Leandro Toshio

Avaliação do papel funcional de duas proteínas de *Leptospira interrogans* no processo de adesão do patógeno ao hospedeiro / Leandro Toshio Kochi; orientadora Ana Lucia Tabet Oller do Nascimento. -- São Paulo, 2018.

111 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. *Leptospira*. 2. Leptospirose. 3. Proteína recombinante. 4. Patogênese. I. Tabet Oller do Nascimento, Ana Lucia, orientador. II. Título.

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

Candidato (a): Leandro Toshio Kochi

Título da Dissertação: Avaliação do papel funcional de duas proteínas de *Leptospira interrogans* no processo de adesão do patógeno ao hospedeiro

Orientador: Dra. Ana Lucia Tabet Oller do Nascimento

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o (a) candidato (a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a):	Assinatura:.....
	Nome:.....
	Instituição:.....

Examinador(a):	Assinatura:.....
	Nome:
	Instituição:

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Presidente:	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

butantan

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação do papel funcional de duas proteínas de *Leptospira interrogans* no processo de adesão do patógeno ao hospedeiro", protocolado sob o CEUA nº 6819120116, sob a responsabilidade de **Ana Lucia Tabet Oller do Nascimento e equipe; Leandro Toshio Kochi; Aline Florencio Teixeira; Luis Guilherme Fernandes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 18/05/2016.

We certify that the proposal "Evaluation of the functional role of two *Leptospira interrogans* proteins in the adhesion process of the pathogen to the host.", utilizing 20 Isogenics mice (20 females), protocol number CEUA 6819120116, under the responsibility of **Ana Lucia Tabet Oller do Nascimento and team; Leandro Toshio Kochi; Aline Florencio Teixeira; Luis Guilherme Fernandes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 05/18/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **03/2016** a **02/2018**

Área: **Biociências**

Procedência: **Biotério Central**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **30 a 45 dias**

N: **20**

Linhagem: **Balb/c**

Peso: **18 a 22 g**

Resumo: A leptospirose é uma zoonose de importância global recentemente incluída na lista das Doenças Tropicais Negligenciadas. Em áreas urbanas, os roedores desempenham o papel de principais reservatórios da doença por permitirem a colonização das leptospiros nos túbulos renais proximais e as excretarem vivas na urina. Não há vacina eficaz até o momento. A identificação de proteínas da membrana externa conservadas entre cepas patogênicas são os principais alvos de pesquisa para elucidar os mecanismos de patogenicidade. São estas proteínas que, provavelmente, estão envolvidas na interação das leptospiros com o ambiente externo, podendo também servir de alvo para o sistema imune do hospedeiro. Vários grupos de pesquisa tem buscado identificar e caracterizar proteínas de superfície que sejam antigênicas e conservadas nos diversos sorovares de *Leptospira interrogans*. Nesse sentido, o presente projeto propõe clonar e expressar duas preditas lipoproteínas de *Leptospira* codificadas pelos genes LIC12587 e LIC1711. As proteínas recombinantes serão purificadas por cromatografia de afinidade a metal e inoculadas em camundongos para avaliação da sua atividade imunogênica e obtenção de soros imunes. Estes soros serão utilizados como sonda para avaliar a presença de proteínas no extrato total de *Leptospira* spp de diferentes sorovares a fim de estudarmos sua conservação e localização celular. As proteínas presentes em diferentes leptospiros patogênicas serão avaliadas quanto à reatividade com anticorpos em soros de pacientes diagnosticados com a doença e sua capacidade de interagir com componentes da matriz extracelular e do soro humano, para avaliação das mesmas no processo de adesão ao hospedeiro.

Local do experimento: **Infectório do Centro de Biotecnologia**

São Paulo, 18 de maio de 2016

Jose Ricardo Jensen
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Maria Leonor Sarno de Oliveira
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº 806/2016 referente ao projeto intitulado: *"Avaliação do papel funcional de duas proteínas de Leptospira interrogans no processo de adesão do patógeno ao hospedeiro"* sob a responsabilidade de **Leandro Toshio Kochi** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Ana Lúcia Tabet Oller do Nascimento**, do Departamento de Biotecnologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pela **CEPSH** - Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 14 de abril de 2016.

Prof. Dr. **Paolo M. A. Zanotto**
Coordenador CEPSH ICB/IUSP

*Aos meus pais, Choei e Ivete, principais
responsáveis pela minha educação e
formação, dedico este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo simples fato de viver e poder desfrutar de experiências magníficas ao longo da vida.

Aos antepassados, que se sacrificaram deixando a terra natal para encontrar aqui uma nova esperança de vida.

Aos meus pais, Ivete e Choei (in memoriam), pelo amor incondicional, pelas broncas merecidas e por todos os esforços para me educar e me moldar em um homem de caráter.

À minha irmã, Renata, minha melhor amiga e companheira de todas as horas, para sempre.

A todos os meus familiares, pelo apoio incondicional e por exemplificar perfeitamente o significado de “família”.

À Ana Cristina (Tininha), minha namorada, amiga e companheira. Agradeço por todo amor e paciência, por sempre estar ao meu lado nos momentos decisivos, pelos momentos maravilhosos que já passamos e pelos momentos que ainda vivenciaremos.

Aos irmãos que a vida me deu, Lucas, Cássio, André, Patrick, Bruno e Gustavo, pelos momentos de diversão e risadas... os bons momentos da vida!

Aos grandes amigos Rafael, Danilo, José, Bruno, Wiliam, Henrique e Leonardo, parceiros desde a escola, obrigado pelos incentivos e horas de jogatinas. GG WP.

À minha orientadora, Dra. Ana Lucia Tabet Oller do Nascimento, pela oportunidade dada em ingressar em um grupo de pesquisa de excelência no Instituto Butantan, pelo aprendizado diário e desenvolvimento da mentalidade crítica, que com certeza ajudaram muito para meu crescimento como cientista.

Ao Dr. Luis Guilherme Virgílio Fernandes, pela amizade e companheirismo diário, dentro e fora do laboratório, por toda a paciência e dedicação ao ensinar. Com certeza é mais um irmão que a vida me proporcionou.

Aos grandes amigos do Laboratório Especial de Desenvolvimento de Vacinas, Aline, Mônica, Fernanda, Priscila, Jademilson, Felipe Passalia, Amanda, Brenda, Jupciana, Gabriela, Lucas, Jadson, Maria Beatriz, Renan, Felipe Grabarz, Bruna e Maria Fernanda, por tornar o ambiente de trabalho mais alegre e produtivo.

Aos professores, que transmitiram seus conhecimentos durante as disciplinas e exames de qualificação e defesa do Mestrado, contribuindo para meu amadurecimento na ciência.

Aos membros do Laboratório de Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, Dr. Silvio Vasconcellos, Dr. Marcos Heinemann e Gisele Souza pela colaboração e fornecimento as culturas de leptospiros.

Ao Dr. Enéas de Carvalho pelos ensaios de dicroísmo circular e ensinamento teórico desta técnica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por todo o período do Mestrado sob processo n° 2016/01384-5, possibilitando a realização de todas as atividades acadêmicas e participações em eventos científicos nacionais e internacionais, juntamente com o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Butantan.

A todos, os meus mais sinceros agradecimentos.

Muito obrigado!

*“Toda pessoa possuidora de algum mérito tem
consciência de que em seu interior existe uma
força que não para de incitá-la ao progresso
infinito”*

Mestre Masaharu Taniguchi

RESUMO

KOCHI, L. T. **Avaliação do papel funcional de duas proteínas de *Leptospira interrogans* no processo de adesão do patógeno ao hospedeiro.** 2018. 111 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A leptospirose é uma zoonose de distribuição global causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*. A doença possui um quadro de manifestações clínicas muito variadas em humanos, que pode apresentar febre, dores de cabeça e muscular, até um quadro clínico mais severo, conhecido como síndrome de Weil, caracterizado por hemorragias, icterícia, falência renal e hepática. Até o presente momento, os mecanismos de patogenicidade da leptospira não são totalmente claros e não existe uma vacina eficaz contra a doença. O sequenciamento de genomas de leptospiros patogênicos possibilitou a identificação de proteínas da membrana externa conservadas entre cepas patogênicas, que são os principais alvos de pesquisa para elucidar os mecanismos de patogenicidade e possivelmente o desenvolvimento de uma vacina. Nesse sentido, foram selecionados por bioinformática os genes LIC11711 e LIC12587 a partir do genoma sequenciado de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni, os quais codificam para duas preditas lipoproteínas hipotéticas de funções desconhecidas. Os genes foram amplificados por PCR a partir do DNA genômico da bactéria e clonados no vetor de expressão pAE. As proteínas recombinantes foram expressas em *E. coli* BL21 DE3 Star pLysS e purificadas por cromatografia de afinidade a metal. As proteínas recombinantes foram inoculadas em camundongos para avaliação da sua atividade imunogênica e obtenção de soros imunes. Ambas as proteínas recombinantes se mostraram reativas com anticorpos em soros de pacientes diagnosticados com a doença, apresentando uma sensibilidade maior em relação ao teste de aglutinação microscópica (MAT), e alta especificidade, diferenciando anticorpos presentes em soros de pacientes diagnosticados com outras doenças não relacionadas. Os resultados de ELISA de bactéria intacta, proteólise por proteinase K e imunofluorescência sugerem que ambas as proteínas estão localizadas na membrana externa bactéria. Com base no ensaio de conservação por western blotting, as proteínas nativas estão presentes em diferentes cepas patogênicas de *Leptospira*, e ausentes na espécie saprófita *L. biflexa*. Em ensaios de adesão *in vitro*, as proteínas recombinantes interagiram com os componentes humanos laminina, e-caderina, plasminogênio, fibrinogênio, fibronectina plasmática,

vitronectina, C7, C8 e C9 de forma dose-dependentes, porém com valores de afinidade baixos. Estes resultados sugerem que as proteínas codificadas pelos genes LIC11711 e LIC12587 são expressas durante a patogênese e podem desempenhar múltiplas funções a partir da interação com diferentes componentes, e deste modo auxiliam nas etapas de invasão, disseminação e evasão do sistema imune, auxiliando as leptospiros no processo de infecção.

Palavras-chave: *Leptospira*. Leptospirose. Proteína recombinante. Patogênese.

ABSTRACT

KOCHI, L. T. **Evaluation of the functional role of two *Leptospira interrogans* proteins in the adhesion process of the pathogen to the host.** 2018. 111 f. Dissertation (Master thesis in Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Leptospirosis is a zoonosis of global distribution caused by pathogenic bacteria of the genus *Leptospira*. The disease has a wide range of clinical manifestations in humans, which can present with fever, headaches and muscular pain, to a more severe clinical condition, known as Weil's syndrome, characterized by hemorrhages, jaundice, renal and hepatic failure. So far, the pathogenicity mechanisms of leptospira are not entirely clear and there is no effective vaccine against a disease. Sequencing of pathogenic leptospire genomes has enabled the identification of conserved outer membrane proteins among pathogenic strains, which are the main research focus to understand the mechanism of pathogenicity and possibly identify a vaccine candidate. In this sense, the genes LIC11711 and LIC12587 were selected from the genome sequence of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni by bioinformatics, which encode two hypothetical predicted lipoproteins of unknown functions. The genes were amplified by PCR from the genomic DNA of the bacteria and cloned into pAE expression vector. The recombinant proteins were expressed in *E. coli* BL21 DE3 Star pLysS and purified by metal affinity chromatography. Recombinant proteins were inoculated in mice to evaluate their immunogenic activity and to obtain immune sera. Both recombinant proteins are reactive with antibodies in sera from patients diagnosed with a disease, presenting higher sensitivity than the microscopic agglutination test (MAT), high specificity, differentiating antibodies present in sera from patients diagnosed with other non-specific diseases related. The results of intact bacterial ELISA, proteinase K proteolysis and immunofluorescence suggest that both proteins are located in the surface of the bacteria. Based on western blotting conservation assay, the coding sequences are present in different pathogenic strains of *Leptospira*, and absent in the non-pathogenic *L. biflexa*. In *in vitro* adhesion assays, recombinant proteins showed interaction with the human components laminina, e-cadherin, plasminogen, fibrinogen, plasma fibronectina, vitronectin, C7, C8 and C9, in dose-dependent manner, but with low affinity values. These results suggest that the proteins encoded by the genes LIC11711 and LIC12587 are expressed during the infection and may perform multiple

tasks and thus assist in the steps of invasion, dissemination and evasion of the immune system, helping leptospires during the establishment of the disease.

Keywords: *Leptospira*. Leptospirosis. Recombinant protein. Pathogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Leptospiras no ambiente e no hospedeiro	24
Figura 2. Classificação taxonômica de espiroquetas	25
Figura 3. Ciclo da infecção por leptospirose.	27
Figura 4. Casos confirmados e óbitos por leptospirose no Brasil de 2000 a 2015	28
Figura 5. Mapa do plasmídeo P-GEM T Easy	40
Figura 6. Mapa do vetor de expressão pAE.....	41
Figura 7. Análise da conservação das sequências da LIC11711 e LIC12587 entre espécies de <i>Leptospira</i> por alinhamento múltiplo usando Clustal Omega.....	59
Figura 8. Análise dos amplicons obtidos após PCR em diferentes temperaturas de anelamento por eletroforese em gel de agarose 1%.	60
Figura 9. Análise dos clones obtidos após transformação com plasmídeo pAE recombinante por ensaio de fenol-clorofórmio	61
Figura 10. Análise de restrição enzimática para confirmação da presença do inserto nos clones selecionados.....	61
Figura 11. Análise da expressão das proteínas recombinantes por SDS-PAGE.	63
Figura 12. Análise de purificação das proteínas recombinantes por western blotting ...	64
Figura 13. Espectros de dicroísmo circular.	66
Figura 14. Titulação de anticorpos nos soros de camundongos imunizados.....	67
Figura 15. Análise estrutural das proteínas recombinantes por western blotting e cromatografia de exclusão molecular.	69
Figura 16. Análise de conservação das proteínas de estudo em diferentes cepas de <i>Leptospira</i> por western blotting.....	71
Figura 17. Análise de localização celular das proteínas nativas em diferentes espécies de <i>Leptospira</i> por ELISA	73
Figura 18. Ensaio de acessibilidade da proteinase K por western blotting.	74
Figura 19. Ensaio de imunofluorescência de leptospiras viáveis para a detecção das proteínas referentes aos genes LIC11711 e LIC12587 por microscopia confocal.	76

Figura 20. Reatividade das proteínas recombinantes com soro de pacientes diagnosticados com leptospirose e outras doenças.....	78
Figura 21. Caracterização da ligação das proteínas recombinantes com componentes da matriz extracelular por ELISA.	80
Figura 22. Curvas de dose-resposta da ligação das proteínas recombinantes aos componentes da matriz extracelular	81
Figura 23. Avaliação da importância da porção carboidrato da laminina na interação com as proteínas recombinantes por ELISA.	82
Figura 24. Caracterização da ligação das proteínas rLIC11711 e rLIC12587 com componentes do plasma por ELISA	84
Figura 25. Curvas de dose-resposta da ligação das proteínas recombinantes aos componentes do soro humano	85
Figura 26. Avaliação do efeito inibitório da formação do coágulo de fibrina pelas proteínas recombinantes	86
Figura 27. Ensaio de interação das proteínas recombinantes ao plasminogênio por western blotting	87
Figura 28. Avaliação da ligação das proteínas recombinantes ao plasminogênio via resíduos de lisina por ELISA.....	88
Figura 29. Avaliação da atividade proteolítica do plasminogênio/plasmina ligado a proteínas recombinantes por ELISA	90
Figura 30. Caracterização da ligação das proteínas (A) rLIC11711 e (B) rLIC12587 com componentes do sistema complemento por ELISA.....	91
Figura 31. Curvas de dose-resposta de ligação das proteínas rLIC11711 e rLIC12587 aos componentes do sistema complemento por ELISA	92
Figura 32. Avaliação da importância do domínio HBD para a interação das proteínas recombinantes com a vitronectina	93
Figura 33. Obtenção dos componentes do sistema complemento provenientes de soro humano normal pelas proteínas recombinantes.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Vacinas contra leptospirose disponibilizada para humanos.	33
Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos para a amplificação dos genes de <i>L. interrogans</i> sorovar Copenhageni.	39
Tabela 3. Massa molecular e ponto isoelétrico teórico das proteínas recombinantes. ...	62
Tabela 4. Predição das estruturas secundárias das proteínas recombinantes	67

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	– Absorbância
ACA	– ácido aminocaproico
AIDS	– síndrome da imunodeficiência adquirida
Amp	– ampicilina
BSA	– albumina de soro bovino
C4BP	– C4 <i>binding protein</i>
Da	– Dalton
DC	– dicroísmo circular
ddNTP	– didesoxirribonucleotídeo
dNTP	– desoxirribonucleotídeo
DNA	– ácido desoxirribonucleico
DO	– densidade óptica
EDTA	– ácido etilenodiamino tetra-acético
MEC	– matriz extracelular
ELISA	– <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EMJH	– meio Ellinghausen, McCullough, Johnson e Harris
Fg	- fibrinogênio
FITC	– isotiocianato de fluoresceína
FH	– fator H
<i>g</i>	– gravidade
His	- histidina
IP	– iodeto de propídeo
IPTG	– isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
Kb	– quilobase
K _D	– constante de dissociação

LB – meio Luria-Bertani

Len – *leptospiral endostatin-like*

LIC – *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni

Lig – *leptospiral immunoglobulin-like*

LPS – lipopolissacarídeos

Lsa – leptospiral surface adhesin

MAT – teste de aglutinação microscópica

mAu – mili unidade arbitrária

OMP – *outer membrane protein*

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPD – dicloridrato de o-fenilenodiamina

PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS – tampão fosfato salino

PBSls – PBS *low salt*

PBS-T – tampão fosfato salino contendo 0,05% Tween 20

PBS-T/BSA – tampão fosfato salino contendo 0,05% Tween 20 e 1% de BSA

PBS-T/leite – tampão fosfato salino contendo 0,05% Tween 20 e 10% de leite desnatado

PCR – reação em cadeia da polimerase

pH – potencial hidrogeniônico

pI – ponto isoelétrico

PLA – plasmina

PLG – plasminogênio

PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonila

RNA – ácido ribonucleico

SDS – dodecil sulfato de sódio

Sinan - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde

TLR – toll-like receptor

T_m – temperatura de melting

tPA – ativador de plasminogênio do tipo tecidual

uPA – ativador de plasminogênio do tipo uroquinase

X-gal – 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	Microbiologia e biologia celular de <i>Leptospira spp.</i>	23
1.2	Classificação e taxonomia	25
1.3	A leptospirose	26
1.4	Leptospirose no Brasil	28
1.5	Diagnóstico e tratamento da leptospirose	29
1.6	Mecanismos de patogenicidade e fatores de virulência da <i>Leptospira spp.</i>	30
1.7	Vacinas contra leptospirose.....	32
1.8	Genômica funcional de <i>Leptospira</i>	34
2	OBJETIVO	36
2.1	Objetivos específicos	36
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1	Cepas de bactérias e soros utilizados.....	37
3.2	Análise por bioinformática	37
3.3	Amplificação por PCR dos genes	38
3.4	Clonagem dos genes	39
3.4.1	Clonagem no vetor pGEM-T Easy	39
3.4.2	Subclonagem no vetor pAE	40
3.5	Sequenciamento dos clones.....	42
3.6	Estudo de indução das proteínas recombinantes.....	43
3.7	Expressão e purificação das proteínas recombinantes.....	44
3.8	Espectroscopia de dicroísmo circular	45
3.9	Preparação de extrato de <i>E. coli</i>	45
3.10	Avaliação da imunogenicidade das proteínas recombinantes	45
3.11	Avaliação do estado oligomérico das proteínas expressas	46
3.12	Deteção de anticorpos em soros pacientes diagnosticados com leptospirose e outras doenças não relacionadas.....	48
3.13	Avaliação da conservação das proteínas em diferentes cepas de <i>Leptospira</i> por western blotting	48
3.14	Ensaio de localização das proteínas nativas em <i>L. interrogans</i>	49
3.14.1	Localização em leptospiros intactas por ELISA	49
3.14.2	Ensaio de acessibilidade por proteinase K por western blotting	50
3.14.3	Localização celular das proteínas em leptospiros por imunofluorescência	50

3.15	Ensaio de adesão das proteínas recombinantes aos componentes da matriz extracelular e plasma do hospedeiro por ELISA	51
3.15.1	<i>Componentes biológicos</i>	51
3.15.2	<i>Análise da interação dos componentes com as proteínas recombinantes.....</i>	51
3.15.3	<i>Curvas de dose-resposta</i>	52
3.16	Caracterização da ligação das proteínas recombinantes à laminina	53
3.17	Ensaio de inibição da formação do coágulo de fibrina pelas proteínas recombinantes.....	53
3.18	Ensaio de interação das proteínas recombinantes ao plasminogênio	54
3.18.1	<i>Caracterização da ligação das proteínas recombinantes ao plasminogênio por western blotting</i>	54
3.18.2	<i>Caracterização da ligação das proteínas recombinantes ao plasminogênio por ELISA</i>	54
3.18.3	<i>Ensaio de conversão de plasminogênio em plasmina por ELISA</i>	55
3.19	Caracterização da ligação das proteínas recombinantes a vitronectina usando a heparina como competidor	56
3.20	Ensaio de ligação das proteínas recombinantes aos componentes do sistema complemento provenientes de soro humano	56
3.21	Comitê de Ética.....	56
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1	<i>Análises in silico dos genes.....</i>	58
4.2	<i>Amplificação e clonagem dos genes</i>	59
4.3	<i>Sequenciamento dos genes.....</i>	62
4.4	<i>Expressão das proteínas recombinantes.....</i>	62
4.5	<i>Purificação das proteínas recombinantes.....</i>	64
4.6	<i>Espectroscopia de dicroísmo circular.....</i>	65
4.7	<i>Avaliação da imunogenicidade das proteínas recombinantes em camundongos</i>	67
4.8	<i>Avaliação do estado oligomérico das proteínas expressas</i>	68
4.9	<i>Ensaio de conservação antigênica das proteínas de estudo em diferentes espécies de leptospira.....</i>	71
4.10	<i>Ensaio de localização</i>	72
4.10.1	<i>Localização em bactéria intacta por ELISA</i>	72
4.10.2	<i>Ensaio de acessibilidade da proteinase K.....</i>	74
4.10.3	<i>Ensaio de Imunofluorescência</i>	75
4.11	<i>Reatividade com soros de pacientes diagnosticados com leptospirose e outras doenças não relacionadas.....</i>	77
4.12	<i>Adesão das proteínas recombinantes aos componentes da matriz extracelular ..</i>	79
4.13	<i>Adesão das proteínas recombinantes aos componentes do soro humano</i>	83

4.14	Caracterização da ligação das proteínas recombinantes aos componentes da via terminal do sistema complemento	90
5	CONCLUSÃO	96
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*	97

1 INTRODUÇÃO

1.1 Microbiologia e biologia celular de *Leptospira* spp.

As leptospiros são espiroquetas do gênero *Leptospira*, pertencente à ordem *Spirochaetales*. Morfologicamente, são extremamente finas e apresentam formato espiralado, característico das bactérias pertencentes a esta ordem. Possuem tamanho de 0,10 a 0,15 μm de diâmetro por 6 a 20 μm de comprimento e se distinguem das outras espiroquetas por possuírem a célula terminada em gancho e dois flagelos periplasmáticos axiais, responsáveis pela grande mobilidade da bactéria (Faine *et al.*, 1999; Haake, 2000; Picardeau, 2017).

Assim como as características morfológicas, a arquitetura membranar das leptospiros também é singular. Estruturalmente, possuem uma membrana externa que contém lipopolissacarídeos (LPS), características típicas de bactérias Gram-negativas, e uma espessa camada de peptidoglicano fortemente associada à membrana plasmática, sendo esta uma característica de bactérias Gram-positivas (Levett, 2001; Cullen *et al.*, 2004; Adler e De La Peña Moctezuma, 2010). As membranas plasmática e externa delimitam o espaço periplasmático, onde se localizam os dois flagelos periplasmáticos que proporcionam o formato único de suas extremidades em gancho ou ponto de interrogação e a grande mobilidade característica deste gênero (Faine *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000; Picardeau, 2017).

Devido à distinta morfologia, são difíceis de visualizar por coloração de Gram, mas sabe-se que estas bactérias são Gram-negativas (Faine *et al.*, 1999). O método padrão para visualização das leptospiros é por microscopia de campo escuro ou microscopia eletrônica (Faine *et al.*, 1999; Adler e De La Peña Moctezuma, 2010).

Figura 1. Leptospiras no ambiente e no hospedeiro. (A) Morfologia das leptospiros. (B) Micrografia eletrônica de varredura de biofilme de *L. interrogans* na superfície de vidro. (C) Microscopia eletrônica de varredura de *L. interrogans* aderida a monocamada de células renais caninas Madin-Darby. (D) Leptospiras (estruturas filamentosas) no interior do lúmen do túbulo renal proximal de rato de esgoto (*Rattus norvegicus*)(Ko *et al.*, 2009).

A presença de LPS em *Leptospira* é um diferencial em relação a outras espiroquetas como *Borrelia burgdorferi* (causadora da doença de Lyme), *Treponema denticolla* (causadora da doença periodontal) e *Treponema palladium* (causadora de sífilis), sendo estas espiroquetas de grande importância para humanos (Que-Gewirth *et al.*, 2004; Haake e Matsunaga, 2010).

O LPS das leptospiros é imunologicamente similar ao de outras bactérias Gram-negativas, apesar de ter atividade endotóxica aproximadamente 12 vezes menor do que o de *Escherichia coli* (Faine *et al.*, 1999). Em geral, o lipídeo A, componente de LPS, contém apresenta metilações em seus dois grupos fosfatos, porém o LPS de *Leptospira* contém apenas uma metilação no fosfato (Que-Gewirth *et al.*, 2004).

Estas bactérias são quimiorganotróficas obrigatórias, que utilizam o oxigênio como aceptor final na cadeia transportadora de elétrons. Apesar de terem em seu genoma os genes que codificam as enzimas da via glicolítica, utilizam como principal fonte de energia ácidos graxos de cadeia longa (mais de 15 carbonos), metabolizados por meio da β -oxidação (Faine *et al.*, 1999).

Em laboratório, as leptospiros crescem a uma temperatura ótima de 28 a 30 °C (Levett, 2001), e são cultivadas em meio EMHJ líquido (Ellinghausen e Mccullough, 1965), que contém ácido oleico, albumina bovina e polisorbato. O crescimento é relativamente lento

tanto em meio de cultura sólido e líquido, tendo tempo de geração de 6 a 16 horas que varia de acordo com a espécie (Levett, 2001).

1.2 Classificação e taxonomia

O gênero *Leptospira* pertence à família *Leptospiraceae* e ordem *Spirochaetales*. Este gênero é composto por bactérias patogênicas, causadoras da leptospirose, e bactérias não patogênicas de vida livre (saprófitas). A família *Leptospiraceae* ainda conta com as bactérias do gênero *Leptonema*, que consistem em espiroquetas de vida livre e não patogênicas.

Além de *Leptospira*, a ordem *Spirochaetales* abrange outras espiroquetas muito importantes em termos patológicos, como os gêneros *Borrelia*, o gênero *Treponema* e o gênero *Serpulina*.

Figura 2. Classificação taxonômica de espiroquetas. Fonte: Modificado de Schroder et al., 2008.

Até o presente momento, 22 espécies de *Leptospira* foram identificadas, dentre elas 10 espécies patogênicas, capazes de infectar e provocar os sintomas da leptospirose (*L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. alexanderi*, *L. weilii*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. kmetyi*, *L. alstoni* e *L. mayottensis*), 5 espécies patogênicas intermediárias, que podem causar uma variedade de sintomas brandos (*L. inadai*, *L. fainei*, *L. broomii*, *L. licerasiae* e *L. wolffii*), e 7 espécies saprofíticas, de vida livre e não causam a leptospirose (*L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. wolbachii*, *L. idonii*, *L. vanthielii*, *L. terpstrae* e *L. yanagawae*) (Brenner et al., 1999; Bharti et al., 2003; Ko et al., 2009; Smythe et al., 2013; Bourhy et al., 2014).

Além da classificação taxonômica filogenética feita por hibridização de DNA, as leptospiros também são classificadas sorologicamente baseadas na variedade dos antígenos, principalmente dos lipopolissacarídeos (LPS) (Faine et al., 1999; Adler e De La Peña

Moctezuma, 2010). Como resultando desta identificação sorológica, são contabilizados mais de 250 sorovares, agrupados em 24 sorogrupos (Adler e De La Peña Moctezuma, 2010). Neste tipo de classificação, quando diferentes sorovares apresentam antígenos em comum, estes são agrupados em um mesmo sorogrupo.

As classificações de sorogrupos e sorovares funcionam como uma complementação da classificação genética (Bharti *et al.*, 2003), e tem grande importância para estudos de epidemiologia e distribuição geográfica das leptospirosas (Ko *et al.*, 2009).

1.3 A leptospirose

Leptospirose é uma doença infecciosa aguda que acomete várias espécies de mamíferos, incluindo humanos, causada por espécies patogênicas do gênero *Leptospira*. Foi descrita pela primeira vez em 1886 por Adolf Weil, na qual ficou inicialmente conhecida como doença de Weil (Levett, 2001). Os casos de leptospirose notificados mostram uma distribuição mundial da doença, ocorrendo tanto em áreas rurais quanto em áreas urbanas, com uma maior prevalência em regiões tropicais, mas também ocorre em regiões subtropicais e temperadas. Nos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento ocorrem os principais surtos de leptospirose, associada a condições precárias de higiene e saneamento. Já em países desenvolvidos, a leptospirose está associada a atividades recreativas, esportes aquáticos e exposição ocupacional (Morgan *et al.*, 2002; Pappas *et al.*, 2008; Desai *et al.*, 2009; Stern *et al.*, 2010).

Praticamente todo mamífero pode ser carreador destas bactérias. O homem é o hospedeiro acidental e terminal e pode se infectar por contato direto com urina de animais infectados ou indiretamente por meio de água e solo contaminados (Bharti *et al.*, 2003; Ko *et al.*, 2009). Nos centros urbanos, os roedores (*Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* e *Mus musculus*) desempenham o papel de principais reservatórios da doença, abrigando as leptospirosas nos rins e eliminando-as vivas no meio ambiente contaminando água, solo e alimentos (Faine *et al.*, 1999).

Uma vez no meio ambiente, as leptospirosas patogênicas podem entrar no organismo por meio de escoriações na pele ou tecidos mucosos, e rapidamente atingir a corrente sanguínea até colonizarem os órgãos alvo (Ko *et al.*, 2009; Adler e De La Peña Moctezuma, 2010).

A leptospirose possui um quadro de manifestações clínicas muito variado em humanos, dependendo do sorovar de *Leptospira*, idade e a situação de saúde e imune do paciente (Adler e De La Peña Moctezuma, 2010). A maioria dos casos de leptospirose

apresentam sintomas brandos como febre, calafrios, cefaleia, dores musculares, enjoo, vômitos e diarreia, que são sintomas comuns a outras doenças tropicais febris, que dificulta o diagnóstico preciso. Em regiões endêmicas onde a doença é comum, a infecção pode até ser assintomática (Bharti *et al.*, 2003).

Aproximadamente 15% dos casos evoluem para uma síndrome severa de infecção multissistêmica conhecida como síndrome de Weil, caracterizada por hemorragia, falência renal e hepática, meningite e miocardite. A taxa de mortalidade varia entre 4 a 50% dos pacientes que desenvolve esta síndrome (Levett, 2001; Bharti *et al.*, 2003; Forbes *et al.*, 2012). Outra manifestação clínica associada à leptospirose, ainda mais severa, é a síndrome pulmonar hemorrágica, descrita primeiramente na Coreia do Sul e China (Park *et al.*, 1989), e ganhou grande importância em 1995 após um grande surto desta manifestação clínica na Nicarágua (Trevejo *et al.*, 1998). A síndrome pulmonar hemorrágica é caracterizada por insuficiência respiratória aguda e hemorragia intensa nos pulmões, que acarreta uma taxa de mortalidade superior a 50% dos pacientes que desenvolvem estes sintomas e morte em até 72 horas após o aparecimento dos sintomas (Nicodemo *et al.*, 1997; Gouveia *et al.*, 2008; Evangelista e Coburn, 2010).

Figura 3. Ciclo da infecção por leptospirose. Os roedores são os principais reservatórios das leptospiras e não manifestam quaisquer sintomas da doença. Diversas espécies de mamíferos excretam pela urina as leptospiras patogênicas, contaminando o ambiente. As leptospiras infectam o homem, considerado hospedeiro acidental da doença, por meio de lesões e abrasões na pele, provocando diversos sintomas característicos da leptospirose. Adaptado de: Ko, Goarant e Picardeau (2009).

1.4 Leptospirose no Brasil

A leptospirose tem sido considerada uma doença reemergente (Cruz *et al.*, 2009; Sarkar *et al.*, 2012). É uma doença de notificação compulsória no Brasil desde 1985, com 60.317 casos confirmados no período recente de 2000 até 2015, e média anual de óbitos de 362,5, que representa aproximadamente 9,6% dos casos notificados neste período (Figura 4). Proporcionalmente, estes valores revelam um índice de mortalidade por leptospirose superior à média global anual de aproximadamente 5,72% (estimativa de 1,03 milhões de casos e 58.900 óbitos por ano) (Costa *et al.*, 2015). Este fato está diretamente relacionado com pluviosidade elevada que atinge maior parte do país durante todo o ano, acarretando em alagamentos nos centros urbanos, e os problemas de acúmulo de lixo em locais inadequados e escassez de saneamento nas regiões precárias, que favorecem a disseminação e a infecção pelo patógeno.

Figura 4. Casos confirmados e óbitos por leptospirose no Brasil de 2000 a 2015. *Dados obtidos em 15 de janeiro de 2016 sujeito a alterações. Fonte: Sinan/SVS/MS.

Apesar de bastante significativo, acredita-se que estes números sejam subestimados devido à dificuldade do diagnóstico preciso da leptospirose, muitas vezes confundindo com outras doenças, e até mesmo a falha na notificação pelos hospitais e postos de saúde aos órgãos competentes.

Estudos epidemiológicos mostram a *L. interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni como as principais causadoras de leptospirose humana no Brasil (Miraglia *et al.*, 2013). Este fato é importante para a Saúde Pública, já que

os sorovares Icterohaemorrhagiae, Copenhageni e Lai, estão associados à leptospirose severa (Adler e De La Peña Moctezuma, 2010).

1.5 Diagnóstico e tratamento da leptospirose

Devido aos sintomas da fase aguda da leptospirose serem semelhantes a outras doenças, o diagnóstico é dificultado e em muitos casos é impreciso, e, portanto, diversos ensaios clínicos podem ser necessários. As metodologias para diagnóstico desta doença podem ser feitas pela detecção direta, por meio do isolamento da bactéria e crescimento em meio de cultura, e indireta, por meio da detecção de anticorpos específicos por ensaios bioquímicos (Faine *et al.*, 1999; Schreier *et al.*, 2013).

O teste para diagnóstico da leptospirose recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é o teste de aglutinação microscópica (MAT), devido à sua importância para a epidemiologia da doença. Neste ensaio, o soro do paciente é incubado com suspensões de diferentes sorovares de leptospiros, a mistura é analisada usando um microscópio de campo escuro testando diferentes diluições de soro com os sorovares (Chirathaworn *et al.*, 2014), e o soro é considerado positivo quando é observada uma aglutinação das leptospiros igual ou superior a 50% quando comparado com o controle no qual não é usado soro (Picardeau, 2013).

Contudo, o MAT apresenta baixa sensibilidade principalmente na fase inicial da doença (Appassakij *et al.*, 1995; Brandão *et al.*, 1998; Limmathurotsakul *et al.*, 2012), uma vez que os anticorpos produzidos contra os antígenos da leptospiros podem ser detectados somente após um intervalo de 5-7 dias após a exposição ao patógeno (Palaniappan *et al.*, 2007). Além disso, o teste é demorado, necessita da manutenção de culturas vivas de diferentes espécies e sorovares e profissionais capacitados para a execução do diagnóstico, portanto é realizado somente em laboratórios de referência (Bharti *et al.*, 2003; Picardeau *et al.*, 2014).

Outra alternativa para o diagnóstico é o isolamento das bactérias a partir de amostras de sangue. A coleta deve ser feita o mais rápido possível, uma vez que as leptospiros são encontradas no sangue somente nos estágios iniciais da infecção, aproximadamente sete dias após os primeiros sintomas (Levett, 2001; Bharti *et al.*, 2003). Contudo, o crescimento das leptospiros em meio de cultura é demorado, fato que dificulta o diagnóstico precoce e possibilita uma evolução dos sintomas do paciente (Toyokawa *et al.*, 2011).

A evolução da biologia molecular e o surgimento de técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) e o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) possibilitaram o aprimoramento do diagnóstico, principalmente na rapidez do resultado.

Diagnósticos por PCR são descritos desde 1990, sendo uma técnica bem versátil uma vez que podem ser utilizados amostras de sangue, urina e fluido cerebroespinal (Levett, 2001; Brown *et al.*, 2003; Adler e De La Peña Moctezuma, 2010). Em geral, é feita amplificação do RNAr 16S e 23S (Hookey, 1992; Mérien *et al.*, 1992; Murgia *et al.*, 1997), ou de genes que codificam proteínas conservadas em diferentes espécies de leptospira patogênicas, como o gene *lipL32* e *ligA* (Jouglard *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006).

Muitos ensaios de ELISA consistem em detectar anticorpos IgM contra as leptospiros, que podem ser detectados na primeira semana após a infecção (Guerreiro *et al.*, 2001; Bharti *et al.*, 2003), e os antígenos usados podem ser de lisados bacterianos ou proteínas recombinantes de LipL32 (Chalayon *et al.*, 2011) e OmpL1 (Dong *et al.*, 2008), dentre outras proteínas descritas como de membrana externa.

Após o diagnóstico positivo para a leptospirose, o tratamento é baseado em antibióticos β -lactâmicos do grupo das penicilinas (Charan *et al.*, 2013) e as cefalosporinas (Panaphut *et al.*, 2003).

1.6 Mecanismos de patogenicidade e fatores de virulência da *Leptospira* spp.

Após a exposição das membranas mucosas ou da pele com lesões à água ou ao solo contaminado com leptospiros, os microrganismos rapidamente estabelecem uma infecção sistêmica atravessando barreiras teciduais (Cinco, 2010). O sucesso de um patógeno durante a infecção está associado com a capacidade de adesão, num primeiro contato entre patógeno-hospedeiro e colonização de órgãos ou tecidos alvo, a habilidade de invadir e disseminar no hospedeiro e a capacidade de evasão do sistema imune (Meri *et al.*, 2005)

Até o presente momento, o conhecimento sobre as bases moleculares e celulares da patogenicidade e fatores de virulência da leptospira ainda não foram totalmente elucidados, porém grandes avanços foram feitos após o sequenciamento de genomas de espécies de *Leptospira* e da evolução das diversas áreas que envolvem a biologia molecular. Assim como outras bactérias patogênicas, os candidatos a fatores de virulência da leptospira incluem o LPS (fator de virulência para bactérias Gram-negativas), proteínas de membrana externa (OMPs), hemolisinas e moléculas de adesão, importantes para a interação do patógeno com a

matriz extracelular e permite a colonização de tecidos do hospedeiro (Patti e Höök, 1994; Ljungh *et al.*, 1996).

Devido à singularidade do lipídeo A o reconhecimento das leptospiiras por meio de seu LPS pelo sistema imune murino é mediado pelos receptores TLR4 e TLR2, porém em células humanas esse reconhecimento ocorre apenas via TLR2 (Werts *et al.*, 2001; Nahori *et al.*, 2005). Deste modo, foi sugerido que o lipídeo A do LPS das leptospiiras não é reconhecido pelos receptores TLR4 em humanos, considerada a via clássica do reconhecimento de LPS. A falha de ativação desta rota pode resultar em uma ineficiência em gerar resposta imune adequada para a eliminação do patógeno, favorecendo a susceptibilidade ao mesmo.

Camundongos com TLRs intactos são resistentes à infecção, enquanto que os camundongos mutantes para TLR2 e TLR4 são altamente suscetíveis à leptospirose (Chassin *et al.*, 2009). Por outro lado, alguns roedores, como hamsters e porquinhos da índia, são suscetíveis à leptospirose, e, portanto, podem ser utilizados como modelos animais para leptospirose humana (Faine *et al.*, 1999). Baseado neste resultado, sugere-se que a capacidade do sistema imunológico inato de responder de forma eficiente ao LPS via TLR4 serve uma característica para definir um hospedeiro reservatório de leptospiiras patogênicas, o que corrobora com as suposições referentes à susceptibilidade dos humanos à leptospirose.

Diversos estudos encontrados na literatura mostram que as espécies patogênicas de leptospira possuem diversas OMPs que desempenham grande importância funcional durante a patogênese e na indução de resposta imune durante a infecção (Haake e Matsunaga, 2010; Pinne *et al.*, 2012). As OMPs são responsáveis por mediar a adesão inicial da leptospira às células do hospedeiro, aos componentes da matriz extracelular (MEC). A MEC é constituída por componentes como proteoglicanos, fibronectina, colágeno, laminina e elastina, e está presente em todos os tecidos e órgãos, e tem como funções a manutenção da integridade dos tecidos mediando a interação célula-célula e a transdução de sinais bioquímicos intracelulares e extracelulares (Frantz *et al.*, 2010).

Nosso grupo já demonstrou que a espécie patogênica *L. interrogans* é capaz de aderir por meio das OMPs a diferentes componentes da matriz extracelular (MEC) do hospedeiro (Barbosa *et al.*, 2006; Atzingen *et al.*, 2008; Mendes *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2011; Domingos *et al.*, 2012; Fernandes *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2013; Siqueira *et al.*, 2013; Fernandes *et al.*, 2014; Vieira *et al.*, 2014; Domingos *et al.*, 2015; Teixeira *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2018), sugerindo deste modo a importância desta etapa de interação inicial para o sucesso da bactéria.

Após a adesão, as leptospiros devem superar barreiras físicas impostas pelas células e tecidos até atingir a corrente sanguínea. Nosso grupo demonstrou pela primeira vez a habilidade da leptospira patogênica de capturar o plasminogênio (PLG) circulante por meio de suas OMPs e, na presença de ativadores do plasminogênio do próprio hospedeiro, ser convertido em plasmina (PLA), uma serino-protease de amplo espectro que confere à bactéria um revestimento proteolítico capaz de degradar laminina e fibronectina, e deste modo contribui para a invasão destes microrganismos (Vieira *et al.*, 2009; Vieira *et al.*, 2013; Fernandes *et al.*, 2016). Já foi demonstrado que a atividade proteolítica da leptospira proveniente da ligação à plasmina também é capaz de degradar a molécula C3b do sistema complemento, imunoglobulinas e fibrinogênio (Fg) (Vieira *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2013). Um outro mecanismo utilizado pela leptospira para invadir é por meio da captura do Fg circulante e como consequência ocorre a diminuição da formação de coágulos de fibrina, aumento de hemorragias e maior facilidade de disseminação da bactéria (Oliveira *et al.*, 2013; Fernandes *et al.*, 2016).

Outros trabalhos mostraram que estas bactérias também são resistentes a ativação do sistema complemento do hospedeiro por meio do recrutamento de reguladores ou sequestro de componentes deste sistema de defesa. Meri *et al.* (2005) demonstraram que as cepas patogênicas de leptospira conseguem se ligar ao fator H, que permanece ativo, e atua como cofator do fator I que cliva C3b, inativando-o. Já o C4BP (*C4 binding protein*) é um inibidor da via clássica e das lectinas do sistema complemento. Assim como o fator H, o C4BP ligado a leptospira por meio de proteínas de superfície, como a Lsa33 (Domingos *et al.*, 2012), Lsa30 (Souza *et al.*, 2012) e Lsa23 (Siqueira *et al.*, 2016), mantém sua atividade de cofator, neste caso atuando na clivagem de C4, e este mecanismo pode contribuir para a resistência ao soro pelas leptospiros patogênicas.

1.7 Vacinas contra leptospirose

A vacinação das populações em zonas endêmicas e de risco continua sendo a melhor estratégia para controlar os surtos de leptospirose. O uso de vacinas tem sido reportado desde 1920, e atualmente existem diversas vacinas contra leptospirose para uso humano e principalmente para uso veterinário (Adler, 2015; Xu e Ye, 2017).

As vacinas contra leptospirose são constituídas basicamente de bactérias atenuadas/inativadas (bacterinas) ou preparações de membrana de leptospiros patogênicos, e

induzem resposta protetora a partir da produção de anticorpos contra lipopolissacarídeos de leptospira (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001; Adler, 2015).

Apesar das vacinas veterinárias serem altamente difundidas, as vacinas humanas são raras. As literaturas disponíveis mostram que as vacinas contra leptospirose de uso humano podem ser mono ou polivalentes, ou seja, conter em sua preparação um ou vários sorovares de *Leptospira* (Tabela 1).

Tabela 1. Vacinas contra leptospirose disponibilizada para humanos.

País	Tipo de vacina	Sorogrupos/Sorovares	Referência
Cuba	Trivalente Bactéria inativada	sorogrupo Canicola sorovar Canicola; sorogrupo Icterohaemorrhagiae serovar Copenhageni; sorogrupo Pomona serovar Mozdok	(Martínez <i>et al.</i> , 2004)
França	Monovalente Bactéria inativada	sorogrupo Icterohaemorrhagiae	(Laurichesse <i>et al.</i> , 2007)
Japão	Polivalente Bactéria inativada	sorovares Australis, Autumnalis, Hebdomadis e Copenhageni.	(Koizumi e Watanabe, 2005)
China	Polivalente Bactéria inativada	sorovares Lai, Linhai, Autumnalis, Canicola, Pomona, Australis e Hebdomadis	(Xu <i>et al.</i> , 2005)
China	Bivalente Preparação de m. externa	sorogrupos Icterohaemorrhagiae e Hebdomadis	(Cheng <i>et al.</i> , 2001)

Fonte: adaptado de Xu e Ye (2017).

O emprego de preparações com bactérias inativadas, no entanto, acarretam alguns efeitos colaterais como febre, náusea e dor no local da aplicação (Bharti *et al.*, 2003). A resposta imune produzida é praticamente toda direcionada contra o LPS, uma vez que é o componente majoritário da membrana externa, portanto não promovem proteção heteróloga contra os sorovares de leptospiros não incluídas na preparação vacinal, uma vez que o LPS é o determinante para mais de 250 sorovares, e não induzem memória imunológica, sendo necessária a revacinação a cada 6-12 meses dependendo da preparação vacinal (Bharti *et al.*, 2003; Haake e Matsunaga, 2010; Xu e Ye, 2017).

A leptospira é um microrganismo principalmente extracelular. Deste modo, a proteção contra este patógeno é dependente do sistema imune humoral, onde ocorre produção de anticorpos e da ativação da via clássica do sistema complemento (Rodriguez-Gonzalez *et al.*, 2004; Ko *et al.*, 2009). De fato, anticorpos monoclonais contra o LPS de leptospira, produzido em camundongos, conferiram proteção passiva em porquinhos da Índia contra a infecção (Jost *et al.*, 1986), contudo somente contra o sorovar específico.

A resposta imune celular somada à resposta humoral já foi descrita como essencial à proteção em bovinos, garantindo até mesmo proteção contra colonização renal pelas leptospiros (Naiman *et al.*, 2002). Em humanos, células mononucleares de sangue periférico provenientes de indivíduos saudáveis que tiveram leptospirose responderam significativamente à exposição de *Leptospira* patogênicas *in vitro*, induzindo a expansão de linfócitos T $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ (Tuero *et al.*, 2010), contudo não foi observada a produção de linfócitos T de memória. Neste contexto, uma vacina eficaz contra a leptospirose deve ser capaz de induzir tanto a resposta humoral quanto a resposta celular.

Vacinas recombinantes são uma alternativa atrativa para superar as limitações das vacinas convencionais e assim garantir a proteção duradoura contra o maior número de sorovares de leptospiros (Dellagostin *et al.*, 2011). A primeira vacina recombinante reportada foi baseada na porina OmpL1 e na lipoproteína LipL41, que em efeito sinérgico induziram proteção em hamsters contra a *L. kirshneri* sorovar Grippotyphosa (Haake *et al.*, 1999), e desde então diversas elaborações vacinais foram desenvolvidas variando-se as proteínas e lipoproteínas bem como o adjuvante vacinal (Cullen *et al.*, 2003; Faisal *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 2011; Atzingen *et al.*, 2012; Fernandes *et al.*, 2017).

1.8 Genômica funcional de *Leptospira*

Devido à problemática com as elaborações vacinais disponíveis atualmente para a leptospirose, os esforços estão direcionados para a identificação de novos candidatos vacinais, que possuam as características de promover resposta imunológica protetora eficaz e duradoura contra o maior número de sorovares patogênicos, com o mínimo de efeitos colaterais.

O advento da tecnologia de sequenciamento de DNA colaborou para que vários organismos tivessem seus genomas sequenciados e o desenvolvimento de novas ferramentas de bioinformática para a análise desses dados. Além disso, essas novas tecnologias permitiram uma nova abordagem para o desenvolvimento de vacinas, denominada vacinologia reversa por Rino Rappuoli no início da década de 1990 (Rappuoli, 2000; 2001).

Diferentemente da vacinologia tradicional, a proposta da vacinologia reversa é buscar candidatos vacinais direto do genoma sequenciado do patógeno. Esta metodologia inicia-se a partir do genoma sequenciado do patógeno de interesse, e então é feito um levantamento dos melhores candidatos vacinais por meio de predições de localização *in silico* seguido pela expressão e purificação da proteína recombinante. Por fim, são realizados ensaios para a

caracterização funcional desta proteína e desafio vacinal usando animais como modelos experimentais (Rappuoli, 2000; 2001; Donati e Rappuoli, 2013; Dellagostin *et al.*, 2017).

Devido à dificuldade de avaliar todas as proteínas codificadas no genoma do patógeno de interesse, a vacinologia reversa permite uma avaliação de possíveis candidatos vacinais, que compartilham principalmente a característica de serem expostas na superfície do microrganismo com intuito de serem reconhecidas pelo sistema imune do hospedeiro.

Os avanços nas técnicas de sequenciamento de DNA também possibilitaram inicialmente o sequenciamento de dois genomas de leptospira em 2003 e 2004, dos microrganismos *L. interrogans* sorogrupos Icterohaemorrhagiae sorovar Lai (Ren *et al.*, 2003) e Copenhageni (Nascimento, Verjovski-Almeida, *et al.*, 2004), respectivamente, e mais recentemente outras leptospiros tiveram seus genomas sequenciados e analisados (Bulach *et al.*, 2006; Picardeau *et al.*, 2008; Chou *et al.*, 2012; Ricaldi *et al.*, 2012).

O sequenciamento do genoma da *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni, cepa patogênica prevalente no Brasil, possibilitou a identificação de mais de 200 proteínas e lipoproteínas de membrana externa (Nascimento, Ko, *et al.*, 2004). Desde então, nosso grupo vem tentando identificar novos antígenos vacinais utilizando a abordagem por vacinologia reversa para a caracterização funcional dessas proteínas, em sua maioria de funções desconhecidas, e elaborações vacinais baseados nestes antígenos que sejam eficazes contra a leptospirose.

Neste contexto, foram selecionados dois genes de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, designados como LIC11711 e LIC12587, com intuito de elucidar o papel funcional destas proteínas, anotadas como hipotéticas, de função desconhecida. Caracterizar estas proteínas e avaliar a participação das mesmas no processo infeccioso e, deste modo, auxiliar no entendimento dos mecanismos de patogênese e virulência deste microrganismo e direcionar a avaliação de alvos vacinais para uma quantidade menor de proteínas.

2 OBJETIVO

O presente projeto teve como objetivo a clonagem dos genes LIC11711 e LIC12587 que codificam prováveis lipoproteínas sem funções conhecidas, identificados no genoma sequenciado da *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni, expressão das respectivas proteínas recombinantes e a caracterização funcional das mesmas no contexto da patogênese e avaliação do potencial como antígenos vacinais e kit diagnóstico.

2.1 Objetivos específicos

Estudar a presença dos genes LIC11711 e LIC12587 em diferentes espécies e sorovares de *Leptospira*, bem como as proteínas codificadas por estes genes.

Expressar as proteínas recombinantes em *Escherichia coli* e purificá-las por cromatografia de afinidade.

Avaliar a reatividade das proteínas recombinantes frente a soros de pacientes diagnosticados com leptospirose e soros de pacientes diagnosticados com outras doenças não relacionadas.

Avaliar a interação das proteínas recombinantes com componentes da matriz extracelular, soro e sistema complemento do hospedeiro, bem como caracterizar a natureza e afinidade destas interações.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cepas de bactérias e soros utilizados

No presente estudo foi utilizado cepa patogênica virulenta *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130, as cepas patogênicas atenuadas em cultura *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20, *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagie cepa RGA, *L. interrogans* sorovar Canicola cepa Hound Utrecht IV, *L. interrogans* sorovar Pomona cepa Pomona, *L. borgpetersenii* sorovar Whitticombi cepa Whitticombi, *L. kirschneri* sorovar Cynopteri cepa 3522C, *L. kirschneri* sorovar Grippotyphosa cepa Moskva V e *L. santarosai* sorovar Shermani cepa 1342 K, e a cepa não patogênica *L. biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc1.

As bactérias foram cultivadas a 28 °C sob condições aeróbicas em meio EMJH líquido (Difco®, Franklin Lakes, NJ, EUA) (Ellinghausen e Mccullough, 1965) modificado com 10% (v/v) de soro de coelho, enriquecido com L-asparagina (m/v: 0,001%), cloreto de magnésio (m/v: 0,001%), peptona (m/v: 0,03%) e extrato de carne (m/v: 0,001%).

As culturas de *Leptospira spp.* são rotineiramente mantidas na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, São Paulo, Brasil. As leptospirosas se duplicam em aproximadamente 16 horas e seu crescimento é lento no isolamento primário, de modo que as culturas são mantidas por até cerca de 13 semanas antes de serem descartadas (Levett, 2001). As leptospirosas de subcultura são cultivadas em média por 14 dias, e em seguida são novamente subcultivadas.

As bactérias *Escherichia coli* DH5α, utilizadas nas etapas de clonagem, e as linhagens *E. coli* BL21 (DE3) Star pLysS e *E. coli* BL21 (DE3) SI (ThermoFisher), usadas para ensaios de expressão, foram obtidas pela Invitrogen Corporation (Carlsbad, EUA)

Neste trabalho foram utilizados soros pareados de 20 pacientes diagnosticados com leptospirose e soros de pacientes diagnosticados com dengue, malária, doença de Chagas ou HIV. Estes soros fazem parte de uma soroteca e foram cedidas pela Dra. Eliete C. Romero, do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil.

3.2 Análise por bioinformática

Os genes selecionados LIC11711 e LIC12587 foram submetidos a análises *in silico* para predição de conformação, domínios, localização e características gerais importantes para a clonagem.

Os programas CELLO (Yu *et al.*, 2006) (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) e PSORTb (<http://www.psort.org/psortb/>) foram utilizados para a predição da localização das proteínas nativas, codificadas pelos genes, na *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Os programas SignalP (Petersen *et al.*, 2011) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e LipoP (Juncker *et al.*, 2003) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>) também foram empregados para predizer a localização das proteínas pela análise do peptídeo sinal. O software PSIPRED (Jones, 1999) (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) foi usado para predição das estruturas secundárias das proteínas alvo, o programa GeneRunner para desenho dos oligonucleotídeos e WebCutter (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>) para análise de sequências para enzimas de restrição. O software ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) (Gasteiger *et al.*, 2005) foi empregado para cálculo teórico dos valores de massa molecular e ponto isoelétrico das proteínas recombinantes.

3.3 Amplificação por PCR dos genes

As sequências dos genes LIC11711 e LIC12587 foram obtidas por meio da amplificação por PCR (*polymerase chain reaction*) a partir do DNA genômico da *L. interrogans* sorovar Copenhageni, previamente extraído e purificado. A reação de PCR foi realizada utilizando-se PCR buffer; 0,2 mM dNTP; 2 mM MgCl₂; 0,2 mM de cada oligonucleotídeo (*forward* e *reverse*); 2,5 U Taq polimerase; 100 ng de DNA, para um volume final de 50µL. As temperaturas de anelamento utilizadas foram determinadas de acordo com o programa Generunner®.

Os oligonucleotídeos foram desenhados de forma a amplificar os genes sem a sequência do peptídeo sinal, além da adição de sítios de restrição às extremidades 5', conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos para a amplificação dos genes de *L. interrogans* sorovar Copenhageni.

Gene	Oligonucleotídeos	TA	Amplicon
LIC11711	F: 5' <u>GGATCCT</u> GTGTTTACTACAAAAAGTACAGATAACG-3' R: 5' <i>GGTACCT</i> TATTTTCTGCGAATCACTTC-3'	60°C	579 pb
LIC12587	F: 5' <u>GGATCCT</u> GTACTAGCAGTCAGAAAACAGTGG-3' R: 5' <i>GGTACCT</i> TATCTTGGAAGAACCTGAGAAAG-3'	65°C	606 pb

Obs: Abreviaturas (em inglês): F, “forward”; R, “reverse”; TA, temperatura de anelamento utilizada; pb, pares de base. A sequência que corresponde ao sítio de restrição BamHI está sublinhada e a sequência que corresponde ao sítio de restrição KpnI está em itálico.

O resultado da amplificação foi visualizado após eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE (40 mM Tris-acetato e 1mM EDTA) corado com GelRed™ (Biotium, Inc). Após a confirmação dos amplicons nos tamanhos esperados, as bandas foram excisadas do gel e purificados utilizando-se o kit “GFxPCR DNA and gel band purification” (GE Healthcare), sendo os produtos obtidos quantificados em espectrofotômetro.

3.4 Clonagem dos genes

3.4.1 Clonagem no vetor pGEM-T Easy

Os insertos purificados foram clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega), e a reação de ligação foi realizada seguindo o protocolo estabelecido pela fabricante.

O vetor pGEM-T Easy é linearizado com uma única timidina 3'-terminal em ambas as extremidades (Figura 5). As saliências em T no local de inserção melhoram a eficiência da ligação dos produtos de PCR, uma vez que algumas DNA polimerases adicionam uma adenina nas extremidades 5' desses amplicons, além de impedir a recircularização do vetor.

Figura 5. Mapa do plasmídeo P-GEM T Easy. Amp^r: gene de resistência à ampicilina; lacZ: gene que codifica a enzima β-galactosidase; ori: origem de replicação.

Bactérias competentes *E. coli* DH5α foram transformadas por choque térmico com os produtos desta ligação. Nesta transformação, a cepa foi incubada em banho de gelo a 0 °C por 30 minutos com o plasmídeo, seguido pelo choque térmico a 42 °C por 90 segundos. A cepa foi retornada ao banho de gelo por 5 minutos e adicionaram-se 350 µL de meio Luria-Bertani (LB) e incubação a 37 °C por 1 hora.

Após este período, o inóculo foi plaqueado em meio de cultura LB contendo 100 µg/mL de ampicilina, 50 mg/mL de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo) e 100 mM de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo), e incubado por 16h. As colônias positivas foram escolhidas por seleção azul/branco, inoculadas em 3 mL de meio LB líquido com ampicilina (LB-Amp) a 37 °C por 16 h.

Para a obtenção do DNA plasmidial foi utilizando o kit “illustra plasmidPrep Mini Spin” (GE Healthcare). Foi feita eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação da presença dos insertos, após a restrição enzimática usando as enzimas de restrição BamHI e KpnI.

3.4.2 Subclonagem no vetor pAE

Os insertos dos genes LIC11711 e LIC12587 foram liberados do vetor pGEM-T Easy após digestão enzimática com as respectivas enzimas de restrição. O vetor de expressão pAE (Ramos *et al.*, 2004) também foi digerido com as mesmas enzimas de restrição, com a finalidade de ambos apresentarem extremidades coesivas que possam hibridar.

O vetor pAE (Figura 6) foi escolhido como vetor de expressão devido ao seu tamanho reduzido (2,8 kb) e a elevada proporção entre cópias do vetor/ célula (200-250 cópias) que

facilitam o sequenciamento, e um alto nível de expressão de proteínas recombinantes controlado pelo promotor do fago T7, que transcreve o RNA (e consequentemente a produção da proteína recombinante) somente na presença da T7 RNA polimerase. Além disso, este plasmídeo foi desenvolvido para expressar a proteína recombinante contendo seis resíduos de histidina na porção N-terminal, importantes no processo de purificação (Ramos *et al.*, 2004).

Figura 6. Mapa do vetor de expressão pAE. PT7: promotor. (His)6x: sequência codificadora para seis resíduos de histidina. RBS: sítio de ligação ao ribossomo. ATG: códon de início da transcrição. Term: região de terminação de transcrição (T7). F1ori: origem de replicação. AmpR: gene de resistência à ampicilina.

Após a digestão, as amostras dos insertos e do vetor foram visualizadas por eletroforese em gel de agarose 1% e então as bandas de interesse foram purificadas utilizando-se o kit “GFX PCR DNA Gel Band Purification” (GE Healthcare).

A ligação dos insertos ao vetor foi realizada em uma reação contendo inserto:vetor em uma proporção de 5:1. Incubaram-se o inserto e vetor por 10 minutos a uma temperatura de 65 °C seguido de incubação em banho de gelo por 5 minutos, seguido pela adição da enzima T4 DNA ligase (Amersham Pharmacia Biotech, Inc) e incubou-se por 2 horas a 37°C.

Bactérias competentes *E. coli* DH5α foram transformadas com os produtos de ligação, plaqueadas em LB-Amp e incubadas a 37 °C por 16 h. Para a confirmação da transformação, algumas colônias foram selecionadas então inoculadas em 5 mL de meio de cultura e incubadas a 37 °C, sob agitação, por 16 h. Em seguida, 300 µL de cada inóculo foram centrifugados a 11.300 x g, por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi

ressuspendido em 50 μ L de água deionizada. Adicionaram-se 20 μ L de tampão de carregamento 10X (0.19% azul de bromofenol, 0.425 xileno cianol e 50% glicerol) e 28 μ L de solução fenol-clorofórmio (proporção 1:1). Após a homogeneização com o auxílio do *agitador*, as amostras foram centrifugadas a 11.300 x g por 3 minutos, e a fase superior contendo o plasmídeo foi analisada por eletroforese de gel de agarose 1%.

Os DNAs plasmidiais presumivelmente positivos para a presença do inserto foram recuperados usando o kit *illustra plasmidPrep Mini Spin* (GE Healthcare) e analisados eletroforese em gel de agarose 1% após a restrição enzimática usando as enzimas de restrição BamHI e KpnI, com a finalidade de verificar a presença do inserto.

3.5 Sequenciamento dos clones

Os clones positivos para o teste de fenol-clorofórmio e restrição enzimática foram sequenciados pelo método de terminação da cadeia (Sanger *et al.*, 1977) utilizando o sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems, Foster city, CA), a partir dos oligonucleotídeos T7 e pAER (abaixo).

T7 *forward*: 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'
pAE R *reverse*: 5' CAGCAGCCAACTCAGTTCCT 3'

A reação de amplificação foi realizada de acordo com as recomendações da fabricante, empregando 500 ng de DNA molde, 3,2 pmoles de oligonucleotídeos e 2 μ L do tampão BigDye® (PE Applied Biosystems) que contém ddNTPs marcados com fluoróforos, dNTPs e Taq DNA polimerase, em volume final de 20 μ L. Os cromatogramas obtidos foram analisados com auxílio software ChromasPro (<http://www.mb.mahidol.ac.th/pub/chromas/chromas.htm>) e do servidor público BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul *et al.*, 1990).

O sequenciamento dos plasmídeos teve o intuito de verificar se o inserto foi ligado de forma correta para a expressão da proteína recombinante e se houve qualquer tipo de mutação no DNA.

3.6 Estudo de indução das proteínas recombinantes

Duas cepas de *E. coli* foram empregadas para ensaios de expressão: a cepa BL21 DE3 Star pLysS, a qual possui um plasmídeo pLysS que expressa a lisozima T7, um inibidor da T7 RNA polimerase que impede o escape de expressão em células não induzidas, e a cepa BL21 SI (Salt Induced), que possui o gene da T7 RNA polimerase integrado ao genoma sob controle do promotor proU indutível por NaCl (Bhandari e Gowrishankar, 1997).

Bactérias competentes *E. coli* DE3 Star pLysS foram transformadas por choque térmico com o plasmídeo pAE recombinante da LIC11711 ou LIC12587, e cultivadas em meio de cultura LB contendo os antibióticos ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL) à temperatura de 37 °C sob agitação por aproximadamente 16h. Já as bactérias competentes *E. coli* BL21 SI foram transformadas com os plasmídeos recombinantes e cultivadas em meio 2YT/ON (1% extrato de levedura; 1,6% triptona; sem adição de NaCl) contendo 100 µg/mL de ampicilina e incubadas nas mesmas condições.

Após este período, a cultura saturada de *E. coli* DE3 Star pLysS foi diluída em novo meio LB (1:20) e foi monitorado o crescimento bacteriano por meio de absorbância 600 nm até atingir DO de 0,6. Em seguida foi feita a indução da expressão das proteínas recombinantes adicionando ao meio o IPTG em diferentes concentrações (0,01 mM, 0,1 mM e 1,0 mM) durante 3 horas a 37 °C, sob agitação. A cultura saturada de *E. coli* BL21 SI foi diluída em meio 2YT/ON, monitorando o crescimento bacteriano pela turbidez do meio nas mesmas condições anteriores. A indução da expressão das recombinantes foi feita adicionando diferentes concentrações de NaCl (3 mM, 30 mM, 300 mM) durante 3 horas a 37 °C, sob agitação.

As culturas induzidas foram posteriormente centrifugadas (3.075 x g; 15 minutos; 4 °C) e o sobrenadante foi descartado. Os sedimentos foram ressuspensos em tampão de lise (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 200 mM NaCl; 200 µg/mL lisozima; 2 mM PMSF; 1% Triton X-100) e sonificados para o rompimento celular e liberação das proteínas recombinantes. Após a lise celular, as amostras foram novamente centrifugadas e separou-se o sobrenadante do sedimento. O sedimento foi tratado com solução de ureia 8 M para a desnaturação, seguido pela renaturação das proteínas, no caso da formação de corpúsculos de inclusão durante a expressão das recombinantes.

Alíquotas das proteínas recombinantes (fração solúvel e insolúvel variando as concentrações do indutor) foram analisadas após eletroforese de poliacrilamida 15% após o

tratamento com SDS (sulfato dodecil de sódio) -SDS-PAGE- e tratamento com azul de Coomassie.

3.7 Expressão e purificação das proteínas recombinantes

Após a análise inicial da indução, a expressão das proteínas recombinantes rLIC11711 e rLIC12587 foi feita em uma maior escala utilizando-se a fração solúvel da cultura da cepa *E. coli* DE3 Star pLysS induzida para posterior purificação.

Neste aumento de escala, a cultura saturada foi diluída 20 vezes para o volume final de 400 mL de meio LB (100 µg/mL ampicilina e 34 µg/mL cloranfenicol) e 0,01 mM de IPTG para a indução da expressão das recombinantes, por 3 horas a 37 °C, sob agitação.

Em seguida, as culturas induzidas foram centrifugadas (3.075 x g; 15 minutos; 4 °C) descartando-se o sobrenadante. Os sedimentos foram ressuspensos em tampão de lise e sonificados para o rompimento celular e liberação das proteínas recombinantes. O lisado foi centrifugado e o sobrenadante foi coletado e armazenado até a posterior purificação.

A purificação das proteínas recombinantes rLIC11711 e rLIC12587 ocorreu por cromatografia de afinidade ao metal. A coluna de cromatografia foi preenchida com a resina Chelating Sepharose (GE Healthcare) carregada com íons Ni^{2+} , e previamente equilibrada com o tampão contendo 20 mM Tris-HCl pH 8,0 e 200 mM NaCl. Após a passagem do sobrenadante, foram feitas sucessivas lavagens com este tampão e concentrações crescentes de imidazol (5 mM, 20 mM, 40 mM e 60 mM) para a remoção de impurezas que possam ter se aderido à coluna. Finalmente a proteína recombinante foi eluída com solução de 1 M de imidazol e coletadas em microtubos de 1,5 mL.

As frações de todas as etapas da cromatografia foram analisadas por SDS-PAGE e western blotting. Para o western blotting, alíquotas das etapas de purificação foram transferidas para membrana de nitrocelulose, seguido pelo bloqueio da membrana com PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T) suplementado com 10% de leite em pó desnatado (PBS-T/leite). Após sucessivas lavagens, adicionou-se solução de anticorpo IgG monoclonal anti-polihistidina (1:10000, Sigma) em PBS-T/leite. Para a detecção, foram utilizados o substrato SuperSignal West Dura (Thermo Scientific) e o fotodocumentador ImageQuant modelo LAS 400 (GE Healthcare), empregando os parâmetros de quimioluminescência e detecção tipo *increment* com intervalos de 10 segundos.

As alíquotas que continham a proteína recombinante foram dialisadas com PBS 0,1%, efetuando três trocas do tampão, para a total remoção do imidazol.

3.8 Espectroscopia de dicroísmo circular

Para a realização da técnica, as proteínas recombinantes foram previamente dialisadas com tampão sódio-fosfato (Na_2HPO_4 0,5 M; NaH_2PO_4 1M) à 4 °C, efetuando três trocas deste tampão.

As espectroscopias circulares foram medidas usando uma cubeta de 1 mm de caminho ótico em intervalos de 0,5 nm/s e captadas em um espectropolarímetro de modelo Jasco J-810 (Japan Spectroscopic, Japão), associado a uma unidade Peltier para controle digital da temperatura.

Os espectros expressos em termos de elipticidade molar residual foram submetidos a uma análise no programa CAPITO (<http://capito.nmr.leibniz-fli.de/>) (Wiedemann *et al.*, 2013), que calcula as porcentagens das estruturas secundárias da proteína a partir dos dados experimentais de elipticidade obtidos.

3.9 Preparação de extrato de *E. coli*

Foi utilizada para a preparação do extrato a cepa BL21 (DE3) Star pLysS, a mesma cepa utilizada para a produção das proteínas recombinantes. A cepa selvagem foi inoculada em 300 mL de meio LB contendo 34 µg/mL de cloranfenicol e mantida a 37 °C por 16 h sob agitação constante para promover o crescimento celular. O volume total foi centrifugado a $3.075 \times g$ por 10 min a 4 °C, e o sedimentado foi ressuscitado em 30 mL de tampão de lise (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 200 mM NaCl; 200 µg/mL lisozima; 2 mM PMSF; 1% Triton X-100) e lisado por sonicação, em banho de gelo.

O extrato bacteriano foi usado nos ensaios nos quais foi necessário neutralizar os anticorpos contra proteínas de *E. coli*.

3.10 Avaliação da imunogenicidade das proteínas recombinantes

Camundongos BALB/c fêmeas (18-22 g) foram separados em grupos de cinco animais e imunizados com 10 µg de cada proteína recombinante ou PBS (controle negativo) com 12,5% de Alhydrogel [2% $\text{Al}(\text{OH})_3$; Brenntag Biosector, Dinamarca], usado como adjuvante vacinal. As imunizações foram administradas no dorso via subcutâneo nos respectivos grupos. Outras duas imunizações de reforço foram realizadas com intervalos de 15 dias entre cada imunização.

Os animais foram sangrados a cada 15 dias após as imunizações via plexo retro-orbital; o sangue coletado foi incubado a 4° C por 30 minutos e centrifugado a 2000 x g por 5 minutos, e a fração do soro foi coletada e armazenada a -20 °C.

Os soros obtidos foram avaliados por ELISA para a determinação do título dos anticorpos contra as proteínas recombinantes. A concentração das proteínas recombinantes foi ajustada para 0,5 µg/µL em tampão carbonato 0,05 M pH 9,6 e adicionou-se 50 µL da solução por poço em placa de 96 poços (Costar® High binding, Corning Incorporated, EUA). As proteínas foram incubadas a 4 °C por 16 horas. Após a incubação, as placas foram lavadas com PBS-T. Os poços foram tratados com 200 µL da solução de bloqueio PBS-T/leite durante 2 horas a 37 °C. Foram feitas diluições seriadas iniciando em 1:100 até 1:2048000 dos soros anti-proteína recombinante produzidos em camundongos em solução de bloqueio acrescida de extrato de *E. coli* (10% v/v). Incubaram-se estes soros por 1 hora para a adsorção de quaisquer anticorpos contaminantes produzidos contra proteínas de *E. coli* que poderiam estar contidos nas alíquotas de proteína recombinante (Gruber e Zingales, 1995). Para cada antígeno foi feito um “branco”, onde não houve incubação com os antissoros, para que o sinal inespecífico do anticorpo secundário fosse descontado de cada reação.

Adicionou-se em seguida 50 µL das amostras por poço onde as proteínas recombinantes foram imobilizadas e foi feita a incubação por 1 hora a 37 °C. A placa foi lavada e incubada com 50 µL por poço de solução de PBS-T 10% leite desnatado contendo anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:5000 v/v, Sigma).

A reação enzimática foi revelada pela adição de 100 µL de uma solução contendo 1 mg/mL de OPD (δ -fenilenodiamina diidrocloreto, Sigma) diluído em tampão citrato-fosfato pH5,0 contendo 1 µg/mL de peróxido de hidrogênio. Após 10 minutos, a reação foi interrompida adicionando-se 50 µL de solução H₂SO₄ 4 N. A reação foi analisada mensurando a absorbância no comprimento de onda de 492 nm.

O título individual foi determinado como sendo o inverso da maior diluição do soro com valor de densidade óptica (DO) maior que 0,1.

3.11 Avaliação do estado oligomérico das proteínas expressas

As proteínas recombinantes foram avaliadas quanto a suas conformações obtidas após a purificação, no caso, a determinação de estruturas quaternárias como dímero, trímero ou oligômero.

Para tanto, duas alíquotas de mesmo volume de cada proteína recombinante foram submetidas a tratamentos distintos; em uma alíquota, a amostra foi misturada com tampão de corrida contendo SDS e β -mercaptoetanol e foi tratada termicamente a 96 °C por 5 minutos, enquanto que a outra amostra foi misturada com tampão de corrida sem β -mercaptoetanol e não sofreu tratamento térmico. As proteínas contidas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida de 15%, e eletrotransferidos para membrana de nitrocelulose, na qual houve incubação com anticorpo monoclonal anti-poli-histidina conjugado com peroxidase produzido em camundongo (1:10000) (Sigma-Aldrich).

Num segundo experimento, a incubação foi realizada com antissoro contra as respectivas proteínas recombinantes (1:6000 para rLIC11711 e 1:3000 para rLIC12587), seguido pela incubação com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:5000). A detecção foi realizada conforme o item 3.7.

3.11 Cromatografia de exclusão molecular

Para verificar os estados oligoméricos das proteínas recombinantes foi feita a separação por cromatografia de exclusão molecular (ou cromatografia de gel filtração). Previamente, as proteínas recombinantes foram expressas e purificadas em *E. coli* Star pLysS com 0,01 mM de IPTG para a indução da expressão das recombinantes a 37 °C e sob agitação após atingir D.O. de 0,6 no comprimento de onda de 600 nm. As culturas induzidas foram centrifugadas (3.075 x g; 15 minutos; 4 °C) descartando-se o sobrenadante. Os sedimentos foram ressuspensos em 80 mL de Buffer A (20 mM Tris pH 7,8, 150 mM NaCl e 5% glicerol) (Sigma-Aldrich) sonificados para o rompimento celular e liberação das proteínas recombinantes. O lisado foi centrifugado (3.075 x g; 15 minutos; 4 °C) e o sobrenadante foi coletado.

As proteínas recombinantes foram previamente purificadas por cromatografia de afinidade conforme descrito no item 3.7. As alíquotas contendo as proteínas recombinantes foram misturadas e concentradas até o volume final de 3 mL, e em seguida a mistura foi injetada na coluna HiLoad® 16/600 Superdex® 200 pg (Sigma-Aldrich) previamente equilibrada com o buffer A, e acoplado ao AKTA Prime Plus (GE Healthcare) para a separação por exclusão molecular.

Após a cromatografia, as alíquotas referentes aos picos referentes às prováveis conformações quaternárias das proteínas recombinantes foram coletadas e avaliadas por SDS-PAGE para identificação da massa molecular das proteínas contidas.

3.12 Detecção de anticorpos em soros pacientes diagnosticados com leptospirose e outras doenças não relacionadas

O intuito deste ensaio foi verificar se as proteínas recombinantes purificadas podem ser utilizadas como uma sonda para detectar anticorpos em soros de pacientes diagnosticados com leptospirose e a especificidade desta interação usando soros de pacientes diagnosticados com outras doenças, a saber: dengue, doença de Chagas, malária e HIV.

Para tanto, 500 ng de proteína recombinante foram adicionados em poços de placas de ELISA e incubadas a 4 °C por 16 horas. Foram realizadas lavagens com PBS-T e bloqueio com PBS-T suplementado com 10% leite em pó desnatado, e incubados a 37 °C por 2 horas. Aplicaram-se amostras dos soros dos pacientes na diluição de 1:100 em PBS-T com 10% de leite, sendo então incubados por 1 hora. A reatividade foi avaliada usando-se anticorpo anti-IgG humano conjugado com peroxidase (1:5000, Sigma). A detecção da reação foi feita adicionando 100 µL/poço de solução contendo o substrato OPD diluído em tampão fosfato-citrato pH 5,0 contendo 1 µL/mL de peróxido de hidrogênio e leitura da absorbância no comprimento de onda de 492 nm.

As amostras de soros utilizadas foram tratadas previamente com extrato de *E. coli* com intuito de evitar reatividade com anticorpos anti-*E. coli* como possíveis interferentes presentes nos soros dos pacientes (Gruber e Zingales, 1995).

O *cut-off* foi calculado com base na média das absorbâncias obtidas para 12 soros de indivíduos saudáveis mais três vezes o desvio padrão entre as mesmas amostras. As amostras que obtiveram resultados superiores ao *cut-off* foram consideradas positivas para este experimento.

3.13 Avaliação da conservação das proteínas em diferentes cepas de *Leptospira* por western blotting

As cepas de *Leptospira*, mencionadas no item 3.1, foram utilizadas para este ensaio. As células foram coletadas do meio de cultura EMJH líquido após centrifugação a 3.075 x g por 15 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento bacteriano foi ressuspensionado em 1 mL de PBS. Foi feita uma padronização da quantidade de células por amostra após mensuração por absorbância a 420 nm.

Para o preparo dos extratos celulares, as amostras foram novamente centrifugadas e ressuspendidas para obter volume final de 100 μ L adicionando tampão SDS e β -mercaptoetanol seguido por aquecimento a 96 °C por 5 minutos.

As proteínas contidas nos extratos foram separadas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida de 15%, e eletrotransferidos para membrana de nitrocelulose, na qual houve incubação com os antissoros anti-proteína recombinante (diluição 1:200) e anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:5000) (Sigma-Aldrich). A detecção foi realizada conforme descrito no item 3.7.

3.14 Ensaios de localização das proteínas nativas em *L. interrogans*

3.14.1 Localização em leptospiros intactas por ELISA

As bactérias *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20 ou *L. biflexa* sorovar Patoc foram imobilizadas em microplacas (10^7 bactérias/poço) e incubadas à temperatura ambiente por 16 horas. Lavou-se três vezes com PBS na concentração final de 50 mM de NaCl, seguido pelo bloqueio com solução de PBS com 1% BSA (m/v) por 2 horas a 28 °C. Para a detecção das proteínas na bactéria, foi feita incubação com os antissoros homólogos produzidos em camundongos BALB/c contra rLIC11711, rLIC12587 ou LipL31 (Haake e Matsunaga, 2002), utilizando a diluição na qual a densidade óptica foi igual a 1 quando testou-se estes antissoros contra as respectivas proteínas recombinantes. As leptospiros foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com 100 μ L da solução de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase em PBS (proporção 1:5000; v/v) e incubados por 1 hora a 28 °C. As leptospiros foram lavadas três vezes com PBS e a revelação da reação foi realizada conforme descrito no item 3.8.

Como controle experimental, foi utilizado soro policlonal contra a proteína LipL31, uma proteína de membrana interna (controle negativo), e foram utilizados dois tratamentos-controle, o primeiro omitindo os antissoros e o outro sem a imobilização de leptospiros, para que se pudesse descontar quaisquer sinais inespecíficos.

Para as análises estatísticas, a média dos valores de absorbância do tratamento completo foi comparada com os controles negativos, por teste t-Student, e o p-valor abaixo de 5% foi considerado estatisticamente significativo.

3.14.2 Ensaio de acessibilidade por proteinase K por western blotting

Alíquotas de 20 mL de cultura de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20 (aproximadamente 10^8 células/mL) foram centrifugadas a $3.075 \times g$ por 15 min a temperatura ambiente e lavadas com PBS (50 mM NaCl), processo realizado duas vezes. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 15 mL de tampão de proteólise (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM CaCl_2), divididos em alíquotas de 5 mL. Adicionou-se proteinase K (PK) (25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) em cada alíquota e a atividade da enzima foi parada adicionando-se 100 mM de PMSF após 1h e 3h.

As alíquotas foram centrifugadas ($3.075 \times g$, 15 min) após o tratamento com PK, o sobrenadante foi descartado e as bactérias foram ressuspensionadas em 100 μL de PBS. As quantidades de leptospiros foram normalizadas por absorbância (420 nm) e após tratamento com tampão de SDS-PAGE e desnaturação a 96°C as amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose. As proteínas de interesse foram visualizadas pela interação com soro policlonal (1:200; v/v) e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:5000; v/v), enquanto que para o controle negativo foi escolhida a proteína citoplasmática DnaK (Ballard *et al.*, 1998) (anticorpo primário numa concentração de 1:1000; v/v) e detectado com anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:5000) seguindo a metodologia descrita no item 3.7.

3.14.3 Localização celular das proteínas em leptospiros por imunofluorescência

Culturas contendo *L. interrogans* sorovar Copenhageni (M20) foram centrifugadas a $3.075 \times g$ por 15 minutos. O sedimento bacteriano foi lavado três vezes com PBS *low-salt* (PBS-ls) (50 mM NaCl), e após mais uma centrifugação, o sedimento foi ressuspensionado em uma solução de 200 μL contendo 2% de paraformaldeído e incubado por 40 minutos a 30°C sob agitação. As amostras foram bloqueadas com 200 μL de PBS-ls contendo 5% de BSA por 90 minutos. Após a incubação, foram novamente centrifugadas por 5 minutos a $3.075 \times g$, e o sedimento bacteriano resultante foi ressuspensionado em uma solução PBS-ls com 5% de BSA contendo antissoro gerado em camundongo contra LipL46 (proteína de membrana externa) (Matsunaga *et al.*, 2006), PBS e contra as proteínas recombinantes rLIC11711 e rLIC12587 (diluição 1:50) por 2 h a 30°C . Em seguida, as amostras foram lavadas com PBS-ls com 5% de BSA e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com

isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich) juntamente com iodeto de propídeo (IP) (Sigma-Aldrich) por 16 h a temperatura ambiente. Após esse período, a solução foi centrifugada e o sedimentado bacteriano foi lavado duas vezes com PBS-ls contendo 5% de BSA. As bactérias foram ressuspensas em 50 μ L de PBS-ls acrescido de 50 μ L de *antifade* (Sigma-Aldrich). As imagens foram capturadas em microscópio de imunofluorescência confocal do modelo LSM 510 META (Carl Zeiss Inc., Alemanha), alocado no Departamento de Parasitologia do Instituto Butantan (São Paulo, Brasil). Foi utilizado aumento de 600x (FITC: excitação 488 nm, emissão 500-550 nm; IP: excitação 543 nm, emissão 612-619 nm).

3.15 Ensaio de adesão das proteínas recombinantes aos componentes da matriz extracelular e plasma do hospedeiro por ELISA

3.15.1 Componentes biológicos

As biomoléculas empregadas nos estudos de adesão foram adquiridas de diferentes empresas. Lamina-1 e colágeno tipo IV são derivados do sarcoma murino da membrana basal Engelbreth-Holm-Sarm; fibronectina celular é derivada de fibroblastos humanos; elastina é derivada do pulmão de camundongo; fibronectina plasmática e colágeno I foram isolados da cauda de rato; vitronectina e trombina foram purificadas do plasma humano, e todos estes componentes são oriundos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), incluindo fibrinogênio humano, fetuína, e-caderina (recombinante) e BSA. Plasminogênio (PLG), purificado de plasma humano e fator H foram comprados da EMD Chemicals (San Diego, EUA). Os componentes do sistema complemento C3b, C4b, C4bp, C6, C7, C8 e C9 foram obtidos da empresa Complement Technology (Tyler, EUA).

3.15.2 Análise da interação dos componentes com as proteínas recombinantes

Em placa para ELISA foram adicionados 250 ng/poço para vitronectina, 1 U/poço para trombina, 0,5 μ g/poço para e-caderina e 1 μ g/poço para os demais componentes, que foram incubados a 4 °C por 16 horas. Em seguida foram feitas três lavagens com PBS-T e bloqueio com PBS-T com 1% BSA (m/v) (PBS-T/BSA) e incubados por 2 horas a 37 °C. Logo após, foram feitas três lavagens com PBS/T e adicionou-se 1 μ g de proteína recombinante em cada poço, sendo a interação mantida por 2 horas a 37 °C. Após três lavagens, foi feita incubação com anticorpo anti-histidina (1:10000) por 1 hora a 37 °C.

Foram incluídos em cada ensaio os controles negativos BSA e fetuína, diluídos em PBS na concentração de 1 µg/poço. Para cada proteína recombinante, quatro poços foram adsorvidos com cada componente, sendo que em um deles não foi adicionada a proteína recombinante com o intuito de mensurar a reatividade basal (controle branco da reação) (Barbosa *et al.*, 2006).

O ensaio foi repetido utilizando os antissoros homólogos para cada recombinante (diluição na qual foi obtido OD de 1 baseado no ensaio de interação com a proteína recombinante prévio) no lugar do anticorpo anti-histidina. Como etapa adicional, foi necessária uma incubação com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:5000) por 1 hora a 37 °C. A reação enzimática foi revelada pela adição de 100 µL de uma solução contendo 1 mg/mL de OPD diluído em tampão citrato-fosfato pH5,0 contendo 1 µg/mL de peróxido de hidrogênio. Após 10 minutos, a reação foi interrompida adicionando-se 50 µL de solução H₂SO₄ 4 N. A reação foi analisada mensurando a absorbância no comprimento de onda de 492 nm.

Para as análises estatísticas, a média dos valores de absorbância de cada componente foi comparada com a média dos controles negativos BSA e fetuína por teste t-Student, e o p-valor abaixo de 5% foi considerado estatisticamente significativo.

3.15.3 Curvas de dose-resposta

Os ensaios de dose-resposta foram realizados com os componentes que apresentaram interações estatisticamente significativas com as proteínas recombinantes, nos ensaios com anticorpo anti-histidina e antissoro.

Em placas de ELISA, 100 µL de solução de cada componente diluído em PBS foram adicionados em cada poço (concentração de 1 µg/poço de componente), e incubou-se a 4 °C por 16 horas. Em seguida, foram feitas três lavagens com PBS-T e bloqueio com PBS-T com 1% BSA por 2 horas a 37 °C. Foram realizadas três lavagens com PBS-T e adicionou-se a rLIC11711 ou rLIC12587 em concentrações crescentes (0-20 µM), diluídas em tampão PBS (100 µL/poço), que foram mantidas interagindo por 2 horas a 37 °C. Após este período, foram feitas três lavagens com PBS/T e adicionou-se o anticorpo monoclonal anti-polihistidina (1:10.000) e incubação por 1 hora a 37 °C. A detecção foi realizada conforme o item 3.8.

Os valores de absorbância obtidos foram utilizados para calcular a constante de dissociação (K_D) com base na equação $A = A_{\text{máx}} [\text{proteína}] / (K_D + [\text{proteína}])$, na qual A é a absorbância em uma determinada concentração de proteína ($[\text{proteína}]$) e $A_{\text{máx}}$ é a absorbância

obtida na saturação da ligação (Lin *et al.*, 2009). Quando a saturação da ligação não foi atingida, a K_D foi estimada por regressão linear adaptando a equação de cinética enzimática de Michaelis-Menten, conforme descrito por Lin *et al* (2009).

3.16 Caracterização da ligação das proteínas recombinantes à laminina

Neste ensaio, foi avaliada a importância das moléculas de açúcar da laminina na ligação das proteínas recombinantes. Primeiramente, foi preparado uma solução de laminina (1 µg/mL) em tampão acetato de sódio (50 mM; pH 5,0), e adicionou-se 1 µg de lamina por poço em placa de ELISA. Em seguida, a laminina foi tratada com concentrações crescentes de metaperiodato de sódio (0 mM – 100 mM, Sigma) por 15 minutos a 4 °C, no escuro, para promover a oxidação de sua porção glicolítica. Após o tratamento, as proteínas recombinantes foram adicionadas aos poços (1 µg/poço) e incubadas a 37 °C por 2 horas. A detecção foi realizada como descrito no item 3.8.

A análise estatística foi realizada utilizando como parâmetros para o teste *t-Student* a média dos valores de absorbância obtidos por meio da interação das proteínas recombinantes à laminina oxidada e a média da interação com a laminina sem oxidação, sendo que valores $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.17 Ensaio de inibição da formação do coágulo de fibrina pelas proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes em diferentes concentrações (0 µM, 1,25 µM, 2,5 µM, 5 µM e 10 µM) foram incubadas com fibrinogênio humano (1 mg/mL) por 2 horas a 37 °C. Em seguida, adicionou-se 100 µL das incubações em poços de placa de ELISA e adicionou-se 10 µL de trombina (1 U/mL) em cada poço. A detecção da formação do coágulo de fibrina foi mensurada por absorbância no comprimento de onda de 595 nm, com leituras com intervalo de 2 minutos durante 1 hora.

Como controles experimentais, foram utilizados uma solução de fibrinogênio com a trombina, sem proteína recombinante (controle positivo), e solução de fibrinogênio com proteína recombinante mas sem a adição de trombina.

3.18 Ensaios de interação das proteínas recombinantes ao plasminogênio

3.18.1 Caracterização da ligação das proteínas recombinantes ao plasminogênio por western blotting

Verificou-se a interação do plasminogênio às proteínas recombinantes por western blotting. Para tanto, utilizaram-se três metodologias. Na primeira, as proteínas recombinantes foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, sem a adição de β -mercaptoetanol e sem desnaturação térmica a 96 °C. As proteínas foram posteriormente eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose, que foi bloqueada com solução de PBS-T com 10% leite desnatado (v/v) por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se o plasminogênio (1 μ g/ μ L) que foi incubado por mais 2 horas a temperatura ambiente. Adicionou-se anticorpo policlonal anti-plasminogênio produzido em camundongo, e depois anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (1:5000). A detecção foi realizada conforme descrito no item 3.7.

No segundo ensaio, amostras de proteína recombinante também foram desnaturadas por aquecimento a 96 °C e redução por β -mercaptoetanol. Utilizou-se a mesma metodologia anterior para verificar a ligação do plasminogênio às amostras não tratadas e desnaturadas.

Por fim, no terceiro ensaio o plasminogênio foi eletrotransferido para membrana de nitrocelulose após a eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, seguido pelo bloqueio da membrana com PBS-T com 10% leite desnatado. Adicionaram-se as proteínas recombinantes para a interação com plasminogênio, e a reação foi detectada a partir da incubação com solução de PBS-T 10% leite desnatado com anticorpo monoclonal anti-his numa diluição de 1:10000, e incubação por 1 hora a temperatura ambiente.

3.18.2 Caracterização da ligação das proteínas recombinantes ao plasminogênio por ELISA

A interação das proteínas recombinantes com o plasminogênio foi avaliada inicialmente por meio da importância dos resíduos de lisina com domínios estruturais do plasminogênio (Castellino e Mccance, 1997). Neste ensaio, as proteínas recombinantes foram diluídas em 10 μ g/mL em PBS contendo diferentes concentrações do ácido 6-aminocaproico (ACA) (2 e 20 mM), sendo este um análogo estrutural do aminoácido lisina, e adicionados nos poços previamente adsorvidos com plasminogênio (1 μ g/poço) enquanto que as etapas de detecção ocorreram conforme descritas anteriormente.

Com intuito de verificar se a ligação recombinante-plasminogênio é dependente de interações iônicas, foi realizado ensaio utilizando diferentes concentrações de NaCl (100 mM, 200 mM e 300 mM). As proteínas recombinantes foram diluídas em 10 µg/mL em PBS com adição das diferentes concentrações de NaCl, e adicionados nos poços previamente adsorvidos com plasminogênio enquanto que as etapas de detecção ocorreram conforme descritas anteriormente.

Os resultados foram expressos em porcentagem de ligação, e para as análises estatísticas a média as intensidades de absorbância obtidos nas ligações com ACA ou NaCl foram comparadas com a média de absorbância das amostras onde não havia as moléculas (valor máximo de ligação) utilizando o teste t-Student. Um p-valor abaixo de 0,05 foi considerado como estatisticamente significativo.

3.18.3 Ensaio de conversão de plasminogênio em plasmina por ELISA

Neste experimento foi verificado se o plasminogênio ligado às recombinantes consegue ser convertida em sua forma enzimaticamente ativa, a plasmina (PLA), após adição de um ativador exógeno. Para tanto, foi adicionado nos poços da placa de ELISA 1 µg de recombinante diluído em PBS, e incubou-se a 4°C por 16 horas. A placa foi lavada 3 vezes com PBS/T e foi feito o bloqueio com solução PBS-T/BSA a 37°C durante 2 horas. Após 3 lavagens com PBS/T, foi adicionado 1 µg de plasminogênio ou solução PBS/T com 1% BSA contendo 30% (v/v) de soro humano (Sigma), num volume de 100 µL por poço, e incubou-se por 2 horas a 37 °C. Em sequência, foram feitas 3 lavagens com PBS/T e a cada poço foram adicionados 4 ng do ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPa) e o substrato cromogênico para plasmina, D-Val-Leu-Lys 4-nitroanilide dihydrochloride (Sigma). As placas foram incubadas por 1h a 37 °C e a degradação do substrato foi mensurada por absorbância no comprimento de onda em 405 nm.

Para as análises estatísticas, os valores de absorbância do tratamento completo foram comparados com os valores de absorbância dos tratamentos controles, onde um dos componentes foi omitido, e sendo detectada diferença significativa, os valores de absorbância foram comparados com o controle negativo BSA, pelo teste t-Student, e um *p-value* abaixo de 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

3.19 Caracterização da ligação das proteínas recombinantes a vitronectina usando a heparina como competidor

Vitronectina foi adicionada em poços de placa de ELISA (250 ng/poço) e mantida para adsorção por 16 horas a 4 °C. Foram realizadas lavagens com PBS-T e bloqueio com PBS-T/BSA, mantido por 2 horas a 37 °C. Após o bloqueio, adicionou-se 50 µL por poço de solução de proteína recombinante com concentração de 10 µM para rLIC11711 e 5 µM para rLIC12587. Foram adicionados em seguida 50 µL de solução de heparina, com as quantidades de 0 µg/poço, 10 µg/poço e 100 µg/poço. A interação entre proteína recombinante e heparina com a vitronectina foi mantida por 2 horas a 37 °C. Após sucessivas lavagens, adicionou-se anticorpo anti-his conjugado com peroxidase, que foi mantido para interagir por 1 hora a 37 °C. A detecção da interação entre os componentes foi feita conforme o item 3.8.

3.20 Ensaio de ligação das proteínas recombinantes aos componentes do sistema complemento provenientes de soro humano

Neste ensaio foi avaliado se as proteínas recombinantes conseguem se ligar aos componentes da via terminal do sistema complemento C7, C8 e C9 tendo como fonte única o soro humano.

Inicialmente, 1 µg da proteína recombinante foi adicionada em poços de placa de ELISA e a incubação foi feita a 4 °C por 16 horas. Foi feito bloqueio com PBS-T/BSA por 2 horas a 37 °C. Após o bloqueio, foi adicionado nos poços soluções contendo 5%, 10% e 20% de soro humano comercial (Sigma) em PBS-T/BSA e a incubação ocorreu por 2 horas a 37 °C. Por conseguinte, foi adicionado anticorpo IgG produzido em cabra contra os respectivos componentes do sistema complemento (1:10000) e mantidos para interagir por 1 hora a 37 °C. Em seguida, a incubação foi feita com anticorpo anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase (1:50000). A revelação da interação entre as proteínas recombinantes e componentes do sistema complemento foi feita conforme o item 3.8.

3.21 Comitê de Ética

Todos os estudos com animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB), protocolado sob o certificado 6819120116. Este projeto também foi analisado e aprovado pela CEUA e CEPESH – Comissão de Ética em

Pesquisa com Seres Humanos, sob protocolo nº 806/2016, do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises *in silico* dos genes

As proteínas de membrana externa da *L. interrogans*, devido à localização, estão potencialmente envolvidas no processo de invasão, adesão e evasão do sistema imune, além da importância para o *housekeeping* do microrganismo. Desta forma, estudar estas proteínas é fundamental para o entendimento do processo infeccioso e disseminação da doença. Por estarem localizadas externamente na bactéria, as proteínas são potenciais candidatos vacinais.

Para a predição da localização das possíveis proteínas, alguns softwares de acesso gratuito estão disponíveis, possibilitando uma análise inicial.

Os dois genes (LIC11711 e LIC12587) foram identificados no cromossomo I da *L. interrogans* sorovar Copenhageni. A proteína codificada pelo gene LIC11711 foi predita como uma proteína periplasmática/membrana externa pelo PSORT (Nakai e Kanehisa, 1991), e membrana externa pelo CELLO (Yu *et al.*, 2006), enquanto que para a proteína codificada pelo gene LIC12587, a predição indica uma proteína de membrana externa/citoplasmática e membrana externa/membrana interna, respectivamente pelos dois programas. Em uma análise com auxílio do LipoP, as proteínas codificadas por LIC11711 e LIC12587 foram preditas como prováveis lipoproteínas com sítios de clivagem na porção N-terminal pela enzima signal peptidase II (SpII) (Juncker *et al.*, 2003). Os resultados sugerem que as proteínas codificadas pelos genes LIC11711 e LIC12587 são preditas lipoproteínas que provavelmente encontram-se associadas a membrana externa da leptospira pela porção lipídica.

Devido à grande quantidade de espécies e cepas patogênicas de *Leptospira*, é importante que o alvo vacinal seja conservado na maior quantidade de leptospiros patogênicos. A partir da sequência de aminoácidos da proteína madura, ou seja, sem o peptídeo sinal, realizou-se um alinhamento contra o banco de dados do NCBI por meio do BLAST, obtendo-se *hits* de acordo com a similaridade entre as sequências; as sequências então foram alinhadas localmente empregando o software Clustal Omega, gerando como *output* os filogramas ilustrados pela Figura 7. Observa-se uma maior identidade entre as sequências da LIC11711 e LIC12587 com as espécies patogênicas, enquanto que as espécies saprofíticas, incluindo a *L. biflexa* (Picardeau *et al.*, 2008), apresentam uma baixa porcentagem de cobertura entre as sequências e baixa identidade. Este resultado reforça que por serem bastante conservadas em cepas patogênicas, estas proteínas podem constituir um

bom alvo vacinal, por garantir um amplo espectro de proteção contra diferentes espécies e cepas.

Figura 7. Análise da conservação das sequências da LIC11711 e LIC12587 entre espécies de *Leptospira* por alinhamento múltiplo usando Clustal Omega. As sequências alvo foram analisadas por BLASTp com sequências disponíveis no banco de dados GenBank e foram usados para realizar alinhamentos múltiplos no Clustal Omega. Os filogramas gerados mostram um alto grau de similaridade entre espécies patogênicas enquanto que as espécies saprofíticas apresentaram uma baixa taxa de conservação das sequências alvo. Entre parênteses: *Cover query* (porcentagem de cobertura das sequências do banco de dados em relação a sequência alvo) e *Max identity* (porcentagem de identidade entre as sequências do banco de dados com a sequência alvo no comprimento em que houve cobertura).

4.2 Amplificação e clonagem dos genes

As sequências de DNA correspondentes aos genes LIC11711 e LIC12587 foram amplificadas por PCR utilizando o DNA genômico da *L. interrogans* sorovar Copenhageni como molde e os pares de oligonucleotídeos descritos na Tabela 2. Os amplicons puderam ser visualizados após separação por eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 8).

Figura 8. Análise dos amplicons obtidos após PCR em diferentes temperaturas de anelamento por eletroforese em gel de agarose 1%. (M) marcador molecular 1kb DNA Ladder; (1) LIC11711, temperatura de anelamento 60 °C; (2) LIC11711, temperatura de anelamento 65 °C; (3) LIC12587, temperatura de anelamento 60 °C; (4) LIC12587, temperatura de anelamento 65°C. A seta indica os amplicons no tamanho esperado (aproximadamente 600 pares de base).

Como se pode observar, a amplificação dos genes foi bem sucedida sendo possível visualizar as bandas nos tamanhos esperados dos genes. Somente para a LIC11711 não foi possível a amplificação utilizando a temperatura de anelamento de 65 °C.

Os amplicons obtidos foram utilizados para a clonagem no vetor pGEM-T Easy (Promega). Este vetor é muito conveniente quando se utiliza para a PCR uma DNA polimerase termoestável, como a Taq DNA polimerase, que adiciona uma adenina na extremidade 5' do amplicon uma vez que não apresenta atividade exonuclease 3'-5'. O pGEM-T Easy é linearizado e tem timidinas sobressalentes nas extremidades 3' que facilitam a ligação do amplicon ao vetor. Além disso, o sítio de múltipla clonagem está inserido no gene que expressa a enzima β -galactosidase, o que possibilita a seleção azul/branco de colônias. Quando a β -galactosidase é expressa, ou seja, quando o vetor é circularizado sem a ligação de qualquer inserto, as colônias transformadas com este plasmídeo são capazes de degradar o substrato X-Gal, análogo de galactose, ficando então coradas com coloração azul. Uma vez que o inserto está ligado no vetor, a β -galactosidase deixa de ser produzida, o que faz com que as colônias fiquem brancas.

Após a ligação, as reações de ligação foram utilizadas para transformação de células de *E. coli* DH5 α competentes. As colônias brancas foram selecionadas para a extração plasmidial e os plasmídeos obtidos digeridos com as enzimas de restrição para verificar a presença do inserto.

Os insertos foram purificados do gel e ligados no vetor de expressão pAE. Os plasmídeos recombinantes (pAE/inserto) foram extraídos e verificados pelo ensaio de fenol-clorofórmio, uma vez que este vetor não apresenta um mecanismo de seleção para as colônias positivas para o inserto (Figura 9), seguido pelo ensaio de restrição enzimática para confirmação da presença do inserto referente ao gene LIC11711 ou LIC12587 (Figura 10).

Figura 9. Análise dos clones obtidos após transformação com plasmídeo pAE recombinante por ensaio de fenol-clorofórmio. (A) pAE-LIC11711 e (B) pAE-LIC12587. M) marcador molecular 1Kb Plus DNA ladder; 1) controle negativo correspondente ao vetor pAE selvagem; 2-13) diferentes clones selecionados para análise. A seta indica os clones selecionados por meio da massa molecular plasmidial referente ao vetor pAE somado ao inserto.

Figura 10. Análise de restrição enzimática para confirmação da presença do inserto nos clones selecionados. (A) LIC11711 e (B) LIC12587. M) marcador molecular 1Kb Plus DNA ladder. 1, 3 e 5) plasmídeos circulares; 2, 4 e 6) plasmídeos digeridos com as enzimas de restrição BamHI e KpnI. As setas indicam os insertos liberados no tamanho esperado de aproximadamente 600 pb.

Pelo ensaio por fenol-clorofórmio, foi possível selecionar três colônias positivas para a presença do gene LIC1171 e duas colônias positivas para LIC12587. Após a restrição enzimática das amostras selecionadas, somente em uma colônia da LIC12587 foi possível verificar a liberação do inserto e, portanto, esta única amostra foi selecionada para as etapas posteriores.

4.3 Sequenciamento dos genes

As construções plasmidiais foram sequenciadas e confirmou-se que todas estavam em fase correta de leitura e não apresentaram mutações. Observou-se em ambos os sequenciamentos o códon de início de transcrição do gene ATG seguido pela sequência codificadora das seis histidinas, sítios de restrição XhoI e BamHI, já existentes no sítio de múltipla clonagem do vetor pAE, e a sequência inicial 5' de cada gene.

4.4 Expressão das proteínas recombinantes

Um estudo inicial *in silico* das proteínas recombinantes é uma etapa importante para otimizar todas as etapas de expressão e purificação, uma vez que pode-se prever a massa molecular, ponto isoelétrico (pI), porcentagem dos aminoácidos que compõem a proteína, pontes dissulfeto, dentre outras características.

Neste sentido, utilizou-se o programa ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005) para obter informações relevantes das proteínas recombinantes antes da expressão. Na Tabela 3 estão descritos o resultado dos cálculos de massa molecular e pI teóricos das proteínas recombinantes, realizados a partir da composição de aminoácidos do cassete de expressão.

Tabela 3. Massa molecular e ponto isoelétrico teórico das proteínas recombinantes.

Proteína recombinante	Número de aminoácidos	Massa molecular predita	Ponto isoelétrico teórico	Quantidade de lisina (porcentagem baseado no total de a.a.)
rLIC11711	199	22,80 kDa	7,14	18 (9,0%)
rLIC12587	208	23,98 kDa	7,13	22 (10,6%)

Após a avaliação *in silico*, foi realizado um estudo inicial de indução da expressão das proteínas recombinantes rLIC11711 e rLIC12587 com as cepas de *E. coli* BL21 (DE3) Star pLysS e BL21 SI. Após a indução da expressão das proteínas recombinantes com diferentes concentrações de IPTG ou NaCl, realizou-se a lise celular e o fracionamento por centrifugação da fração solúvel (sobrenadante) e insolúvel (sedimentado). A análise foi feita SDS-PAGE (Figura 11).

Figura 11. Análise da expressão das proteínas recombinantes por SDS-PAGE. (A) rLIC11711 e *E. coli* Star pLysS, (B) rLIC12587 e *E. coli* Star pLysS, (C) rLIC11711 e *E. coli* SI, (D) rLIC12587 e *E. coli* SI. M) padrão de massa molecular (kDa). 1-sobrenadante não induzido; 2-sobrenadante induzido com 0,01 mM IPTG ou 3 mM NaCl; 3- sobrenadante induzido com 0,1 mM IPTG ou 30 mM NaCl; 4- sobrenadante induzido com 1 mM IPTG ou 300 mM NaCl; 5- fração insolúvel não induzida 6- fração insolúvel induzida com 0,01 mM IPTG ou 3 mM NaCl; 7- fração insolúvel induzida com 0,1 mM IPTG ou 30 mM NaCl; 8- fração insolúvel induzida com 1 mM IPTG ou 300 mM NaCl. As setas indicam as proteínas recombinantes expressas com massas moleculares esperadas de 22,8 kDa (rLIC11711) e 24 kDa (rLIC12587).

Verificou-se a expressão das proteínas recombinantes tanto na forma solúvel quanto em corpos de inclusão (insolúvel) para ambas as cepas. Ambas as cepas utilizadas ajudam na expressão de proteínas recombinantes com algumas características singulares: a *E. coli* BL21 (DE3) Star pLysS possui mutação no gene *rne* que codifica uma enzima RNase E truncada que não consegue degradar RNAm, garantindo, deste modo, uma maior estabilidade do RNAm produzido para a tradução das proteínas recombinantes; já o plasmídeo pLysS produz a lisozima do fago T7 e reduz a expressão em níveis basais do gene de interesse, por exemplo, num momento de crescimento celular antes da indução. Por outro lado, cepa *E. coli* BL21 (DE3) SI possui a T7 polimerase sob controle do promotor proU, induzível por sal, e este mecanismo de expressão favorece solubilidade da proteína recombinante.

Apesar de aparentemente a cepa SI ter produzido uma quantidade maior de proteína recombinante solúvel, foi observado um escape de expressão nos ensaios onde não foi feita a indução com NaCl. Deste modo, devido ao maior controle de expressão e a obtenção das proteínas recombinantes na fração solúvel, foi escolhida a cepa *E. coli* BL21 Star pLysS para a expressão e purificação das proteínas recombinantes em uma maior escala.

4.5 Purificação das proteínas recombinantes

A purificação das proteínas recombinantes expressas ocorreu por cromatografia de afinidade ao metal, na qual a resina Chelating Sepharose foi tratada previamente com íons níquel (Ni^{2+}).

A mecânica da purificação tem como princípio a afinidade dos resíduos de histidina (adicionadas na porção N-terminal da proteína recombinante pelo vetor de expressão pAE) com o íon níquel, por meio do anel imidazólico presente na cadeia lateral deste aminoácido (Hochuli *et al.*, 1988). Por outro lado, outras proteínas são consideradas contaminantes, sendo então removidas com as lavagens iniciais com baixa concentração de imidazol, uma vez que não interagem ou se ligam fracamente à resina. A proteína recombinante pode ser finalmente eluída por meio de uma solução tampão com alta concentração de imidazol (1M). Neste processo ocorre uma competição entre as histidinas adicionadas a proteína recombinante pelo pAE e o imidazol, e a proteína recombinante é liberada da coluna. As frações coletadas durante o processo de purificação foram analisadas por imunoblotting, conforme ilustrado na Figura 12.

Figura 12. Análise de purificação das proteínas recombinantes por western blotting. A) purificação da rLIC11711, B) purificação da rLIC12587. M) padrão de massa molecular (kDa); 1) amostra antes da passagem pela coluna cromatográfica; 2) amostra após a passagem pela coluna; 3-6) lavagens com concentrações crescentes de imidazol (5 mM a 60 mM); 7-14) frações da proteína recombinante coletadas após eluição com solução 1M de imidazol. As proteínas recombinantes foram detectadas utilizando o anticorpo monoclonal anti-His conjugado com a enzima peroxidase.

As frações da purificação foram dialisadas visando-se a substituição da solução contendo imidazol por um tampão apropriado, sendo utilizado PBS para as duas proteínas recombinantes, as quais foram quantificadas por análise densitométrica das bandas em gel de poliacrilamida e também pelo ensaio de Bradford (OD. 595 nm) utilizando concentrações pré-

estabelecidas de BSA como referencial. Após emprego das diferentes metodologias, chegou-se a concentração de 1,53 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para rLIC11711 e 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para rLIC12587.

4.6 Espectroscopia de dicroísmo circular

A técnica de espectroscopia de dicroísmo circular, ou simplesmente dicroísmo circular (DC), é uma técnica que permite o estudo dos elementos de estrutura secundária das proteínas em solução (α -hélice, folha- β e estrutura randômica), elementos os quais contribuem na formação da sua estrutura terciária (Kelly *et al.*, 2005). Desta forma, o DC foi empregado para verificar a estruturação das proteínas recombinantes rLIC11711 e rLIC12587 e compará-las com suas estruturas nativas preditas anteriormente por bioinformática.

Esta técnica é baseada no fato de que moléculas quirais podem absorver luz circularmente polarizada para a direita diferentemente da luz circularmente polarizada para a esquerda, provocando um desvio no ângulo da polarização da luz incidente (elipticidade), que é medido pelo polarímetro (Ranjbar e Gill, 2009). Os cromóforos que originam os espectros de DC em peptídeos e proteínas são os elementos estruturais que resultam na estrutura secundária e cada elemento possui um espectro característico (Kelly *et al.*, 2005).

No caso de proteínas, o DC permite estimar a quantidade de estruturas secundárias de uma dada amostra, por exemplo, estruturas proteicas ricas em α -hélice possuem sinais negativos em 208 nm e 222 nm, e um sinal positivo em 193 nm. Uma estrutura em folha- β apresenta sinal negativo em 218 nm e positivo em 195 nm, enquanto que proteínas desordenadas apresentam sinal muito baixo em 210 nm e sinal negativo em 195 nm (Holzwarth e Doty, 1965).

Utilizando estes princípios, pode-se comparar a composição das estruturas secundárias de uma proteína com o predito *in silico*, e desta forma pode-se verificar se a proteína alvo está numa conformação nativa ou próxima da nativa, ou numa conformação totalmente diferente (desnaturada ou desordenada). A Figura 13 ilustra os espectros obtidos para a rLIC11711 e rLIC12587.

Figura 13. Espectros de dicroísmo circular. As proteínas recombinantes rLIC11711 (A) e rLIC12587 (B) foram dialisadas contra tampão fosfato pH 7,4 20mM, com 3 trocas. A obtenção dos espectros foi feita em um espectropolarímetro usando uma célula de 1 mm de caminho óptico com intervalos de 0,5 nm.

Com base nos espectros de dicroísmo circular obtidos experimentalmente, a rLIC11711 apresentou predominância de estruturas irregulares ou *coil* e α -hélice, enquanto que para rLIC12587 foi observado estrutura secundária do tipo folha- β além de estruturas irregulares.

Os espectros de dicroísmo circular obtidos para as duas proteínas recombinantes se diferiram em relação à predição teórica via algoritmo Chou-Fasman (Chou e Fasman, 1974), baseada na sequência de aminoácidos (Tabela 4). Por outro lado, é importante ressaltar que não se pode afirmar que a predição teórica por este algoritmo realmente espelha a composição real de estruturas secundárias das proteínas nativas, e nem que o dobramento da proteína recombinante é idêntico à proteína nativa, uma vez que as condições de expressão (microrganismo heterólogo, exportação para superfície, formação de corpos de inclusão, condições meio externo, dentre outros) podem afetar estruturalmente a proteína recombinante. Por fim, baseado no fato de que as proteínas recombinantes foram obtidas na fração solúvel do lisado bacteriano e não foram necessárias etapas de desnaturação e renaturação das proteínas recombinantes, os valores obtidos experimentalmente em relação às estruturas proteicas tendem a ser mais confiáveis que a predição teórica.

Tabela 4. Predição das estruturas secundárias das proteínas recombinantes

Proteína	α -hélice (teórico/experimental)	folha- β (teórico/experimental)	Estrutura irregular (teórico/experimental)
rLIC11711	34% / 25%	40% / 8%	26% / 58%
rLIC12587	65% / 10%	17% / 32%	18% / 49%

4.7 Avaliação da imunogenicidade das proteínas recombinantes em camundongos

Os soros obtidos de camundongos imunizados foram avaliados quanto à presença de anticorpos anti-rLIC11711 e anti-rLIC1287 por ELISA.

A Figura 14 mostra a média dos títulos obtidos em cada uma das três imunizações. O título de anticorpos foi definido como o inverso da última diluição do soro cuja absorbância ficou acima do valor limítrofe de 0,1 (492 nm).

Figura 14. Titulação de anticorpos nos soros de camundongos imunizados. Os animais foram imunizados três vezes com intervalos de 15 dias com solução de PBS contendo 10 µg de proteína recombinante mais adjuvante. A titulação foi realizada por ELISA contra 250 ng da proteína homóloga.

O grupo de animais imunizados com a rLIC11711 apresentaram maiores títulos, com média de 1096000 após a terceira imunização, enquanto que para a rLIC12587 foi obtido um título médio de 294000. O grupo controle, imunizado com PBS, não apresentou quaisquer títulos (dados não mostrados).

4.8 Avaliação do estado oligomérico das proteínas expressas

A avaliação do estado oligomérico após a purificação das proteínas recombinantes rLIC11711 e rLIC12587 foi feita por western blotting. Em relação à rLIC11711, pode-se observar na Figura 15A e duas bandas detectadas por anticorpo monoclonal anti-his na coluna sem tratamento (no qual não foi adicionado o β -mercaptoetanol nem aquecimento da amostra a 96 °C). Sabe-se que esta proteína recombinante tem massa molecular de 22,8 kDa, e a banda de massa molecular de aproximadamente 45 kDa provavelmente é uma estrutura dimérica desta proteína. O resultado é similar quando a proteína recombinante passa pelo mesmo tratamento e é detectada pelo antissoro policlonal.

Este resultado obtido em relação à estrutura dimérica da rLIC11711 é reforçado quando a amostra é desnaturada quimicamente com adição de β -mercaptoetanol e termicamente por aquecimento a 96 °C, observa-se somente a banda de 22,8 kDa, que pode ser detectado tanto com anti-his quanto com antissoro.

Em relação à rLIC12587, observou-se várias bandas na amostra não desnaturada, sendo uma banda fraca de 24 kDa, uma banda de aproximadamente 48 kDa e várias bandas de massas moleculares superiores a 66 kDa quando a detecção foi feita com anti-his ou antissoro. Assim como a rLIC11711, após a desnaturação da amostra observa-se somente a banda de 24 kDa na detecção com anti-his (Figura 15A), enquanto que na detecção com antissoro (Figura 15B) também foi possível detectar fracamente a banda referente ao dímero. Deste modo, os resultados sugerem que a rLIC12587 pode ser encontrada na forma de oligômeros de massas moleculares maiores em relação a quantidade de monômeros unidos.

Figura 15. Análise estrutural das proteínas recombinantes por western blotting e cromatografia de exclusão molecular. Amostras de proteínas recombinantes foram separadas por eletroforese resultando em bandas de proteínas desnaturadas ou por eletroforese sem aquecimento a 96 °C e tratamento das amostras com β -mercaptoetanol (amostras sem tratamento). A detecção das bandas foi realizada por western blotting incubando as membranas com anticorpo monoclonal anti-his (A) ou antissoro específico contra as proteínas recombinantes produzidas em camundongos e anti-mouse conjugado com HRP (B). As proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de exclusão molecular para avaliação das possíveis estruturas quaternárias. (C) cromatograma de exclusão molecular da rLIC11711; (D) cromatograma de exclusão molecular da rLIC12587; (E) Avaliação das amostras monoméricas e diméricas da rLIC11711 purificadas por cromatograma de exclusão molecular por eletroforese sem tratamento com β -mercaptoetanol e aquecimento a 96 °C.

Para avaliar as estruturas quaternárias formadas pelas proteínas recombinantes foram realizadas avaliações por cromatografia de gel-filtração. Esta técnica permite a purificação de diferentes proteínas contidas numa mesma amostra, que podem ser separadas pelas diferenças de tamanho diretamente relacionadas com as massas moleculares. A coluna cromatográfica é preenchida com resina constituída por *microbeads*, formadas por polímero com porosidade variada. À medida que a solução passa pela coluna, as partículas menores apresentam maior dificuldade de atravessar a coluna devido à porosidade, e, portanto, apresentam maior tempo

de retenção, enquanto que as proteínas maiores atravessam facilmente a resina e são eluídas primeiro (Porath e Flodin, 1959; Hong *et al.*, 2012).

A Figura 15C ilustra o cromatograma referente a purificação da proteína recombinante rLIC11711, na qual é possível observar dois picos que são referentes ao dímero, aproximadamente 75 mL, e ao monômero, aproximadamente 85 mL, sendo os valores referentes ao volume da mistura entre as proteínas e o tampão necessário para a passagem das proteínas de tamanhos diferentes.

Após a cromatografia de gel-filtração, as amostras purificadas foram analisadas por eletroforese em gel de acrilamida sem tratamento com β -mercaptoetanol e aquecimento (96 °C) (Figura 15E), na qual foi possível observar a forma dimérica da rLIC11711 com tamanho esperado de aproximadamente 46 kDa, enquanto que no monômero purificado também foi observado estrutura de dímero, provavelmente formado devido ao deslocamento do equilíbrio na solução pela maior concentração do monômero. A mistura das soluções purificadas do monômero e dímero mostraram a presença de ambas as bandas referentes às conformações.

Os dados obtidos na cromatografia de gel-filtração reforçam a ideia de que a proteína recombinante pode ser encontrada como monômero e dímero, sendo que provavelmente o dímero é uma estrutura mais estável.

Em relação à rLIC12687, é possível observar na Figura 15D picos em aproximadamente 87 mL e 77 mL, e mais fracamente em 68 mL, 55 mL e 45 mL. Contudo, somente foi possível coletar a rLIC12587 monomérica (87 mL), enquanto que para os outros picos que poderiam ser referentes às conformações oligoméricas a quantidade de proteína foi baixa e não foi possível fazer a análise por eletroforese.

A análise estrutural de proteínas de *Leptospira*, como relatado neste trabalho, ainda não é muito bem explorada, principalmente quando se trata de proteínas localizadas na superfície da bactéria.

Apesar deste fato negativo, os resultados sugerem que a rLIC12587 é predominantemente encontrada na forma monomérica, mas também pode ter estruturas oligoméricas com massas moleculares maiores.

4.9 Ensaio de conservação antigênica das proteínas de estudo em diferentes espécies de leptospira

Foi avaliada a presença das proteínas nativas LIC11711 e LIC12587 em extratos de celulares de diferentes cepas de *Leptospira*, citadas no item 3.1, por imunoblotting.

Pode-se observar na Figura 16 a detecção das proteínas de interesse por meio da interação com antissoro produzido contra as proteínas recombinantes nos diferentes extratos proteicos.

Figura 16. Análise de conservação das proteínas de estudo em diferentes cepas de *Leptospira* por western blotting. Extratos das bactérias após lise celular foram submetidas ao SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose. As proteínas nativas codificadas pelos genes LIC11711 (A) e LIC12587 (B) foram detectadas usando o antissoro produzido contra a proteína recombinante e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase. 1) Proteína recombinante; 2) *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20; 3) *L. interrogans* sorovar Canicola cepa Hound Utrecht IV; 4) *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae cepa RGA; 5) *L. interrogans* sorovar Pomona cepa Pomona; 6) *L. borgpetersenii* sorovar Whitticombi cepa Whitticombi; 7) *L. kirschneri* sorovar Cynopteri cepa 3522C; 8) *L. kirschneri* sorovar Grippotyphosa cepa Moskva V; 9) *L. santarosai* sorovar Shermani cepa 1342 K; 10) *L. biflexa* sorovar Patoc cepa Patoc1.

Pode-se observar a interação entre o antissoro com a proteína LIC11711, detectada em todas as espécies patogênicas de *Leptospira* exceto na espécie saprofítica *L. biflexa*, o que sugere que esta proteína é expressa pelo microrganismo durante o processo de infecção, e reforça o resultado anterior, realizado por ELISA. O ensaio realizado para a LIC12587 apresentou uma menor sensibilidade para detecção da proteína nativa nos extratos bacterianos.

No *western blotting* as bactérias são lisadas e as biomoléculas passam por um processo de desnaturação por aquecimento e tratamento químico (β -mercaptoetanol). Supõe-se que este tratamento possa interferir no reconhecimento da proteína codificada pelo gene LIC12587 pelo anticorpo. Ambas as proteínas são encontradas em baixo número de cópias na *L. interrogans* sorovar Copenhageni (11 cópias para LIC11711 e 14 cópias para LIC12487) baseado no estudo de proteoma quantitativo (Malmström *et al.*, 2009); em termos

comparativos, a LipL32 é proteína mais abundante na leptospira com aproximadamente 38 mil cópias por célula (Malmström *et al.*, 2009). O baixo número de cópias por célula da LIC12587 associado ao menor reconhecimento pelos anticorpos após desnaturação pode dificultar a detecção desta proteína por western blotting.

4.10 Ensaios de localização

As proteínas codificadas pelos genes LIC11711 e LIC12587 foram preditas como prováveis proteínas de membrana externa pelos programas PSORT e CELLO. Os programas de bioinformática para localização utilizam diferentes metodologias, como máquina de vetores suporte (SVM), rede Bayesiana, redes neurais artificiais, dentre outros, para obter uma predição mais próxima o possível do real. Todas estas metodologias *in silico* necessitam de um banco de dados inicial, neste caso com sequências de proteínas preferencialmente caracterizadas, sendo utilizada para o desenvolvimento de algoritmos para a predição por homologia da proteína alvo.

Uma das limitações observadas é a ausência ou baixo número de sequências proteicas de espiroquetas contidas nos bancos de dados, que limita o número de *templates* para comparação por homologia. De todos os programas de bioinformática utilizados, somente o LipoP contém uma quantidade considerável de estruturas primárias de proteínas de espiroquetas, que proporciona uma predição mais confiável.

Deste modo, foram realizadas diferentes metodologias de localização celular *in vitro* para confirmar a localização das proteínas codificadas pelos genes LIC11711 e LIC12587 de *L. interrogans* sorovar Copenhageni.

4.10.1 Localização em bactéria intacta por ELISA

Para que uma proteína seja considerada um bom candidato vacinal para leptospirose, dois fatores muito importantes devem ser levados em consideração: a localização celular da proteína e sua presença no maior número de espécies e cepas do patógeno.

Proteínas de membrana externa são os principais alvos vacinais, uma vez que a proteína alvo deve estar acessível para o reconhecimento pelos anticorpos e deste modo impedir a disseminação da doença. Ao mesmo tempo, esta proteína deve estar presente no maior número de sorovares patogênicos para que a vacina possa ser utilizada em diferentes regiões e países onde ocorre a variação entre os sorovares patogênicos.

Desta forma, um dos ensaios que podem ser realizados para fazer a localização celular da proteína alvo na bactéria é um imunoenensaio por ELISA utilizando a bactéria intacta. Neste ensaio, a cepa atenuada M20 de *L. interrogans* e a cepa saprofítica *L. biflexa* sorovar Patoc foram imobilizadas em placa de ELISA e foi realizada a detecção das proteínas nativas utilizando o antissoro homólogo gerado contra as proteínas recombinante (Figura 17).

Figura 17. Análise de localização celular das proteínas nativas em diferentes espécies de *Leptospira* por ELISA. Para a detecção das proteínas nativas foi utilizado os soros anti-proteína recombinante produzidos em camundongos seguido do reconhecimento pelo anticorpo secundário IgG anti-camundongo conjugado com peroxidase.

Os resultados obtidos sugerem a detecção das proteínas nativas expressas pelos genes LIC11711 e LIC12587 na M20 apenas no sistema completo, enquanto que não houve diferença significativa nos ensaios onde o anticorpo primário ou a bactéria não foram adicionados, em comparação com o controle negativo LipL31, descrita como proteína da membrana citoplasmática (Haake e Matsunaga, 2002).

Para a *L. biflexa* sorovar Patoc, os valores do sistema completo foram muito inferiores quando comparados com a cepa M20. Apesar desta diferença, houve diferença significativa entre as duas proteínas quando comparadas com o sistema completo do controle negativo. Pode-se justificar esta interação de menor intensidade devido à baixa similaridade das proteínas expressas pelos genes LIC11711 (44%) e LIC12587 (31%) de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20 com a espécie saprofítica *L. biflexa* cepa Patoc1.

4.10.2 Ensaio de acessibilidade da proteinase K

Esta técnica permite verificar se as proteínas de interesse estão localizadas na superfície da leptospira a partir da degradação com proteinase K (PK). A PK é uma serino protease de amplo espectro produzida pelo fungo *Engyodontium álbum*, que cliva preferencialmente ligações peptídicas adjacentes ao grupo carboxílico de aminoácidos hidrofóbicos (Ebeling *et al.*, 1974). Devido ao seu amplo espectro de atuação, a PK é utilizada para digestão de proteínas em geral, como remoção de contaminantes ou degradação de nucleases. O tratamento de leptospiros com a PK para avaliar a exposição de proteínas na membrana externa já foi descrito previamente (Pinne e Haake, 2009; Oliveira *et al.*, 2010).

Neste ensaio, *L. interrogans* sorovar Copenhageni (M20) vivas as bactérias foram tratadas com PK por diferentes períodos de tempo, seguido pela detecção das proteínas utilizando antissoro produzido contra as respectivas proteínas recombinantes por imunoblotting.

Figura 18. Ensaio de acessibilidade da proteinase K por western blotting. Leptospiros viáveis foram incubadas com 25 µg/mL de PK por 0, 1 e 3 horas seguido pela incubação com antissoro específico para LIC11711, LIC12587 e DnaK (controle negativo). Para a detecção, utilizou-se anticorpo secundário anti-mouse (1:5000) e o substrato SuperSignal West Dura. kDa: marcador de massa molecular LMW; 1: proteína recombinante rLIC11711; 2: tratamento por 0 h com PK; 3: tratamento por 1 h com PK; 4: tratamento por 3 h com PK; m: monômero; d: dímero.

Observa-se na Figura 18 uma redução gradual ao longo do tempo das bandas referentes à LIC11711 com maior degradação desta proteína no tratamento de 3 horas com a

PK, na qual houve uma degradação de aproximadamente 55% da banda monomérica (LIC11711m; 22,8 kDa) quando comparado com o tratamento 0 horas. Já em relação ao suposto dímero (LIC11711d; 45,6 kDa), a banda referente a esta estrutura não pode ser mais detectada após 3 horas de incubação com a PK.

Pereira *et al.* (2017) relataram de forma similar a formação de dímero da proteína codificada pelo gene LIC10879, sendo que somente esta conformação foi susceptível à ação proteolítica e, portanto, a forma dimérica desta proteína está superficialmente exposta na leptospira. Deste modo, sugere-se que as proteínas codificadas pelo gene LIC11711 na conformação de dímero estão mais expostas na membrana externa da bactéria enquanto que o monômero é menos presente.

Por outro lado, não houve aparente degradação da DnaK (proteína citosólica) nos diferentes tempos de incubação com a enzima. Não foi possível observar bandas referentes à rLIC12587, fato que pode ser justificado pela interferência da desnaturação da proteína que impede o reconhecimento pelo anticorpo, além do baixo número de cópias da proteína na cepa.

4.10.3 Ensaio de Imunofluorescência

A técnica de imunofluorescência possibilita a detecção das proteínas nativas na superfície da leptospira por meio do reconhecimento com anticorpo específico conjugado com fluoróforo, que pode ser excitado e emite fluorescência num comprimento de onda específico.

Neste ensaio, as leptospiros foram fixadas com paraformaldeído e incubadas com antissoro produzido contra a proteína recombinante correspondente. A detecção foi feita com anticorpo anti-IgG conjugado com FITC. As células também foram tratadas com iodeto de propídio (PI), um composto fluorescente que se liga fortemente aos ácidos nucleicos, e emite fluorescência proporcionalmente à quantidade de ácidos nucleicos na célula ou amostra.

Como controles experimentais, foram utilizados o antissoro contra a LipL46, uma proteína da membrana externa de *Leptospira* (controle positivo) (Matsunaga *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2018), e animais imunizados com PBS (controle negativo).

Figura 19. Ensaio de imunofluorescência de leptospiros viáveis para a detecção das proteínas referentes aos genes LIC11711 e LIC12587 por microscopia confocal. As leptospiros foram tratadas os antissoros para rLIC11711, rLIC12587, LipL46 (controle positivo) e soro não imune (controle negativo). DNA das leptospiros foram identificadas por marcação com iodeto de propídio (PI). Para confirmação dos resultados, foi feita a co-localização sobrepondo as imagens referentes à marcação da leptospira por PI e das proteínas alvo por FITC.

Com base nos resultados ilustrados pela Figura 19, observou-se que no tratamento com antissoro anti-rLIC11711 e anti-rLIC12587 foi verificado sinal de fluorescência no comprimento de onda do verde, sugerindo que as proteínas de estudo foram marcadas com o FITC. Além disso, observou-se por meio da sobreposição de imagens da marcação com FITC e PI a presença das proteínas na leptospira.

Em relação aos controles, observa-se uma alta fluorescência referente ao FITC para a proteína de membrana externa LipL46 (controle positivo), enquanto que foi detectado somente a fluorescência do PI para o grupo imunizado com PBS (soro não imune; controle negativo).

Os resultados obtidos a partir dos ensaios de localização celular, associados às análises *in silico* por bioinformática sugerem que as proteínas codificadas pelos genes LIC11711 e LIC12587 estão localizadas na membrana externa da leptospira, e, portanto, são interessantes

para avaliação como alvos vacinais e também podem estar envolvidas na patogênese desta bactéria.

4.11 Reatividade com soros de pacientes diagnosticados com leptospirose e outras doenças não relacionadas

Para verificar se alguma das proteínas estudadas é expressa e imunogênica durante a infecção e se pode ser aplicada como marcador em um kit de diagnóstico, investigou-se a reatividade das proteínas recombinantes frente a 20 pares de soros de pacientes diagnosticados com leptospirose, sendo amostras correspondentes à fase inicial da doença com resultado MAT negativo e amostras MAT positivo quando a doença está na fase convalescente e os sintomas são mais característicos.

O MAT, ou teste de microaglutinação, é o método padrão para o diagnóstico da leptospirose (Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001). Neste ensaio, as misturas são examinadas microscopicamente para a aglutinação e os títulos são determinados (Levett, 2001; Haake e Levett, 2015).

Como se pode observar na Figura 20, para a rLIC11711 houve uma reatividade positiva com 50% dos soros MAT negativos e 40% dos soros MAT positivos, enquanto que a rLIC12587 apresentou 55% de reatividade para MAT negativo e positivo.

Figura 20. Reatividade das proteínas recombinantes com soro de pacientes diagnosticados com leptospirose e outras doenças. (A) refere-se à reatividade dos soros com a rLIC11711 (250 ng/poço) e (B) à reatividade dos soros com a rLIC12587 (250 ng/poço). A reatividade foi avaliada por meio de anticorpos IgG totais, detectados por meio de incubação com anticorpos anti-IgG humano conjugado com peroxidase (1:5000). Os valores de corte (*cutoff*), representado pela linha tracejada horizontal, foram definidos como a média somada a três desvios padrões dos valores de absorbância de 12 amostras de soros de indivíduos normais.

Estes resultados revelam que o ensaio por ELISA utilizando as proteínas recombinantes é mais eficiente para diagnosticar a leptospirose na fase inicial quando comparado ao teste de microaglutinação, padrão-ouro para o diagnóstico da doença, uma vez que apresentou maior sensibilidade de detecção para diagnóstico da doença na fase inicial quando não ocorre a soro-conversão (MAT negativo).

Além disso, praticamente não foi observado reatividade inespecífica quando foi utilizado com soros de pacientes com doenças diferentes a leptospirose, garantindo uma alta especificidade entre a sonda (proteína recombinante) e o analito alvo (anticorpo específico na amostra), com valores de 100% de especificidade entre ambas as proteínas recombinantes contra malária e doença de Chagas, 70% de especificidade entre rLIC11711 e dengue, e 90% de especificidade da rLIC12587 contra dengue e HIV.

Nosso grupo já demonstrou outras proteínas de *L. interrogans* que são potenciais candidatos para utilização como sonda para diagnóstico precoce da leptospirose com metodologia mais sensível que o MAT (Neves *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2008; Pereira *et al.*,

2017), sendo uma possibilidade viável para o desenvolvimento de um kit de diagnóstico que possa auxiliar no tratamento e levantamento de dados mais precisos sobre a quantidade de casos de leptospirose, que ainda é subnotificada.

Paralelamente, a detecção de anticorpos específicos contra as proteínas codificadas pelos genes LIC11711 e LIC12587 é um forte indício que ambas as proteínas são expressas pela leptospira durante o processo infeccioso e que possuem epítomos importantes para o reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro. Apesar de não confirmar precisamente a localização das proteínas no microrganismo, corrobora com os ensaios de localização por ELISA e imunofluorescência e confirma uma limitação específica do western blotting para visualização da LIC12587.

4.12 Adesão das proteínas recombinantes aos componentes da matriz extracelular

Ainda não se sabe por completo os mecanismos pelos quais as leptospiplas utilizam para invadir, colonizar tecidos e se disseminar pelo hospedeiro, contudo a interação de patógenos a certos componentes contribui para o sucesso dos mesmos. Na literatura existem diversos estudos que mostram a capacidade de proteínas da membrana externa da leptospira de se ligarem a estes componentes (Fernandes *et al.*, 2016).

A matriz extracelular é formada por um complexo de proteínas e glicoproteínas que são importantes para execução de diversas funções biológicas, dentre elas: a laminina, uma glicoproteína de alta massa molecular, encontrada principalmente na membrana basal na maioria das células, importante para diferenciação celular e adesão entre células (Rohde *et al.*, 1979; Timpl *et al.*, 1979); a elastina, proteína que confere elasticidade aos tecidos, sendo encontrada principalmente em vasos sanguíneos, pulmões, pele, dentre outros; e a fibronectina, que por sua vez atua como regulador de diversos processos celulares e suporte para organização tecidual (To e Midwood, 2011). A exposição da matriz extracelular por lesão ou trauma possibilita a adesão de patógenos por meio da interação das proteínas de membrana externa a estas macromoléculas e assim causar a doença (Chagnot *et al.*, 2012).

Levando em consideração o fato de que as proteínas de membrana externa desempenham função crítica na adesão a componentes da matriz extracelular e que as proteínas codificadas pelos genes LIC11711 e LIC12587 possivelmente estão expostas na superfície da leptospira, foi avaliado a capacidade das proteínas recombinantes de interagir com diversos componentes da MEC e deste modo entender quais papéis estas proteínas exercem durante a patogênese.

Para este ensaio, elastina, colágeno tipo I e IV, fibronectina celular, laminina e e-caderina foram imobilizadas em placa de ELISA, e a adesão das proteínas recombinantes foi avaliada usando antissoro policlonal produzido em camundongos. Fetuína e BSA foram usados como controle para ligações inespecíficas.

Para confirmar os resultados, foi realizado o mesmo processo experimental usando anticorpo monoclonal anti-his ao invés do antissoro policlonal, que reconhece as proteínas recombinantes por meio dos resíduos de histidina adicionados na porção N-terminal.

Figura 21. Caracterização da ligação das proteínas recombinantes com componentes da matriz extracelular por ELISA. Os componentes foram adsorvidos nos poços e incubados com 1µg por poço de (A) rLIC11711 e (B) rLIC12587. Para a detecção foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-his ou o antissoro respectivo para cada proteína recombinante. As intensidades de absorbância representam a média $\pm$ desvio padrão de uma triplicata. Para análise estatística, a ligação das proteínas recombinantes aos componentes foi avaliada por comparação com a sua ligação à fetuína e BSA por teste t-Student (* $p < 0,05$).

Como é possível observar na Figura 21, as proteínas recombinantes rLIC11711 e rLIC12587 exibiram adesão à laminina e e-caderina por ambas as proteínas recombinantes, enquanto que a rLIC11711 mostrou ligação ao colágeno IV, sendo considerado somente os componentes que apresentaram ligação estatisticamente significativa tanto para o antissoro quanto para o anti-his.

Para definir a afinidade da ligação das proteínas recombinantes a laminina, e-caderina e colágeno IV, realizou-se um ensaio de dose-resposta na qual cada componente foi imobilizado em microplaca de ELISA e incubado com concentrações crescentes das proteínas recombinantes.

Figura 22. Curvas de dose-resposta da ligação das proteínas recombinantes aos componentes da matriz extracelular. Os componentes foram imobilizados e incubados com concentrações crescentes de proteína recombinante e a detecção foi feita incubando anticorpo monoclonal anti-his (1:10000) conjugado com peroxidase e adição do substrato para esta enzima. Cada ponto da curva foi feito em triplicata e o valor foi expresso pela média $\pm$ desvio padrão. O BSA foi utilizado como controle experimental.

Pode-se observar na Figura 22 que ambas as proteínas recombinantes apresentaram ligação dose-dependente com a laminina e e-caderina, porém apenas a rLIC11711 apresentou ligação saturável com a e-caderina. Não foi possível observar um comportamento dose-dependente entre a rLIC11711 e o colágeno IV (dado não mostrado).

A interação com laminina e e-caderina foram dose dependentes não saturáveis. As interações entre a rLIC11711 e rLIC12587 com a laminina apresentaram constantes de dissociação (K_D) de 14,59 μ M e 322,45 μ M, respectivamente, e 7,41 μ M e 11,74 μ M com a e-caderina. Apesar do K_D obtido para rLIC12587, no valor de 322,45 μ M, ter sido estimado por regressão linear da equação adaptada de Michaelis-Mentem (Lin *et al.*, 2009), este valor é destoante de outras proteínas já caracterizadas (Fernandes *et al.*, 2012; Domingos *et al.*, 2015; Teixeira *et al.*, 2015) e não deve refletir a afinidade real entre a proteína e a laminina.

Outras proteínas de membrana externa previamente caracterizadas funcionalmente, como a Lsa23 (Siqueira *et al.*, 2013) e Lsa66 (Oliveira *et al.*, 2011) apresentaram uma afinidade (baseado na K_D) muito maior com a laminina, e estes valores sugerem uma baixa afinidade das proteínas recombinantes a este componente.

A ligação de proteínas de superfície de leptospira com as caderinas é mais um indício do grande leque de estratégias que o patógeno possui com objetivo de adesão nas células do hospedeiro. A e-caderina é encontrada na superfície de células epiteliais, nas junções onde existe o contato entre células, portanto tem função importante na adesão célula-célula para manutenção do tecido (Pećina-Slaus, 2003; Evangelista *et al.*, 2014). Pereira *et al.* (2017) avaliaram a interação de proteínas recombinantes denominadas Lsa16 e Lsa25.6 com a e-

caderina, porém não foi possível comparar os valores de K_D (dados não mostrados). Fazendo a comparação entre as constantes de dissociação com a laminina, supõe-se a interação com a e-caderina também apresenta baixa afinidade.

A fim de dar continuidade na caracterização das interações das proteínas aos componentes da MEC, foi avaliada a participação da porção carboidrato da laminina, que é uma glicoproteína, neste tipo de interação.

Deste modo, foi promovido a oxidação dos açúcares da laminina com a adição do metaperiodato de sódio. Este sal é capaz de oxidar os grupos hidroxil dos carboidratos sem comprometer as ligações peptídicas entre os aminoácidos da proteína.

Figura 23. Avaliação da importância da porção carboidrato da laminina na interação com as proteínas recombinantes por ELISA. A laminina foi imobilizada em placas de ELISA e incubada com concentrações crescentes de metaperiodato de sódio, capaz de oxidar os grupos hidroxila de carboidratos. As proteínas recombinantes (A) rLIC11711 e (B) rLIC12587 foram adicionadas para interação, cuja detecção foi feita incubando anticorpo monoclonal anti-his (1:10000) conjugado com peroxidase.

O efeito oxidante do metaperiodato de sódio resultou num leve aumento na interação das proteínas recombinantes à laminina oxidada. Estes resultados demonstram que a ligação não é dependente da parte glicídica da laminina, e a oxidação pode ter exposto novos sítios de ligação às proteínas recombinantes.

As interações de alta afinidade e baixa afinidade de diferentes proteínas de membrana externa da leptospira com os componentes da MEC, incluindo laminina, provavelmente possibilitam a adesão desse patógeno às células possibilitando a disseminação e colonização de órgãos.

4.13 Adesão das proteínas recombinantes aos componentes do soro humano

Uma vez aderida às células do hospedeiro por meio da interação das proteínas de membrana externa com componentes da MEC, a próxima etapa para a leptospira é superar as barreiras teciduais e chegar à corrente sanguínea, onde pode mais rapidamente atingir os órgãos alvo. Sabe-se que as cepas patogênicas de *Leptospira* apresentam grande resistência ao soro, contudo os mecanismos relacionados a esta resistência começaram a ser elucidados recentemente.

Estes patógenos desenvolveram ao longo do tempo estratégias sofisticadas para superar o sistema imune do hospedeiro, dentre eles a aquisição dos reguladores do sistema complemento. Verma *et al.* (2006) demonstraram que por meio da proteína LfhA (também conhecida por LenA), as leptospirosas patogênicas se ligam ao fator H. Outras proteínas de membrana externa foram caracterizadas como ligantes de C4pb, regulador da via clássica do sistema complemento (Barbosa *et al.*, 2010; Castiblanco-Valencia *et al.*, 2012; Domingos *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2012). Como consequência da menor disponibilidade destes reguladores no soro, a ativação do sistema complemento é comprometida, possibilitando a permanência do patógeno dentro do hospedeiro (Blom, 2002).

Um mecanismo muito interessante utilizado por diversos patógenos para superar barreiras celulares e sistema imune é a obtenção de enzimas de atividade proteolítica, como a plasmina. A plasmina é uma serino-protease muito importante para o equilíbrio do sistema fibrinolítico, degradando coágulos de fibrina, e que tem o zimógeno plasminogênio (Coleman *et al.*, 1999). Este mecanismo proteolítico também é utilizado pela *L. interrogans*, e foi primeiramente demonstrado por nosso grupo (Vieira *et al.*, 2009; Vieira *et al.*, 2012), e desde então outras proteínas já foram caracterizadas como ligantes de plasminogênio/plasmina (Vieira *et al.*, 2010; Mendes *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2011; Fernandes *et al.*, 2012; Domingos *et al.*, 2015).

O fibrinogênio também faz parte do sistema fibrinolítico, apresentando papel importante na coagulação. Alguns receptores de fibrinogênio já foram identificados em espécies patogênicas de *Leptospira* (Pinne *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2013; Fernandes *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2016).

Neste contexto, também foi avaliada a capacidade das proteínas recombinantes rLIC11711 e rLIC12587 de interagirem com diversos componentes presentes no soro humano.

Foi observado uma interação estatisticamente significativa com o plasminogênio, fibrinogênio e fibronectina plasmática, esta última somente para rLIC11711, enquanto que os controles negativos fetuína e BSA apresentaram valores basais de absorvância. A adesão das proteínas recombinantes aos componentes do soro foi confirmada por meio da utilização do anticorpo monoclonal anti-his (Figura 24).

Figura 24. Caracterização da ligação das proteínas rLIC11711 e rLIC12587 com componentes do plasma por ELISA. Os componentes foram adsorvidos nos poços e incubados com 1µg por poço de proteína recombinante. Para a detecção foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-His ou o antissoro respectivo para cada proteína recombinante. As intensidades de absorvância representam a média $\pm$ desvio padrão de uma triplicata. Para análise estatística, a ligação das proteínas recombinantes aos componentes foi avaliada por comparação com a sua ligação à fetuína e BSA por teste t-Student (* $p < 0,05$).

As interações das proteínas recombinantes com os componentes do soro também foram avaliadas de forma quantitativa por dose-dependência. Todas as interações foram dose-dependentes de forma significativa.

Pode-se observar na Figura 25 que a rLIC11711 apresentou ligação dose-dependente saturável ($K_D = 0,257 \mu M$) e rLIC12587 ligação dose-dependente não saturável com plasminogênio ($K_D = 1,477 \mu M$). Avaliando a intensidade da absorvância e a constante de dissociação (K_D), a rLIC11711 apresenta maior afinidade ao plasminogênio em relação a rLIC12587. A afinidade da ligação entre a rLIC11711 ao plasminogênio foi similar a porina OmpL1 ($K_D = 0,3686 \mu M$) (Fernandes et al., 2012). A interação das proteínas recombinantes com o fibrinogênio apresentou menor afinidade, com valores de $1,9383 \mu M$ (rLIC11711) e $1,784 \mu M$ (rLIC12587).

Deste modo, pode-se afirmar que ambas as proteínas recombinantes interagiram com os componentes do soro *in vitro* de forma dose-dependente, sugerindo que estas ligações possam ocorrer na bactéria patogênica.

Figura 25. Curvas de dose-resposta da ligação das proteínas recombinantes aos componentes do soro humano. Os componentes foram imobilizados e incubados com concentrações crescentes de proteína recombinante e a detecção foi feita incubando anticorpo monoclonal anti-his (1:10000) conjugado com peroxidase e adição do substrato para esta enzima. Cada ponto da curva foi feito em triplicata e o valor foi expresso pela média $\pm$ desvio padrão. O BSA foi utilizado como controle experimental.

O fibrinogênio é a principal proteína envolvida na coagulação sanguínea e trombose. A ativação da protrombina em trombina pela cascata de coagulação converte o fibrinogênio em monômeros de fibrina, que por sua vez se aglomeram e formam o coágulo insolúvel, que por sua vez impede a hemorragia (Doolittle, 1984).

As leptospiros são capazes de se ligarem ao fibrinogênio circulante por meio de suas proteínas na superfície externa e desta forma inibir a formação dos coágulos de fibrina (Oliveira *et al.*, 2013). Este desbalanço no sistema fibrinolítico tem como consequência um aumento de hemorragias, que favorece a disseminação das leptospiros no hospedeiro (Lin *et al.*, 2011; Fernandes *et al.*, 2016).

Neste sentido, foi avaliada a capacidade das proteínas recombinantes de se ligarem ao fibrinogênio e desta forma inibir a formação do coágulo de fibrina. Proteínas recombinantes incubadas com o fibrinogênio foram adsorvidas em placas de ELISA e foi adicionado a trombina para estimular a formação do coágulo de fibrina, sendo monitorado a absorbância a cada 2 minutos durante 1 hora (Figura 26).

Apesar da ligação dose-dependente das proteínas recombinantes com o fibrinogênio, não foi possível observar o efeito de redução da formação do coágulo de fibrina *in vitro*.

Algumas proteínas de *L. interrogans* já foram caracterizadas como receptores de fibrinogênio e a menor disponibilidade de fibrinogênio reduziu consideravelmente a produção de coágulo (Lin *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2013; Fernandes *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2017). Apesar dos resultados negativos obtidos na inibição a formação do coágulo, pode-se pressupor que a leptospira patogênica, por meio de outras proteínas de membrana externa, desfrute desta estratégia para facilitar a disseminação no hospedeiro. Além disso, este mecanismo é uma possível explicação para os casos mais graves de leptospirose na qual o paciente desenvolve a síndrome pulmonar hemorrágica.

Figura 26. Avaliação do efeito inibitório da formação do coágulo de fibrina pelas proteínas recombinantes. As proteínas recombinantes foram incubadas com fibrinogênio e em seguida a mistura foi adsorvida em poços de placa de ELISA. Adicionou-se trombina para a formação do coágulo, e a absorbância (DO= 595 nm) foi monitorada com intervalos de 2 minutos por 1 hora.

A ligação de proteínas da membrana externa de bactérias ao plasminogênio é conhecida na literatura e também é um importante mecanismo que a leptospira utiliza no processo de disseminação por entre os tecidos do hospedeiro (Vieira *et al.*, 2009). A rLIC11711 e rLIC12587 apresentaram ligação ao plasminogênio, e provavelmente estão relacionadas à patogênese deste microrganismo. Desta forma, esta interação foi caracterizada mais detalhadamente.

Baseado no ensaio de conformação estrutural das proteínas recombinantes, duas unidades da rLIC11711 se unem formando um dímero com o dobro da massa molecular

predita inicialmente, enquanto que a rLIC12587 tende a formar oligômeros pela ligação de várias unidades monoméricas de 23,98 kDa. Portanto, avaliou-se se as conformações estruturais das proteínas expressas são necessárias para a ligação ao plasminogênio (Figura 27A e B). Pode-se observar a presença de uma banda em aproximadamente 45 kDa referente ao dímero da rLIC11711, enquanto que no ensaio onde a proteína recombinante foi desnaturada (Figura 27B, linha 1) não há aparente interação com o plasminogênio. Curiosamente, uma banda de fraca intensidade de aproximadamente 66 kDa é vista em B, na qual pode ser uma reação não específica do soro anti-rLIC11711 com o BSA.

Em relação a rLIC12587, não foi possível detectar bandas que mostrem a interação desta proteína com o plasminogênio. Uma hipótese para este resultado é devido à alta massa molecular dos oligômeros que provavelmente não foram completamente eletrotransferidos à membrana de nitrocelulose. Diferentemente da rLIC11711 que apresenta apenas dois estados estruturais, a variedade das estruturas associado a baixa eficiência na transferência dificulta a interação do antissoro com uma quantidade reduzida de proteína recombinante, e deste modo não foi possível detectar nenhuma ligação ao plasminogênio.

Figura 27. Ensaio de interação das proteínas recombinantes ao plasminogênio por western blotting. (A) Proteínas recombinantes não desnaturadas foram transferidas e incubadas com plasminogênio. A detecção foi realizada incubando a membrana com anticorpo anti-plasminogênio seguido pelo anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase: 1- rLIC11711; 3- rLIC12587; 2 e 4- BSA. (B) proteínas recombinantes não tratadas e desnaturadas foram transferidas e incubadas com plasminogênio. A detecção foi realizada incubando a membrana com anticorpo anti-plasminogênio seguido pelo anticorpo anti-mouse conjugado com peroxidase: 1- rLIC11711 desnaturada; 2- rLIC11711 não desnaturada; 3- rLIC12587 desnaturada; 4- rLIC12587 não desnaturada. (C) Plasminogênio foi transferido para membrana após SDS-PAGE e incubado com as proteínas recombinantes. A detecção foi realizada incubando a membrana com anticorpo anti-His conjugado com peroxidase: 1- PLG+rLIC11711; 2-BSA+rLIC11711; 3-PLG+rLIC12587; 4-BSA+rLIC12587.

Na Figura 27C, o plasminogênio eletrotransferido foi incubado com as proteínas recombinantes, seguido pela detecção usando anticorpo anti-his conjugado com peroxidase. Observa-se banda de aproximadamente 90 kDa referente ao plasminogênio (Lähteenmäki, Kuusela, *et al.*, 2001) na coluna 1 (incubação com rLIC11711) e na coluna 3 (incubação com rLIC12587) mais fracamente.

Estes ensaios comprovam que ambas as proteínas de fato interagem com o plasminogênio, e a rLIC11711 apresenta uma afinidade superior a este componente em comparação a rLIC12587, sendo observado interação com este último apenas com anticorpo anti-His. Estes dados suportam os resultados observados nos ensaios de dose-resposta.

Sabe-se que os domínios *kringle* do plasminogênio medeiam a interação com os resíduos de lisina em proteínas de diversas bactérias (Lähteenmäki, Kuusela, *et al.*, 2001). Estes domínios também são necessários para a ligação do plasminogênio com a *L. interrogans* sorovar Copenhageni, como demonstrado por Vieira e colaboradores (2009). Neste ensaio foi utilizado o ácido 6-aminocaproico (ACA), um derivado e análogo do aminoácido lisina, que atua como inibidor de enzimas que se ligam particularmente a este resíduo.

Com base nestes dados, verificou-se a importância dos resíduos de lisina das proteínas recombinantes na ligação ao plasminogênio via domínios *kringle*.

Figura 28. Avaliação da ligação das proteínas recombinantes ao plasminogênio via resíduos de lisina por ELISA. Plasminogênio (1µg/µL) foi imobilizado e foram adicionadas as proteínas recombinantes co-incubadas com ácido aminocaproico (ACA) com concentrações de 2 mM e 20 mM. A detecção da ligação das proteínas recombinantes ao plasminogênio foi feita por meio da incubação com anticorpo monoclonal anti-His (1:10000) conjugado com peroxidase. Para a apresentação dos dados foi utilizado a média $\pm$ desvio padrão dos dados realizados em triplicata considerando 0 mM ACA como 100% de ligação. A significância da redução foi feita por teste t-Student em comparação com o ponto 0 mM ACA (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

A Figura 28 demonstra que a interação do plasminogênio com as proteínas recombinantes é praticamente inibida por completo na presença do ACA numa concentração de 2 mM, na qual houve decaimento de ligação de 96,04% para a rLIC11711 e 84,7% para a rLIC12587, enquanto que em 20 mM a redução foi de 97,09% e 86,41%, respectivamente. Ao analisar a quantidade de resíduos de lisina nas duas proteínas em questão, observou-se que a rLIC11711 contém 18 resíduos (9% do total) e a rLIC12587 possui 22 resíduos (10,6%), e por este motivo ambas as proteínas apresentam uma forte ligação ao plasminogênio e a interação decai rapidamente na presença do competidor ACA.

Pode-se concluir que os resíduos de lisina nas proteínas recombinantes são necessários para a ligação ao plasminogênio, resultado que corrobora com outros trabalhos da literatura (Vieira *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2017).

Plasminogênio é uma glicoproteína produzida no fígado encontrada circulante no plasma humano como zimógeno (Sanderson-Smith *et al.*, 2012). A conversão do plasminogênio em sua forma enzimaticamente ativa, a plasmina, necessita de ativadores específicos que são circulantes na corrente sanguínea, os ativadores de plasminogênio do tipo tecidual (tPA) ou tipo uroquinase (uPA) (Lähteenmäki, Kukkonen, *et al.*, 2001; Lähteenmäki, Kuusela, *et al.*, 2001). A principal função da plasmina é a degradação da fibrina, conhecida como fibrinólise, importante na coagulação sanguínea e reparo de tecidos lesionados (Law *et al.*, 2012). Por ser uma serino-protease de amplo espectro de ação, a plasmina também degrada várias proteínas da matriz extracelular, como por exemplo a laminina.

Algumas proteínas estudadas pelo grupo foram capazes de se ligar ao plasminogênio e este ser convertido na forma ativa plasmina após adição de um ativador (Vieira *et al.*, 2010; Mendes *et al.*, 2011; Domingos *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2012). Realizou-se então um ensaio por ELISA com o intuito de verificar se o mesmo ocorre com a rLIC11711 e rLIC12587.

As proteínas recombinantes foram adsorvidas na placa de ELISA e incubadas com o plasminogênio. Em seguida, adicionou-se a uPA e o substrato cromogênico específico para mensurar a atividade da plasmina indiretamente. O mesmo foi realizado utilizando uma solução com 30% de soro humano (v/v), simulando *in vitro* a mecânica PLG/PLA mais próxima do real.

Figura 29. Avaliação da atividade proteolítica do plasminogênio/plasmina ligado as proteínas recombinantes por ELISA. (A) as proteínas recombinantes (1mg/mL) foram imobilizadas e incubadas os tratamentos: PLG+uPa+substrato, uPa+substrato, PLG+substrato e PLG+uPa. (B) as proteínas recombinantes (1 µg/µL) foram imobilizadas e incubadas os tratamentos soro humano+uPa+substrato; uPa+substrato; soro humano+substrato e soro humano+uPa. Cada ponto foi realizado em triplicata e os valores de absorbância utilizados foram calculados a partir da média $\pm$ desvio padrão. Para as análises estatísticas, os tratamentos foram comparados com o sistema completo favorável a conversão do plasminogênio em plasmina e avaliados pelo teste t-Student (* $p < 0,01$).

Os resultados obtidos indicam que o plasminogênio se ligou as proteínas recombinantes adsorvidas, e foram convertidas na forma ativa plasmina via uPA, enquanto que os controles da reação onde um dos componentes foi omitido, não apresentaram atividade enzimática. Somente para a rLIC11711 o resultado foi semelhante quando utilizando soro humano comercial substituindo o plasminogênio purificado.

Esta habilidade da leptospira de capturar o plasminogênio circulante no sangue por meio da ligação em suas proteínas externas, e utilizar os ativadores de plasminogênio do próprio hospedeiro para converter o plasminogênio em plasmina, torna a leptospira em um microrganismo proteolítico que degrada componentes da matriz extracelular, auxilia na evasão do sistema imune, penetração tecidual e invasão (Vieira *et al.*, 2010; Vieira *et al.*, 2012; Fraga *et al.*, 2016).

4.14 Caracterização da ligação das proteínas recombinantes aos componentes da via terminal do sistema complemento

O sistema complemento é uma das mais importantes linhas de defesa imune humana. Mais de 15 proteínas plasmáticas fazem parte do sistema complemento (incluindo seus ativadores), que atuam como cascata que possibilita a produção de resposta inflamatória,

quimiotaxia de leucócitos, opsonização e morte celular do patógeno por meio da formação de um complexo de ataque à membrana (Hallström *et al.*, 2013; Zipfel *et al.*, 2013).

Existem trabalhos na literatura que convergem em relação à evasão do sistema de complemento e inibição da formação do complexo de ataque à membrana por espiroquetas virulentas, uma vez que apenas estas são capazes de sobreviver à atividade bactericida do soro humano (Hallström *et al.*, 2013; Hammerschmidt *et al.*, 2016; Barbosa e Isaac, 2017; Stone e Brissette, 2017). Já foi demonstrado que a ligação das proteínas da espiroqueta *Borrelia* a vários componentes da via terminal afeta a formação de do complexo de ataque a membrana por meio da inibição da polimerização de C9, e prevenção da integração do complexo funcional de formação de poros (Hammerschmidt *et al.*, 2016).

A vitronectina é uma glicoproteína de múltiplas funções no organismo. É sintetizada no fígado. Pode ser encontrada circulante na corrente sanguínea como um monômero (65-75 kDa), desempenhando papel importante na regulação da coagulação e fibrinólise (Preissner, 1989) e da via terminal do sistema complemento por meio da inibição da formação do complexo C5b7 e polimerização dos monômeros de C9 (Sheehan *et al.*, 1995; Da Silva *et al.*, 2015). Também pode ser encontrada na matriz extracelular na forma de multímero, onde interage com vários componentes macromoleculares, incluindo glicosaminoglicanos e colágenos (Stockmann *et al.*, 1993).

Neste sentido, foi avaliado se as proteínas rLIC11711 e rLIC12587 também se ligam aos componentes da via terminal do sistema complemento (Figura 30).

Figura 30. Caracterização da ligação das proteínas (A) rLIC11711 e (B) rLIC12587 com componentes do sistema complemento por ELISA. Os componentes foram adsorvidos nos poços e incubados com 1µg por poço de proteína recombinante. Para a detecção foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-His ou o antissoro respectivo para cada proteína recombinante. As intensidades de absorbância representam a média $\pm$ desvio padrão de uma triplicata. Para análise estatística, a ligação das proteínas recombinantes aos componentes foi avaliada por comparação com a sua ligação à fetuina e BSA por teste t-Student (* $p < 0,05$).

As duas proteínas recombinantes foram capazes de se ligar à vitronectina e C8, enquanto que somente a rLIC12587 foi capaz de se ligar de forma estatisticamente significativa as moléculas C7 e C9.

As moléculas de C7, C8 e C9 fazem parte da via terminal do sistema complemento, na qual as três vias de ativação (clássica, alternativa e das lectinas) convergem para a polimerização de C9 e formação do complexo de ataque a membrana (Frank, 1989).

A ligação das proteínas recombinantes a estes componentes *in vivo* sugere que a leptospira patogênica, por meio das proteínas nativas, e outras proteínas já descritas, é capaz de sequestrar os componentes e deste modo provocar um desequilíbrio na cascata de ativação que, associado à ligação à vitronectina, impede a formação do complexo lítico de membrana e consequentemente a lise celular, garantindo assim o sucesso do patógeno em se disseminar no hospedeiro.

Para definir a afinidade da ligação das proteínas recombinantes aos componentes do sistema complemento, foi realizado um ensaio de dose-resposta (Figura 31).

Figura 31. Curvas de dose-resposta de ligação das proteínas rLIC11711 e rLIC12587 aos componentes do sistema complemento por ELISA. Os componentes foram imobilizados e incubados com concentrações crescentes de proteína recombinante e a detecção foi feita incubando anticorpo monoclonal anti-his (1:10000) conjugado com peroxidase e adição do substrato para esta enzima. Cada ponto da curva foi feito em triplicata e o valor foi expresso pela média $\pm$ desvio padrão. O BSA foi utilizado como controle experimental.

As proteínas recombinantes apresentaram padrões de ligação dose-dependentes com os componentes do sistema complemento. Destes, pode-se destacar a rLIC12587, que apresentou afinidade com C8 ($K_D = 0,497 \mu M$) e C9 ($K_D = 0,652 \mu M$). Em termos comparativos, a proteína Lsa23 apresentou alta afinidade com C8 ($K_D = 65.59 \text{ nM}$), contudo uma baixa afinidade com C9 ($K_D = 698.50 \text{ nM}$) (Siqueira et al., 2017), ou seja, a mesma proteína pode interagir em níveis diferentes com componentes pertencentes à mesma cascata de sinalização, neste caso a via terminal do sistema complemento. Estes resultados sugerem que as duas proteínas, principalmente a codificada pelo gene LIC12587, são potenciais candidatos para mediar a interação de leptospiros patogênicos com o sistema complemento, e deste modo inibir a ação do mesmo.

A vitronectina é importante por desempenhar diferentes funções no organismo humano. Esta glicoproteína apresenta em sua porção carboxil-terminal um domínio de ligação a heparina (HBD, do inglês *Heparin-Binding Domain*) composto por aproximadamente 40 aminoácidos em sua maioria básicos (Preissner, 1991).

Baseado no fato de que as proteínas recombinantes rLIC11711 e rLIC12587 se ligaram a vitronectina, foi analisado se esta ligação ocorre no HBD. A vitronectina foi imobilizada em placa de ELISA e foi incubada com as proteínas recombinantes e concentrações crescentes de heparina, utilizado como competidor pelo domínio HBD.

Figura 32. Avaliação da importância do domínio HBD para a interação das proteínas recombinantes com a vitronectina. A vitronectina foi imobilizada e incubada com a proteína recombinante e quantidades crescentes de heparina, que atua como competidor neste experimento. A detecção da ligação foi feita incubando anticorpo anti-his conjugado com peroxidase.

A Figura 32 mostra uma redução da ligação das proteínas recombinantes com a vitronectina diretamente relacionada à concentração de heparina. Houve uma redução de aproximadamente 40% para rLIC11711 e 10% para rLIC12587 quando foi usado 10 $\mu\text{g/poço}$ de heparina, e a redução foi expressiva, 54% e 51%, respectivamente, com 100 $\mu\text{g/poço}$ de heparina. Deste modo, os resultados sugerem que ambas as proteínas recombinantes interagiram com a vitronectina via domínio HBD *in vitro*.

Um mecanismo utilizado por alguns agentes patogênicos para superar os efeitos líticos do sistema complemento é capturar as proteínas da via terminal, evitando diretamente a montagem do complexo de ataque à membrana. Neste sentido, foi avaliada *in vitro* a capacidade das proteínas recombinantes de capturarem estes componentes do complemento do soro humano.

As proteínas recombinantes foram imobilizadas em placas de ELISA e então incubadas com solução de soro humano normal (5%, 10% e 20%), e a ligação foi detectada usando anticorpo específico contra os componentes (figura 33).

Figura 33. Obtenção dos componentes do sistema complemento provenientes de soro humano normal pelas proteínas recombinantes. As proteínas recombinantes foram imobilizadas e incubadas com diferentes concentrações do soro humano normal. A interação com os componentes do complemento foi avaliada pela adição de anticorpo específico contra o componente e anticorpo secundário conjugado com peroxidase.

Pode-se observar um aumento significativo dos valores de absorvância de todos os componentes, ou seja, o aumento na quantidade de soro humano disponível possibilitou as proteínas recombinantes de capturarem maiores quantidades dos componentes da via terminal do sistema complemento.

Os resultados sugerem que as proteínas recombinantes, principalmente a rLIC12587, são capazes de capturar os componentes terminais do complemento provenientes do soro humano *in vitro*, e provavelmente as proteínas nativas também apresentam a mesma capacidade de interação. Siqueira *et al.* (2017) demonstraram que a proteína Lsa23 também é capaz de ligar aos componentes C7, C8 e C9 do sistema complemento, e neste caso foi possível mensurar a redução da formação do complexo de ataque à membrana o que sugere uma maior resistência da leptospira patogênica à lise por meio desta proteína. Este resultado é forçado pelo fato de que as leptospirosas patogênicas são mais resistentes ao soro humano quando comparado com as cepas saprofíticas, não resistem uma vez dentro do hospedeiro e, portanto, não provocam a leptospirose.

Deste modo, os resultados obtidos principalmente para a rLIC12487 sugerem que a mesma pode ter papel na inibição da formação do complexo de ataque a membrana similar à Lsa23, apesar de não ter sido possível obter resultados experimentais, garantindo assim a evasão e maior resistência por parte da leptospira patogênica frente ao sistema imune do hospedeiro.

5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados experimentais obtidos pode-se concluir que proteínas codificadas pelos genes LIC11711 e LIC12587 de *L. interrogans* sorovar Copenhageni provavelmente são expressas e exportadas para a superfície da bactéria, e funcionalmente desempenham papéis múltiplos nas etapas de adesão, disseminação e colonização, e deste modo auxiliam o patógeno no processo infeccioso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ADLER, B. Vaccines against leptospirosis. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 387, p. 251-72, 2015.

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Vet Microbiol**, v. 140, n. 3-4, p. 287-96, Jan 2010.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, v. 215, n. 3, p. 403-10, Oct 1990.

APPASSAKIJ, H. et al. Evaluation of the immunofluorescent antibody test for the diagnosis of human leptospirosis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 52, n. 4, p. 340-3, Apr 1995.

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, Apr 2008.

ATZINGEN, M. V. et al. Evaluation of immunoprotective activity of six leptospiral proteins in the hamster model of leptospirosis. **Open Microbiol J**, v. 6, p. 79-87, 2012.

BALLARD, S. A. et al. Molecular analysis of the dnaK locus of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **Gene**, v. 216, n. 1, p. 21-9, Aug 1998.

BARBOSA, A. S. et al. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. **Infect Immun**, v. 74, n. 11, p. 6356-64, Nov 2006.

BARBOSA, A. S.; ISAAC, L. Complement Immune Evasion by Spirochetes. **Curr Top Microbiol Immunol**, Sep 2017.

BARBOSA, A. S. et al. Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of *Leptospira* spp. that binds the human complement regulator C4BP. **Infect Immun**, v. 78, n. 7, p. 3207-16, Jul 2010.

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, Jul 1997.

BHARTI, A. R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect Dis**, v. 3, n. 12, p. 757-71, Dec 2003.

BLOM, A. M. Structural and functional studies of complement inhibitor C4b-binding protein. **Biochem Soc Trans**, v. 30, n. Pt 6, p. 978-82, Nov 2002.

BOURHY, P. et al. *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic species of the genus *Leptospira* isolated from humans. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 64, n. Pt 12, p. 4061-7, Dec 2014.

BRANDÃO, A. P. et al. Macroscopic agglutination test for rapid diagnosis of human leptospirosis. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 11, p. 3138-42, Nov 1998.

BRENNER, D. J. et al. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. **Int J Syst Bacteriol**, v. 49 Pt 2, p. 839-58, Apr 1999.

BROWN, R. A. et al. Comparison of three different leptospiral vaccines for induction of a type 1 immune response to *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. **Vaccine**, v. 21, n. 27-30, p. 4448-58, Oct 2003.

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, Sep 2006.

CAO, Y. et al. Evaluation of novel fusion proteins derived from extracellular matrix binding domains of LigB as vaccine candidates against leptospirosis in a hamster model. **Vaccine**, v. 29, n. 43, p. 7379-86, Oct 2011.

CASTELLINO, F. J.; MCCANCE, S. G. The kringle domains of human plasminogen. **Ciba Found Symp**, v. 212, p. 46-60; discussion 60-5, 1997.

CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M. et al. Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with human complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. **J Infect Dis**, v. 205, n. 6, p. 995-1004, Mar 2012.

CHAGNOT, C. et al. Bacterial adhesion to animal tissues: protein determinants for recognition of extracellular matrix components. **Cell Microbiol**, v. 14, n. 11, p. 1687-96, Nov 2012.

CHALAYON, P. et al. Leptospirosis serodiagnosis by ELISA based on recombinant outer membrane protein. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 105, n. 5, p. 289-97, May 2011.

CHARAN, J. et al. Antibiotics for the treatment of leptospirosis: systematic review and meta-analysis of controlled trials. **Int J Prev Med**, v. 4, n. 5, p. 501-10, May 2013.

CHASSIN, C. et al. TLR4- and TLR2-mediated B cell responses control the clearance of the bacterial pathogen, *Leptospira interrogans*. **J Immunol**, v. 183, n. 4, p. 2669-77, Aug 2009.

CHENG, J.; QIN, J.; XIE, G. [Epidemiological observation on effect of Leptospiral outer membrane vaccine]. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi**, v. 22, n. 2, p. 108-10, Apr 2001.

CHIRATHAWORN, C. et al. Interpretation of microscopic agglutination test for leptospirosis diagnosis and seroprevalence. **Asian Pac J Trop Biomed**, v. 4, n. Suppl 1, p. S162-4, May 2014.

CHOU, L. F. et al. Sequence of *Leptospira santarosai* serovar Shermani genome and prediction of virulence-associated genes. **Gene**, v. 511, n. 2, p. 364-70, Dec 2012.

CHOU, P. Y.; FASMAN, G. D. Prediction of protein conformation. **Biochemistry**, v. 13, n. 2, p. 222-45, Jan 1974.

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

COLEMAN, J. L.; ROEMER, E. J.; BENACH, J. L. Plasmin-coated borrelia Burgdorferi degrades soluble and insoluble components of the mammalian extracellular matrix. **Infect Immun**, v. 67, n. 8, p. 3929-36, Aug 1999.

COSTA, F. et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 9, p. e0003898, 2015.

CRUZ, L. S.; VARGAS, R.; LOPES, A. A. Leptospirosis: a worldwide resurgent zoonosis and important cause of acute renal failure and death in developing nations. **Ethn Dis**, v. 19, n. 1 Suppl 1, p. S1-37-41, 2009.

CULLEN, P. A.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. **FEMS Microbiol Rev**, v. 28, n. 3, p. 291-318, Jun 2004.

CULLEN, P. A. et al. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. **Infect Immun**, v. 71, n. 5, p. 2414-21, May 2003.

DA SILVA, L. B. et al. Pathogenic *Leptospira* species acquire factor H and vitronectin via the surface protein LcpA. **Infect Immun**, v. 83, n. 3, p. 888-97, Mar 2015.

DELLAGOSTIN, O. A. et al. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Hum Vaccin**, v. 7, n. 11, p. 1215-24, Nov 2011.

DELLAGOSTIN, O. A. et al. Reverse Vaccinology: An Approach for Identifying Leptospiral Vaccine Candidates. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 1, Jan 2017.

DESAI, S. et al. Resurgence of field fever in a temperate country: an epidemic of leptospirosis among seasonal strawberry harvesters in Germany in 2007. **Clin Infect Dis**, v. 48, n. 6, p. 691-7, Mar 2009.

DOMINGOS, R. F. et al. Novel *Leptospira interrogans* protein Lsa32 is expressed during infection and binds laminin and plasminogen. **Microbiology**, v. 161, n. Pt 4, p. 851-64, Apr 2015.

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

DONATI, C.; RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology in the 21st century: improvements over the original design. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1285, p. 115-32, May 2013.

DONG, H. et al. Characterization of the ompL1 gene of pathogenic *Leptospira* species in China and cross-immunogenicity of the OmpL1 protein. **BMC Microbiol**, v. 8, p. 223, Dec 2008.

DOOLITTLE, R. F. Fibrinogen and fibrin. **Annu Rev Biochem**, v. 53, p. 195-229, 1984.

EBELING, W. et al. Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. **Eur J Biochem**, v. 47, n. 1, p. 91-7, Aug 1974.

ELLINGHAUSEN, H. C.; MCCULLOUGH, W. G. Nutrition of *leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. **Am J Vet Res**, v. 26, p. 45-51, Jan 1965.

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

EVANGELISTA, K. V. et al. Identification of cell-binding adhesins of *Leptospira interrogans*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 10, p. e3215, Oct 2014.

FAINE, S. et al. **Leptospira and Leptospirosis**. MediSci, 2 Ed., p. 272, 1999

FAISAL, S. M. et al. Evaluation of protective immunity of *Leptospira* immunoglobulin like protein A (LigA) DNA vaccine against challenge in hamsters. **Vaccine**, v. 26, n. 2, p. 277-87, Jan 2008.

FERNANDES, L. G. et al. *Leptospira interrogans* reduces fibrin clot formation by modulating human thrombin activity via exosite I. **Pathog Dis**, v. 73, n. 4, Jun 2015.

FERNANDES, L. G. et al. *Leptospira* spp.: Novel insights into host-pathogen interactions. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 176, p. 50-7, Aug 2016.

FERNANDES, L. G. et al. Immune response and protective profile elicited by a multi-epitope chimeric protein derived from *Leptospira interrogans*. **Int J Infect Dis**, v. 57, p. 61-69, Feb 2017.

FERNANDES, L. G. et al. Functional and immunological evaluation of two novel proteins of *Leptospira* spp. **Microbiology**, v. 160, n. Pt 1, p. 149-64, Jan 2014.

FERNANDES, L. G. et al. OmpL1 is an extracellular matrix- and plasminogen-interacting protein of *Leptospira* spp. **Infect Immun**, v. 80, n. 10, p. 3679-92, Oct 2012.

FORBES, A. E. et al. Leptospirosis and Weil's disease in the UK. **QJM**, v. 105, n. 12, p. 1151-62, Dec 2012.

FRAGA, T. R.; ISAAC, L.; BARBOSA, A. S. Complement Evasion by Pathogenic *Leptospira*. **Front Immunol**, v. 7, p. 623, 2016.

FRANK, M. M. Complement: a brief review. **J Allergy Clin Immunol**, v. 84, n. 4 Pt 1, p. 411-20, Oct 1989.

FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **J Cell Sci**, v. 123, n. Pt 24, p. 4195-200, Dec 2010.

GASTEIGER, E. et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: WALKER, J. M. (Ed.). **The Proteomics Protocols Handbook**. Humana Press, v. 1, p.571-607, 2005.

GOUVEIA, E. L. et al. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 14, n. 3, p. 505-8, Mar 2008.

GRUBER, A.; ZINGALES, B. Alternative method to remove antibacterial antibodies from antisera used for screening of expression libraries. **Biotechniques**, v. 19, n. 1, p. 28, 30, Jul 1995.

GUERREIRO, H. et al. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. **Infect Immun**, v. 69, n. 8, p. 4958-68, Aug 2001.

HAAKE, D. A. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. **Microbiology**, v. 146 (Pt 7), p. 1491-504, Jul 2000.

HAAKE, D. A.; LEVETT, P. N. Leptospirosis in humans. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 387, p. 65-97, 2015.

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. **Infect Immun**, v. 70, n. 9, p. 4936-45, Sep 2002.

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. Leptospira: a spirochaete with a hybrid outer membrane. **Mol Microbiol**, v. 77, n. 4, p. 805-14, Aug 2010.

HAAKE, D. A. et al. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. **Infect Immun**, v. 67, n. 12, p. 6572-82, Dec 1999.

HALLSTRÖM, T. et al. CspA from *Borrelia burgdorferi* inhibits the terminal complement pathway. **MBio**, v. 4, n. 4, Aug 2013.

HAMMERSCHMIDT, C. et al. BGA66 and BGA71 facilitate complement resistance of *Borrelia bavariensis* by inhibiting assembly of the membrane attack complex. **Mol Microbiol**, v. 99, n. 2, p. 407-24, Jan 2016.

HOCHULI, E. et al. Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent. **Bio/Technology**. v. 6: p. 1321-1325, 1988.

HOLZWARTH, G.; DOTY, P. The ultraviolet circular dichroism of polypeptides. **J Am Chem Soc**, v. 87, p. 218-28, Jan 1965.

HONG, P.; KOZA, S.; BOUVIER, E. S. Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and their Aggregates. **J Liq Chromatogr Relat Technol**, v. 35, n. 20, p. 2923-2950, Nov 2012.

HOOKEY, J. V. Detection of Leptospiraceae by amplification of 16S ribosomal DNA. **FEMS Microbiol Lett**, v. 69, n. 3, p. 267-74, Jan 1992.

JONES, D. T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. **J Mol Biol**, v. 292, n. 2, p. 195-202, Sep 1999.

JOST, B. H. et al. A monoclonal antibody reacting with a determinant on leptospiral lipopolysaccharide protects guinea pigs against leptospirosis. **J Med Microbiol**, v. 22, n. 3, p. 269-75, Nov 1986.

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

JUNCKER, A. S. et al. Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. **Protein Sci**, v. 12, n. 8, p. 1652-62, Aug 2003.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochim Biophys Acta**, v. 1751, n. 2, p. 119-39, Aug 2005.

KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nat Rev Microbiol**, v. 7, n. 10, p. 736-47, Oct 2009.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospirosis vaccines: past, present, and future. **J Postgrad Med**, v. 51, n. 3, p. 210-4, 2005 Jul-Sep 2005.

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, Apr 2007.

LAW, R. H. et al. The X-ray crystal structure of full-length human plasminogen. **Cell Rep**, v. 1, n. 3, p. 185-90, Mar 2012.

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

LI, C. et al. Spirochete periplasmic flagella and motility. **J Mol Microbiol Biotechnol**, v. 2, n. 4, p. 345-54, Oct 2000.

LIMMATHUROTSAKUL, D. et al. Fool's gold: Why imperfect reference tests are undermining the evaluation of novel diagnostics: a reevaluation of 5 diagnostic tests for leptospirosis. **Clin Infect Dis**, v. 55, n. 3, p. 322-31, Aug 2012.

LIN, X. et al. Characterization of conserved combined T and B cell epitopes in *Leptospira interrogans* major outer membrane proteins OmpL1 and LipL41. **BMC Microbiol**, v. 11, n. 1, p. 21, Jan 2011.

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, Jul 2009.

LIU, D. et al. PCR detection of pathogenic *Leptospira* genomospecies targeting putative transcriptional regulator genes. **Can J Microbiol**, v. 52, n. 3, p. 272-7, Mar 2006.

LJUNGH, A.; MORAN, A. P.; WADSTRÖM, T. Interactions of bacterial adhesins with extracellular matrix and plasma proteins: pathogenic implications and therapeutic possibilities. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 16, n. 2, p. 117-26, Dec 1996.

LÄHTEENMÄKI, K.; KUKKONEN, M.; KORHONEN, T. K. The Pla surface protease/adhesin of *Yersinia pestis* mediates bacterial invasion into human endothelial cells. **FEBS Lett**, v. 504, n. 1-2, p. 69-72, Aug 2001.

LÄHTEENMÄKI, K.; KUUSELA, P.; KORHONEN, T. K. Bacterial plasminogen activators and receptors. **FEMS Microbiol Rev**, v. 25, n. 5, p. 531-52, Dec 2001.

MALMSTRÖM, J. et al. Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. **Nature**, v. 460, n. 7256, p. 762-5, Aug 2009.

MARTÍNEZ, R. et al. [Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba]. **Rev Panam Salud Publica**, v. 15, n. 4, p. 249-55, Apr 2004.

MATSUNAGA, J. et al. LipL46 is a novel surface-exposed lipoprotein expressed during leptospiral dissemination in the mammalian host. **Microbiology**, v. 152, n. Pt 12, p. 3777-86, Dec 2006.

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, Nov 2011.

MERI, T. et al. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospires. **Microb Pathog**, v. 39, n. 4, p. 139-47, Oct 2005.

MIRAGLIA, F. et al. Molecular characterization, serotyping, and antibiotic susceptibility profile of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni isolates from Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 77, n. 3, p. 195-9, Nov 2013.

MORGAN, J. et al. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. **Clin Infect Dis**, v. 34, n. 12, p. 1593-9, Jun 2002.

MURGIA, R. et al. Oligonucleotides specific for pathogenic and saprophytic leptospira occurring in water. **FEMS Microbiol Lett**, v. 148, n. 1, p. 27-34, Mar 1997.

MÉRIEN, F. et al. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **J Clin Microbiol**, v. 30, n. 9, p. 2219-24, Sep 1992.

NAHORI, M. A. et al. Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. **J Immunol**, v. 175, n. 9, p. 6022-31, Nov 2005.

NAIMAN, B. M. et al. Evaluation of type 1 immune response in naïve and vaccinated animals following challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo: involvement of WC1(+) gammadelta and CD4 T cells. **Infect Immun**, v. 70, n. 11, p. 6147-57, Nov 2002.

NAKAI, K.; KANEHISA, M. Expert system for predicting protein localization sites in gram-negative bacteria. **Proteins**, v. 11, n. 2, p. 95-110, 1991.

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, Apr 2004 (a).

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

NEVES, F. O. et al. Identification of a novel potential antigen for early-phase serodiagnosis of leptospirosis. **Arch Microbiol**, v. 188, n. 5, p. 523-32, Nov 2007.

NICODEMO, A. C. et al. Lung lesions in human leptospirosis: microscopic, immunohistochemical, and ultrastructural features related to thrombocytopenia. **Am J Trop Med Hyg**, v. 56, n. 2, p. 181-7, Feb 1997.

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, R. et al. Adhesins of *Leptospira interrogans* mediate the interaction to fibrinogen and inhibit fibrin clot formation in vitro. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 8, p. e2396, 2013.

OLIVEIRA, T. R. et al. Evaluation of leptospiral recombinant antigens MPL17 and MPL21 for serological diagnosis of leptospirosis by enzyme-linked immunosorbent assays. **Clin Vaccine Immunol**, v. 15, n. 11, p. 1715-22, Nov 2008.

OLIVEIRA, 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, Mar 2010.

PALANIAPPAN, R. U.; RAMANUJAM, S.; CHANG, Y. F. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. **Curr Opin Infect Dis**, v. 20, n. 3, p. 284-92, Jun 2007.

PANAPHUT, T. et al. Ceftriaxone compared with sodium penicillin G for treatment of severe leptospirosis. **Clin Infect Dis**, v. 36, n. 12, p. 1507-13, Jun 2003.

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

PARK, S. K. et al. Leptospirosis in Chonbuk Province of Korea in 1987: a study of 93 patients. **Am J Trop Med Hyg**, v. 41, n. 3, p. 345-51, Sep 1989.

PATTI, J. M.; HÖÖK, M. Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. **Curr Opin Cell Biol**, v. 6, n. 5, p. 752-8, Oct 1994.

PEREIRA, P. R. M. et al. Multifunctional and Redundant Roles of *Leptospira interrogans* Proteins in Bacterial-Adhesion and fibrin clotting inhibition. **Int J Med Microbiol**, v. 307, n. 6, p. 297-310, Sep 2017.

PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nat Methods**, v. 8, n. 10, p. 785-6, Sep 2011.

PEĆINA-SLAUS, N. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. **Cancer Cell Int**, v. 3, n. 1, p. 17, Oct 2003.

PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Med Mal Infect**, v. 43, n. 1, p. 1-9, Jan 2013.

PICARDEAU, M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? **Nat Rev Microbiol**, v. 15, n. 5, p. 297-307, May 2017.

PICARDEAU, M. et al. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 78, n. 1, p. 1-8, Jan 2014.

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, Feb 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, Sep 2010.

PINNE, M.; HAAKE, D. A. A comprehensive approach to identification of surface-exposed, outer membrane-spanning proteins of *Leptospira* interrogans. **PLoS One**, v. 4, n. 6, p. e6071, Jun 2009.

PINNE, M.; MATSUNAGA, J.; HAAKE, D. A. Leptospiral outer membrane protein microarray, a novel approach to identification of host ligand-binding proteins. **J Bacteriol**, v. 194, n. 22, p. 6074-87, Nov 2012.

PORATH, J.; FLODIN, P. Gel filtration: a method for desalting and group separation. **Nature**, v. 183, n. 4676, p. 1657-9, Jun 1959.

PREISSNER, K. T. The role of vitronectin as multifunctional regulator in the hemostatic and immune systems. **Blut**, v. 59, n. 5, p. 419-31, Nov 1989.

PREISSNER, K. T. Structure and biological role of vitronectin. **Annu Rev Cell Biol**, v. 7, p. 275-310, 1991.

QUE-GEWIRTH, N. L. et al. A methylated phosphate group and four amide-linked acyl chains in *leptospira* interrogans lipid A. The membrane anchor of an unusual lipopolysaccharide that activates TLR2. **J Biol Chem**, v. 279, n. 24, p. 25420-9, Jun 2004.

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, Aug 2004.

RANJBAR, B.; GILL, P. Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses- a review. **Chem Biol Drug Des**, v. 74, n. 2, p. 101-20, Aug 2009.

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

RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. **Vaccine**, v. 19, n. 17-19, p. 2688-91, Mar 2001.

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, Apr 2003.

RICALDI, J. N. et al. Whole genome analysis of *Leptospira licerasiae* provides insight into leptospiral evolution and pathogenicity. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 10, p. e1853, 2012.

RODRIGUEZ-GONZALEZ, I. et al. [Efficacy of Spirolept vaccine against human leptospirosis as estimated by passive protection of laboratory rodents]. **Med Mal Infect**, v. 34, n. 5, p. 196-200, May 2004.

ROHDE, H.; WICK, G.; TIMPL, R. Immunochemical characterization of the basement membrane glycoprotein laminin. **Eur J Biochem**, v. 102, n. 1, p. 195-201, Dec 1979.

SANDERSON-SMITH, M. L. et al. Bacterial plasminogen receptors: mediators of a multifaceted relationship. **J Biomed Biotechnol**, v. 2012, p. 272148, 2012.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 74, n. 12, p. 5463-7, Dec 1977.

SANTOS, J. V. et al. Binding of human plasminogen by the lipoprotein LipL46 of *Leptospira interrogans*. **Mol Cell Probes**, Nov 2018.

SARKAR, J. et al. Leptospirosis: a re-emerging infection. **Asian Pac J Trop Med**, v. 5, n. 6, p. 500-2, Jun 2012.

SCHREIER, S. et al. Leptospirosis: current situation and trends of specific laboratory tests. **Expert Rev Clin Immunol**, v. 9, n. 3, p. 263-80, Mar 2013.

SHEEHAN, M. et al. Complement inhibition by human vitronectin involves non-heparin binding domains. **Clin Exp Immunol**, v. 101, n. 1, p. 136-41, Jul 1995.

SILVA, L. P. et al. Evaluation of two novel leptospiral proteins for their interaction with human host components. **Pathog Dis**, v. 74, n. 5, 07 2016.

SIQUEIRA, G. H. et al. Characterization of three novel adhesins of *Leptospira interrogans*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 89, n. 6, p. 1103-16, Dec 2013.

SIQUEIRA, G. H. et al. *Leptospira interrogans* Lsa23 protein recruits plasminogen, factor H and C4BP from normal human serum and mediates C3b and C4b degradation. **Microbiology**, v. 162, n. 2, p. 295-308, Feb 2016.

SIQUEIRA, G. H. et al. The role of Lsa23 to mediate the interaction of *Leptospira interrogans* with the terminal complement components pathway. **Microb Pathog**, v. 112, p. 182-189, Nov 2017.

SMYTHE, L. et al. Classification of *Leptospira* genomospecies 1, 3, 4 and 5 as *Leptospira alstonii* sp. nov., *Leptospira vanthielii* sp. nov., *Leptospira terpstrae* sp. nov. and *Leptospira yanagawae* sp. nov., respectively. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 63, n. Pt 5, p. 1859-62, May 2013.

SOUZA, N. M. et al. Lsa30, a novel adhesin of *Leptospira interrogans* binds human plasminogen and the complement regulator C4bp. **Microb Pathog**, v. 53, n. 3-4, p. 125-34, Sep 2012.

STERN, E. J. et al. Outbreak of leptospirosis among Adventure Race participants in Florida, 2005. **Clin Infect Dis**, v. 50, n. 6, p. 843-9, Mar 2010.

STOCKMANN, A. et al. Multimeric vitronectin. Identification and characterization of conformation-dependent self-association of the adhesive protein. **J Biol Chem**, v. 268, n. 30, p. 22874-82, Oct 1993.

STONE, B. L.; BRISSETTE, C. A. Host Immune Evasion by Lyme and Relapsing Fever *Borreliae*: Findings to Lead Future Studies for *Borrelia miyamotoi*. **Front Immunol**, v. 8, p. 12, 2017.

TEIXEIRA, A. F. et al. Features of two new proteins with OmpA-like domains identified in the genome sequences of *Leptospira interrogans*. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0122762, 2015.

TIMPL, R. et al. Laminin--a glycoprotein from basement membranes. **J Biol Chem**, v. 254, n. 19, p. 9933-7, Oct 1979.

TO, W. S.; MIDWOOD, K. S. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. **Fibrogenesis Tissue Repair**, v. 4, p. 21, Sep 2011.

TOYOKAWA, T.; OHNISHI, M.; KOIZUMI, N. Diagnosis of acute leptospirosis. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 9, n. 1, p. 111-21, Jan 2011.

TREVEJO, R. T. et al. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage--Nicaragua, 1995. **J Infect Dis**, v. 178, n. 5, p. 1457-63, Nov 1998.

TUERO, I.; VINETZ, J. M.; KLIMPEL, G. R. Lack of demonstrable memory T cell responses in humans who have spontaneously recovered from leptospirosis in the Peruvian Amazon. **J Infect Dis**, v. 201, n. 3, p. 420-7, Feb 2010.

VIEIRA, M. L. et al. Interaction of *Leptospira interrogans* with human proteolytic systems enhances dissemination through endothelial cells and protease levels. **Infect Immun**, v. 81, n. 5, p. 1764-74, May 2013.

VIEIRA, M. L. et al. Plasminogen binding proteins and plasmin generation on the surface of *Leptospira* spp.: the contribution to the bacteria-host interactions. **J Biomed Biotechnol**, v. 2012, p. 758513, 2012.

VIEIRA, M. L. et al. In vitro identification of novel plasminogen-binding receptors of the pathogen *Leptospira interrogans*. **PLoS One**, v. 5, n. 6, p. e11259, Jun 2010.

VIEIRA, M. L. et al. In vitro evidence for immune evasion activity by human plasmin associated to pathogenic *Leptospira interrogans*. **Microb Pathog**, v. 51, n. 5, p. 360-5, Nov 2011.

VIEIRA, M. L. et al. Leptospiral extracellular matrix adhesins as mediators of pathogen-host interactions. **FEMS Microbiol Lett**, v. 352, n. 2, p. 129-39, Mar 2014.

VIEIRA, M. L. et al. Plasminogen acquisition and activation at the surface of leptospira species lead to fibronectin degradation. **Infect Immun**, v. 77, n. 9, p. 4092-101, Sep 2009.

WERTS, C. et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. **Nat Immunol**, v. 2, n. 4, p. 346-52, Apr 2001.

WIEDEMANN, C.; BELLSTEDT, P.; GÖRLACH, M. CAPITO--a web server-based analysis and plotting tool for circular dichroism data. **Bioinformatics**, v. 29, n. 14, p. 1750-7, Jul 2013.

XU, G. et al. Observation on the immune efficiency after vaccination with new pentavalent whole cell vaccine for leptospirosis in Fujian province. **Chin J Zoonose**, v. 21, p. 73-78, 2005.

XU, Y.; YE, Q. Human leptospirosis vaccines in China. **Hum Vaccin Immunother**, p. 0, Nov 2017.

YAN, W. et al. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Leptospira* immunoglobulin-like protein B (rLigB) in a hamster challenge model. **Microbes Infect**, v. 11, n. 2, p. 230-7, Feb 2009.

YU, C. S. et al. Prediction of protein subcellular localization. **Proteins**, v. 64, n. 3, p. 643-51, Aug 2006.

ZIPFEL, P. F.; HALLSTRÖM, T.; RIESBECK, K. Human complement control and complement evasion by pathogenic microbes--tipping the balance. **Mol Immunol**, v. 56, n. 3, p. 152-60, Dec 2013.